ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ)

ปริญญา

เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ
สาขา	**ภาควิชา**

เรื่อง การใช้ *Schizochytrium limacinum* ในการอนุบาลลูกกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*, Boone) และผลที่มีต่อระบบภูมิคุ้มกันและความทนทานต่อความเครียด

Application of *Schizochytrium limacinum* for Nursing Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei,* Boone) Larva and Its Effects on Immune System and Stress Tolerance

นามผู้วิจัย นายทรงทรัพย์ อรุณกมล

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....
(รองศาสตราจารย์นนทวิทย์ อารีย์ชน, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....
(อาจารย์ประพันธ์ศักดิ์ ศีรษะภูมิ, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เรืองวิชญ์ ยั้นพันธ์, D.Tech.Sc.)

หัวหน้าภาควิชา .....
(ศาสตราจารย์อุทัยรัตน์ ณ นคร, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....
(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

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

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การใช้ *Schizochytrium limacinum* ในการอนุบาลลูกกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*, Boone) และผลที่มีต่อระบบภูมิคุ้มกันและความทนทานต่อความเครียด

Application of *Schizochytrium limacinum* for Nursing Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vanamei*, Boone) Larva and Its Effects on Immune System and Stress Tolerance

โดย

นายทรงทรัพย์ อรุณกมล

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ)
พ.ศ. 2552

ทรงทรัพย์ อรุณกมล 2552: การใช้ *Schizochytrium limacinum* ในการอนุบาลลูกกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*, Boone) และผลที่มีต่อระบบภูมิคุ้มกันและความทนทานต่อความเครียด ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ) สาขาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์นนทวิทย์ อารีย์ชน, Ph.D. 67 หน้า

การอนุบาลลูกกุ้งขาวตั้งแต่ระยะ Nauplius ถึงระยะ Postlarva โดยให้ *Schizochytrium limacinum* แบบเสริมและทดแทน *Chaetoceros* sp.ในระยะ Zoea 1- Zoea 3 โดยแบ่งเป็น 4 ชุดการทดลองดังนี้คือชุดการทดลองที่ 1 ให้ *Chaetoceros* sp. 100% (ชุดควบคุม) ชุดการทดลองที่ 2 ให้ *Chaetoceros* sp. และ *S. limacinum* อัตราส่วน 50%:50% ชุดการทดลองที่ 3 ให้ *Chaetoceros* sp. และ *S. limacinum* อัตราส่วน 75%:25% และชุดการทดลองที่ 4 ให้ *Chaetoceros* sp. 100% และเสริมด้วย *S. limacinum* 25% และเมื่อลูกกุ้งเข้าสู่ระยะ Mysis 1 ให้ *Artemia* จนถึงระยะ Postlarva 15 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตและอัตรารอดระยะต่าง ๆ แล้วนำลูกกุ้งระยะ Postlarva 15 มาทดสอบความทนทานต่อความเครียดบางประการและความต้านทานต่อเชื้อก่อโรค *Vibrio harveyi* พบว่าการอนุบาลลูกกุ้งด้วย *S. limacinum* แบบเสริมและทดแทน *Chaetoceros* sp.ในระยะ Zoea 1- Zoea 3 ในชุดการทดลองที่ 3 และ 4 มีผลทำให้ลูกกุ้งมีอัตรารอดสูงขึ้นในระยะ Zoea 1 ถึง Postlarva 1 แต่ไม่มีผลต่ออัตรารอดในระยะ Postlarva 1 ถึง Postlarva 15 รวมทั้งช่วยเพิ่มความทนทานต่อความเครียดจากการแช่ฟอร์มาลินและการลดความเค็มอย่างเฉียบพลัน ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดควบคุม ($P<0.05$) แต่ไม่มีผลต่อความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *Vibrio harveyi* ส่วนการทดลองใช้ *S. limacinum* ในรูปแบบ spray-dried ผสมอาหารเพื่อเป็นแหล่งกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง และศึกษาระดับภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของกุ้งขาวขนาด 10-15 กรัม พบว่าการใช้ *S. limacinum* ผสมอาหาร 15 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีผลทำให้ระดับระบบภูมิคุ้มกันได้แก่ Total haemocyte count, Phenoloxidase activity และ Bactericidal activity สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แต่ไม่มีผลต่อค่า Percent phagocytosis และ Phagocytic index ส่วนในด้านการเจริญเติบโตพบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) การศึกษาครั้งนี้แสดงถึงประโยชน์ของการใช้ *Schizochytrium limacinum* เป็นอาหารเสริมเพื่อเพิ่มอัตรารอดในการอนุบาลกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei* และการใช้เพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันในระดับการเลี้ยงในบ่อดิน

_____ _____ ___ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Songsub Arungamol 2009: Application of *Schizochytrium limacinum* for Nursing Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vanamei*, Boone) Larva and Its Effects on Immune System and Stress Tolerance. Master of Science (Aquaculture), Major Field: Aquaculture, Department of Aquaculture. Thesis Advisor: Associate Professor Nontawith Areechon, Ph.D. 67 pages.

Partial replacement and supplementation of *Chaetoceros* sp. by *Schizochytrium limacinum* during zoea stage 1 to 3 of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei,* Boone) was conducted. There were four experimental groups consisting of control (100% *Chaetoceros*), Treatment 2: 50% *Chaetoceros* and 50% *S. limacinum*, Treatment 3: 75% *Chaetoceros* and 25% *S. limacinum* and Treatment 4: 100% *Chaetoceros* and supplemented with 25% *S. limacinum*. *Artemia* was applied from mysis to postlarval stage and survival and growth rates were statistically compared. Stress tolerance by formalin and salinity shock and disease resistance against *Vibrio harveyi* of P15 were also compared. The result indicated that *L. vannamei* larva from zoea 1 to PL1 of Treatment 3 and 4 did show significantly better survival rates and stress tolerance than the control ($P<0.05$). However, the resistance against pathogenic *V. harveyi* of control and treatment groups were not significantly different ($P>0.05$). Another experiment was conducted by mixing the spray-dried form of *S. limacinum* as a source of highly unsaturated fatty acid in shrimp commercial pellet feed. *L. vannamei* were fed with experimental feed for 30 days and normal feed for 20 days and non-specific immunity from shrimp blood were monitored and compared at every 10 days. Shrimp that were fed with *S. limacinum* at 15 g/kg did show significantly higher values of total haemocyte count, phenoloxidase activity and bactericidal activity than the control ($P<0.05$). However, no significant differences were detected from phagocytic activity and growth of control and experimental shrimp ($P>0.05$). This result indicated the potential application of *Schizochytrium limacinum* as a feed supplement for the higher survival rates of *L. vannamei* nursing stage and also as a immunostimulant for grow-out pond stage.

_____ _____ ___ / ___ / ___

Student's signature Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ด้วยความสนับสนุนจากบุคคลหลายฝ่าย ผู้วิจัยใคร่ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์นนทวิทย์ อารีย์ชน ประธานกรรมการที่ปรึกษาเป็นอย่างสูง ที่ได้ให้ความกรุณา และเอาใจใส่อย่างดียิ่งในการให้คำปรึกษาแนะนำ ตลอดจนตรวจและแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้มาโดยตลอด ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์เรืองวิชญ์ ยุ้นพันธ์ และอาจารย์ประพันธ์ศักดิ์ ศิรษะภูมิ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์วราห์ เทพาหุดี ประธานการสอบ และอาจารย์ปกรณ์ อุ่นประเสริฐ ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่ช่วยแก้ไขและให้คำแนะนำซึ่งทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้มีคุณภาพมากขึ้น

ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยที่สนับสนุนการวิจัยนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี และขอบพระคุณอาจารย์วิเชียร ยงมานิตชัย ที่อนุเคราะห์วัตถุดิบในการทดลอง

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยใคร่ขอบกราบขอบคุณ คุณแม่ฟองจันทร์ คุณพ่อธวัช อรุณกมล น้องสาว ทรงรัตน์ อรุณกมล อาจารย์นิลุบล กิจอันเจริญ ตลอดจนญาติ พี่น้องและเพื่อน ๆ ในห้องปฏิบัติการสุขภาพสัตว์น้ำทุกท่าน ที่ช่วยเหลือและให้การสนับสนุนในทุก ๆ ด้าน และคอยให้กำลังใจ จนมีวันนี้ที่ประสบผลสำเร็จในการศึกษาในระดับมหาบัณฑิตอีกตามความตั้งใจ

ทรงทรัพย์ อรุณกมล

กันยายน 2552

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	4
การตรวจเอกสาร	5
อุปกรณ์และวิธีการ	22
อุปกรณ์	22
วิธีการ	23
ผลและวิจารณ์	32
ผล	32
วิจารณ์	43
สรุปและข้อเสนอแนะ	51
สรุป	51
ข้อเสนอแนะ	52
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	53
ภาคผนวก	62
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	67

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	อัตรารอด (เปอร์เซ็นต์) ของลูกกุ้งขาวในระยะ Zoea 1 ถึง Mysis 1, Mysis 1 ถึง Postlarva 1 และ Postlarva 1 - Postlarva 15 (ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD) ที่อนุบาลด้วย *Chaetoceros* sp. แบบเสริมและแบบทดแทน *Schizochytrium limacinum* ในระยะ zoea 1 – zoea 3	32
2	ความยาวเฉลี่ย (มิลลิเมตร) ของลูกกุ้งขาวระยะ Postlarva 1, 7 และ 15 ที่อนุบาลด้วย *Chaetoceros* sp. แบบเสริมและแบบทดแทน *S. limacinum* ในระยะ Zoea1 – Zoea 3	34
3	น้ำหนักเฉลี่ย (มิลลิกรัม) ของลูกกุ้งขาวระยะ Postlarva 15 ที่อนุบาลด้วย *Chaetoceros* sp. แบบเสริมและแบบทดแทน *S. limacinum* ในระยะ Zoea 1 – Zoea 3	34
4	อัตราส่วนของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงระหว่าง Eicasapentaenoic acid (EPA) และDocosahexaenoic (DHA) ในอาหารที่ให้ระยะ Zoea 1 – Zoea 3 จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี	35
5	อัตราการตายสะสมของลูกกุ้งระยะ Postlarva 15 ที่อนุบาลด้วย *S. limacinum* โดยการทดแทนและเสริม *Chaetoceros* sp. หลังการทดสอบความทนทานต่อความเครียดและความต้านทานต่อเชื้อ *Vibrio harveyi*	36
6	อัตราส่วนของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงระหว่าง Eicasapentaenoic acid (EPA) และ Docosahexaenoic (DHA) ในอาหารในกลุ่มควบคุมและในกลุ่มทดลองที่ให้ *S. limacinum* ผสมอาหารจากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี	37
7	ปริมาณเม็ดเลือดรวม (Total heamocyte x 10^7 cell/ml) ของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปผสม *S. limacinum* ในระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 30 วัน และหยุดให้เป็นเวลา 20 วัน	38

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
8	กิจกรรมของเอนไซม์ Phenoloxidase (unit/min/mg protein) ของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปผสม *S. limacinum* ในระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 30 วัน และหยุดให้เป็นเวลา 20 วัน	39
9	กิจกรรมการทำลายแบคทีเรีย (bactericidal activity) ของน้ำเลือดกุ้งขาวที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปผสม *S. limacinum* ในระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 30 วัน และหยุดให้เป็นเวลา 20 วัน	40
10	Percent Phagocytosis ของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปผสม *S. limacinum* ในระดับต่างกันเป็นเวลา 30 วัน และหยุดให้เป็นเวลา 20 วัน	41
11	Percent Phagocytic Index ของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปผสม *S. limacinum* ในระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 30 วัน และหยุดให้เป็นเวลา 20 วัน	42
12	น้ำหนักของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปผสม *S. limacinum* ในระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 30 วัน และหยุดให้เป็นเวลา 20 วัน	42

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

1 ลักษณะรูปร่างของเซลล์เม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ ของกุ้งได้แก่ granular cell (1) semi-granular cells (2,3) และ hyaline cells (4,5) 10

2 การทำงานของระบบภูมิคุ้มกันหลังการเข้าจับของ PRPs (a) จะเกิดกระบวนการต่อเนื่องที่เกิดจากการปล่อย granule ของเซลล์เม็ดเลือดได้แก่ ขบวนการแข็งตัวของเลือด (b) ขบวนการ Prophenoloxidase system (proPO) (c) และ Peroxinectin ซึ่งจะเกิดขบวนการตามมาหลายขบวนการ เช่น Opsonisation, Encapsulation และ Degranulation (d) 12

3 โครงสร้างของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงในกลุ่มโอเมก้า-3 คือ Eicosapenteanoic acid (EPA; 20:5) และ Docosahexaenoic acid (DHA; 22:6) 17

ภาพผนวกที่

1 กราฟมาตรฐานค่าดูดกลืนแสงโปรตีน (Bovine Serum Albumin) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร โดยวิธีของ Lowry (1951) 65

การใช้ *Schizochytrium limacinum* ในการอนุบาลลูกกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*, Boone) และผลที่มีต่อระบบภูมิคุ้มกันและความทนทานต่อความเครียด

Application of *Schizochytrium limacinum* for Nursing Pacific White Shrimp (*Litopeneaus vannamei,* Boone) Larva and Its Effects on Immune System and Stress Tolerance

คำนำ

กุ้งขาวหรือกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*, Boone) เป็นสินค้าเกษตรส่งออกที่สร้างรายได้ให้กับประเทศไทยต่อเนื่องมาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2545 ซึ่งกรมประมงได้อนุมัติการนำเข้าพ่อแม่พันธุ์ปลอดเชื้อ (Specific Pathogen Free; SPF) เพื่อทดแทนการเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่กำลังประสบปัญหาต่าง ๆ ในปัจจุบันอาทิ เช่น โรคระบาด การขาดแคลนพ่อแม่พันธุ์ ตลอดจนคุณภาพของลูกพันธุ์ที่มีอัตรารอดและอัตราการเจริญเติบโตที่ต่ำกว่าในอดีต ทำให้เกษตรกรส่วนใหญ่ให้ความสนใจและหันมาเลี้ยงกุ้งขาวแทนกุ้งกุลาดำ เนื่องจากมีข้อดีหลายประการเมื่อเทียบกับกุ้งกุลาดำอาทิ เช่น สามารถปรับตัวให้เข้ากับภูมิอากาศในประเทศไทยได้ดี มีอัตราการเจริญเติบโตที่รวดเร็วและมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมในการเลี้ยงมากกว่ากุ้งกุลาดำ มีการพัฒนาสายพันธุ์มานานกว่า 20 ปี ตลอดจนสามารถเลี้ยงในอัตราความหนาแน่นสูงได้ดี (ภิญโญ, 2545) ทำให้ในปัจจุบันมีพื้นที่ในการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวภายในประเทศมากถึง 95% ของพื้นที่การเลี้ยงกุ้งทั้งหมด (กลุ่มวิเคราะห์การค้าสินค้าประมงระหว่างประเทศ, 2551) อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวในปัจจุบันเริ่มประสบปัญหาคล้ายกับการเลี้ยงกุ้งกุลาดำในอดีต โดยเฉพาะโรคระบาดที่ติดมากับการนำเข้าพ่อแม่พันธุ์ ได้แก่ โรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส เช่น Taura syndrome virus (TSV), White spot syndrome virus (WSSV) และ Infectious hypodermal and hemopoietic tissue (IHHNV) ส่วนโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย อาทิเช่น โรคเรืองแสงที่เกิดจากเชื้อ *Vibrio harveyi* ซึ่งมักพบในการอนุบาลลูกกุ้งทะเล จนทำให้เกิดความเสียหายให้แก่เกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวอย่างมาก ทำให้ผู้เลี้ยงกุ้งจำเป็นต้องใช้ยาและสารเคมีเพื่อช่วยแก้ปัญหาที่เกิดขึ้น ซึ่งอาจทำให้เกิดการตกค้างของยาและสารเคมี ตลอดจนการดื้อยา ซึ่งการใช้ยาและสารเคมีนอกจากจะไม่ปลอดภัยต่อผู้บริโภคแล้วยังทำให้ระบบนิเวศน์และสิ่งแวดล้อมขาดความสมดุล การใช้สารเสริมภูมิคุ้มกันและอาหารเสริมสุขภาพในกุ้ง จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการป้องกันโรคระบาดที่เกิดกับกุ้งได้ ซึ่งวิธีที่นิยมทำได้ง่ายและปลอดภัย คือ การ

เสริมโภชนาการของกุ้ง เช่น การเพิ่มระดับของโปรตีนในอาหาร (Hall *et al*., 1999; Montano-Perez *et al*., 1999; Vargas-Albores *et al*., 1996) และการเสริมกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (Highly Unsaturated Fatty Acid: HUFA) (Vargas-Albores *et al*., 1993) ซึ่งสารอาหารทั้ง 2 ชนิดนี้สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่เฉพาะเจาะจง (Non-specific immune response) ได้แก่ ขบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม (Phagocytosis) และขบวนการ Phenoloxidase โดยอาศัยการทำงานของเซลล์เม็ดเลือด (Hemocyte) เป็นหลัก ปัจจุบันการป้องกันโรคด้วยเทคนิคทางโภชนาการ โดยการเพิ่มกรดไขมันในอาหารเป็นอีกวิธีหนึ่งในการป้องกันโรคโดยการส่งเสริมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน และเพิ่มอัตราการเจริญเติบโต ซึ่งกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงในกลุ่มโอเมก้า-3 (ω-3) ที่ประกอบด้วย Docosahexaenoic acid (DHA, 22:6, n-3) และ Eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5, n-3) ซึ่งเป็นที่ยอมรับกันอย่างแพร่หลายว่ามีความสำคัญต่อการเจริญเติบโต อัตรารอด พัฒนาการของสัตว์น้ำวัยอ่อน ความทนทานต่อความเครียดและส่งเสริมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชี่ยน (Chim *et al*., 2001; Rees *et al*., 1994)

การนำสิ่งมีชีวิตที่มีคุณสมบัติพิเศษในการสร้างกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงมาใช้ในการอนุบาลลูกกุ้งจึงน่าจะเป็นอีกวิธีในการเสริมกรดไขมันไม่อิ่มตัวให้กุ้งวัยอ่อน เช่น สิ่งมีชีวิตในกลุ่ม Thraustochytrids ได้แก่ *Thraustochytrium* sp. และ *Schizochytrium limacimun* ซึ่งพบในแถบนิเวศน์ที่เป็นป่าชายเลนและบริเวณที่มีการทับถมของซากพืชซากสัตว์ เนื่องจากสิ่งมีชีวิตในกลุ่มนี้ทำหน้าที่เป็นผู้ย่อยสลายในธรรมชาติ มีคุณสมบัติพิเศษคือ มีความสามารถในการสร้างกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (HUFA) สะสมในเซลล์โดยส่วนใหญ่เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวในกลุ่มโอเมก้า-3 จำพวก DHA (Yongmanitchai *et al*., 2007) ซึ่งประจวบเหมาะกับชีววิทยาของกุ้ง Penaeus วัยอ่อนที่มีการเคลื่อนที่อาศัยอยู่บริเวณป่าชายเลน ทำให้ *S. limacinum* เป็นอาหารที่สำคัญในธรรมชาติของลูกกุ้ง (เพ็ญศรี และสุชาติ, 2539) ปัจจุบันเกษตรกรนิยมอนุบาลลูกกุ้งทะเลด้วยไดอะตอมชนิดต่าง ๆ เช่น *Chaetoceros* sp. และ *Skeletonema* sp. ซึ่งมีคุณสมบัติในการสร้างกรดไขมันไม่อิ่มตัวพวก EPA แต่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวพวก DHA น้อย จึงมีการนำ *S. limacinum* ซึ่งมีปริมาณ DHA ในเซลล์สูงมาอนุบาลควบคู่กับการให้ *Chaetoceros* sp. (Harel *et al*., 2002)

ในการศึกษาครั้งนี้แบ่งเป็น 2 การทดลอง คือ การทดลองที่ 1 เป็นการทดลองอนุบาลลูกกุ้งขาวแวนนาไมโดยใช้ *Schizochytrium limacinum* ร่วมกับ *Chaetoceros* sp. ในอัตราส่วนต่าง ๆ แบบทดแทนและเสริม เพื่อเพิ่มคุณภาพของลูกกุ้ง โดยประเมินจากการเจริญเติบโต ความทนทานต่อสภาพเครียดบางประการและความต้านทานต่อเชื้อ *V. harveyi* และการทดลองที่ 2 เป็นการศึกษา

ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของกุ้งขาวหลังได้รับ *S. limacinum* แบบ spray-dried โดยการผสมอาหาร เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการประยุกต์ใช้ *S. limacinum* ในการเลี้ยงและอนุบาลลูกกุ้งให้ประสบผลสำเร็จต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบผลของการให้ *Schizochytrium limacinum* ในการเสริมและทดแทน *Chaetoceros* sp.ในการอนุบาลกุ้งขาวระยะ Zoea 1 ถึง Postlarva 15 ต่ออัตราการเจริญเติบโต อัตรารอด ความทนทานต่อสภาพความเครียดบางประการ และความต้านทานต่อเชื้อก่อโรค

2. เพื่อศึกษาระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของกุ้งขาวหลังการเลี้ยงด้วยอาหารผสม *S. limacinum*

การตรวจเอกสาร

กุ้งขาว

กุ้งขาว กุ้งขาวแวนนาไม หรือกุ้งขาวแปซิฟิก มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Litopenaeus vannamei* มีชื่อสามัญตาม Food and Agriculture Organization (FAO) ว่า White leg shrimp เป็นกุ้งพื้นเมืองที่เลี้ยงกันแพร่หลายในเขตทวีปอเมริกาใต้ ซึ่งพบได้ทั่วไปแถบบริเวณชายฝั่งของมหาสมุทรแปซิฟิกทางตะวันออก และพบว่ามีการเพาะเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายในแถบประเทศทวีปอเมริกาได้แก่ ประเทศเอกวาดอร์ เม็กซิโก เปรู ปานามา ฮอนดูรัส โคลัมเบียและบราซิล ในส่วนของประเทศไทย กรมประมงได้เริ่มมีการนำเข้าพ่อแม่พันธุ์กุ้งขาวมาเพาะเลี้ยงเมื่อปี พ.ศ. 2545 เนื่องจากเป็นกุ้งที่เลี้ยงง่ายและมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมได้ดี จนทำให้ในปัจจุบันมีการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมกว่า 95% ของพื้นที่การเลี้ยงกุ้งทะเลทั้งหมดภายในประเทศไทย

อนุกรมวิธานของกุ้งขาว

กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ค้นพบโดย Boone ในปี ค.ศ. 1931 ต่อมา Perez Farfante and Kensley (1997) ได้ลำดับอนุกรมวิธานของกุ้งชนิดนี้ ดังนี้

Phylum Arthropoda

Class Crustacea

Subclass Malacostraca

Order Decapoda

Suborder Natantia

Family Penaeidae

Genus *Litopenaeus*

Species *Litopenaeus vannamei*

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Litopenaeus vannamei*

ลักษณะทั่วไป

ลักษณะทั่วไปของกุ้งในสกุลนี้ คือ ผิวเรียบเกลี้ยงเป็นมัน กรีในระยะวัยอ่อนจะยาวกว่าก้านหนวด (antennular peduncle) เมื่อโตขึ้นกรีจะมีขนาดสั้นลง ฟันกรีด้านล่าง (ventral teeth) มี 2 – 4 อัน บริเวณเปลือกคลุมหัวและอก (carapace) มีหนวดคู่ที่ 2 (antenna) และหนามที่บริเวณตับ (hepatic spine) ชัดเจน แต่ไม่พบหนามที่อยู่บริเวณตา (orbital spine) และมีส่วนของหนามที่อยู่มุมด้านล่างของส่วนหน้าเปลือกคลุมหัว (pterygostomian spine) ไม่มีร่องหลังตา (postocular sulcus) ขนาดของสันหลังกรี (postrostral carina) มีหลายขนาด ไม่พบสันที่อยู่หน้ากระเพาะอาหาร (gastrofrontal carina) สันที่อยู่ระหว่างกระเพาะกับตา (gastro-orbital carina) สั้น ร่องที่อยู่ระหว่างตากับหนวด (orbital-antennal sulcus) มองเห็นได้ชัดเจน สันตับ (hepatic carina) และสันคอ (cervical carina) คมด้านข้างเป็นร่องลึก ส่วนของลำตัวในปล้องที่ 6 จะมีสันที่เรียงตัวกันตามความยาวของลำตัวด้านบน (cicatrices) 3 อัน ร่องที่วางในแนวยาวของลำตัวด้านบน (dorsolateral sulcus) แคบหรือไม่มี ส่วนของหาง (telson) เรียบ หนวดคู่ที่ 1 (antennules) ไม่มีหนามที่อยู่บริเวณปล้องแรกของหนวด (parapenaeid spine) แผ่นรยางค์ของ maxilla คู่ที่ 1 ยาว มี 3-4 ปล้อง สีของลำตัวเป็นสีขาว หางและขาสีแดงอ่อน กรีด้านบนหยักและถี่ปลาย มีฟันกรีด้านล่าง 2 กรี และด้านบน 8 กรี ความยาวของกรีจะยาวกว่าตา (ภิญโญ, 2545; ปิยะบุตร, 2546)

วงจรชีวิตและวิวัฒนาการของกุ้งวัยอ่อน

กุ้งขาวเมื่อเป็นตัวเต็มวัยจะอาศัยอยู่ตามแนวปะการังจนถึงพื้นท้องน้ำความลึกประมาณ 72 เมตร (Dore and Frimodt, 1987) ตัวเต็มวัยจะวางไข่ในทะเล จากนั้นตัวอ่อนจะเคลื่อนที่ไปอาศัยบริเวณชายฝั่งหรือป่าชายเลน และจะมีการเจริญเติบโตโดยการลอกคราบจนถึงระยะ Postlarva จะออกหากินบริเวณน้ำกร่อย จนกระทั่งเมื่อโตเป็นตัวเต็มวัยจะกลับลงสู่ทะเลเพื่อวางไข่ต่อไป ไข่ของกุ้งทะเลเมื่อได้รับการผสมแล้ว จะมีการแบ่งเซลล์จาก 1-2, 2-4, 4-8 จนถึง 32 เซลล์ และจะฟักเป็นตัวอ่อนภายในระยะเวลา 14-15 ชั่วโมง หลังจากฟักเป็นตัวแล้ว จะมีการเจริญเติบโตอย่างต่อเนื่อง ซึ่งประจวบ (2530) แบ่งระยะการเจริญเติบโตของกุ้งทะเลได้ 4 ระยะ ดังนี้

ระยะ Nauplius เป็นระยะแรกหลังออกจากไข่ มีขนาดเล็กมากมีลักษณะคล้ายแมงมุมลำตัวค่อนข้างกลมคล้ายกระสวย มีจุดตรงกลางส่วนหน้า ทำหน้าที่เป็นตา และมีรยางค์ 3 คู่ คู่แรกเจริญไปเป็นหนวดคู่สั้น (antenule) รยางค์คู่ที่ 2 จะเจริญเป็นหนวดคู่ยาว (antenna) คู่ที่ 3 เจริญเป็น

ขากรรไกร (mandible) มีการลอกคราบ 6 ครั้ง ใช้ระยะเวลาประมาณ 45-50 ชั่วโมง มีพฤติกรรมการวิ่งเข้าหาแสง และล่องลอยอยู่กับกระแสน้ำ ซึ่งการลอกคราบครั้งสุดท้ายของระยะ Nauplius จะมีขนาดประมาณ 0.6 มิลลิเมตร

ระยะ Zoea หรือ Protozoea ลูกกุ้งระยะนี้จะมีลำตัวที่ยาวขึ้น เริ่มมีส่วนเปลือกคลุมหัว (carapace) ขากรรไกรเริ่มเปลี่ยนไปทำหน้าที่ในการกินอาหาร ส่วนอาหารที่ลูกกุ้งระยะนี้เป็นพวกแพลงก์ตอนพืช หรือสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่มีขนาด 5-100 μm การเจริญเติบโตระยะนี้มีการลอกคราบ 3 ครั้ง ใช้ระยะเวลาประมาณ 4-5 วัน

ระยะ Mysis ลูกกุ้งระยะนี้จะมองเห็นส่วนหัวแยกกับลำตัวได้ชัดเจน ส่วนท้องเริ่มมีปุ่มและจะพัฒนาไปเป็นรยางค์ว่ายน้ำ ใช้การดีดตัวถอยหลังในการเคลื่อนที่ ลูกกุ้งระยะนี้กินทั้งแพลงก์ตอนพืชและแพลงก์ตอนสัตว์ รวมทั้งสัตว์ขนาดเล็ก ระยะนี้มีการลอกคราบทั้งหมด 3 ครั้ง ใช้เวลาประมาณ 3-5 วัน

ระยะ Postlarva เป็นระยะที่มีการพัฒนารยางค์และอวัยวะต่าง ๆ เหมือนตัวเต็มวัยมากที่สุด ขาเดิน 3 คู่แรกเจริญไปเป็นก้ามหนีบ มีปลายหางแหลม (telson) การเคลื่อนที่จะว่ายน้ำไปข้างหน้า เริ่มเกาะและหากินบริเวณพื้นท้องน้ำ กินอาหารได้ทุกประเภทรวมทั้งซากพืชซากสัตว์บริเวณหน้าดิน

การสืบพันธุ์

ลักษณะภายนอกของเพศผู้ที่เห็นได้ชัดเจน คือ อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (petasma) เป็นสมมาตรกัน มีลักษณะกึ่งเปิดคล้ายรูปตะขออยู่ในส่วนของ endopod ของขาว่ายน้ำ (pleopod) คู่ที่ 1 และลักษณะภายนอกของกุ้งเพศเมียคืออวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย (thelycum) เป็นแบบเปิดตั้งอยู่บริเวณฐานของขาเดินคู่ที่ 4 และ 5 สามารถเห็นรังไข่ (Ovary) ของเพศเมียได้อย่างชัดเจน โดยเพศผู้จะปล่อยน้ำเชื้อไว้ในส่วนเปลือก (hard-shell) ของอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียซึ่งสามารถเก็บไว้ได้ก่อนที่จะทำการวางไข่ และสามารถเกิดการผสมพันธุ์ได้โดยไม่ต้องลอกคราบก่อน การพัฒนาของไข่จะสังเกตได้จากสีของรังไข่ ซึ่งแบ่งออกได้เป็น 4 ระยะ คือ

ระยะที่ 1 undeveloped stage เป็นระยะที่ยังไม่มีการพัฒนาของรังไข่ในช่วงนี้รังไข่จะมีสีขาวและทึบแสง

ระยะที่ 2 developing stage ในระยะนี้รังไข่มีการพัฒนา รังไข่จะมีสีเหลืองหรือแดง
ระยะที่ 3 early ripe stage เป็นระยะที่ไข่ใกล้จะสุก รังไข่จะมีสีน้ำตาลทอง
ระยะที่ 4 ripe stage เป็นระยะที่ไข่สุกเต็มที่ รังไข่จะมีสีน้ำตาลอมเขียว

ซึ่งขั้นตอนการสืบพันธุ์มีดังนี้คือจะเริ่มจากการที่ตัวเมียจะปล่อยฮอร์โมนออกมาเมื่อพร้อมที่จะวางไข่หลังจากนั้นตัวผู้ก็จะหงายท้องขึ้นประกบกับตัวเมีย ใช้ขาว่ายน้ำโอบรัดตัวเมียไว้และปล่อย Sperm เข้าถุงเก็บ Sperm บริเวณหน้าอวัยวะสืบพันธุ์ของเพศเมีย นอกจากการผสมพันธุ์กันโดยวิธีธรรมชาติแล้วยังสามารถใช้วิธีการตัดตา กระตุ้นให้เพศเมียหลั่งฟีโรโมนในขณะที่ผสมพันธุ์ออกมาได้เร็วขึ้น โดยอายุของกุ้งที่เหมาะสำหรับการสืบพันธุ์ คือ มีอายุประมาณ 6-12 เดือน และในเพศผู้ คือ ช่วงอายุ 12 เดือน โดยจำนวนของไข่นั้นจะขึ้นกับขนาดของแม่พันธุ์ แม่กุ้งขนาด 30-45 กรัม จะมีไข่ 100,000-250,000 ฟอง ไข่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.22 มิลลิเมตร (ประจวบ, 2537)

ลักษณะการกินอาหาร

กุ้งขาวเป็นกุ้งที่สามารถกินได้ทั้งพืช สัตว์ และซากของสิ่งมีชีวิต รวมถึงอาหารสำเร็จรูป อุปนิสัยของกุ้งชนิดนี้ คือ จะมีการเคลื่อนที่อยู่ตลอด และว่ายน้ำได้เร็ว การกินอาหารของกุ้งนั้นจะแตกต่างกันตามอายุ และระยะการเจริญเติบโต ดังนี้

ระยะ Nauplius เป็นระยะที่ยังไม่ต้องการอาหาร เนื่องจากมีถุงไข่แดง (yolk sac) ซึ่งเป็นแหล่งอาหารติดอยู่หลังฟักเป็นตัว

ระยะ Zoea เริ่มกินแพลงค์ตอนพืชขนาดเล็ก สาหร่ายเซลล์เดียวหรือสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กเป็นอาหาร โดยการกรองผ่านปาก ซึ่งในช่วงปลายของระยะนี้ จะเริ่มกินแพลงค์ตอนสัตว์เป็นอาหารได้ด้วย เนื่องจากมีรยางค์ที่สามารถจับหรือเกาะอาหารได้เป็นอย่างดี

ระยะ Mysis ลูกกุ้งระยะนี้ มีรยางค์คล้ายตัวเต็มวัยสามารถกินอาหารได้หลายชนิดทั้งที่เป็นแพลงค์ตอนพืช แพลงค์ตอนสัตว์และสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก

ระยะ Postlarva เป็นระยะที่มีลักษณะเหมือนตัวเต็มวัยมาก สามารถว่ายน้ำและปรับตัวให้หากินที่บริเวณหน้าดินได้แล้ว โดยส่วนมากจะกินแพลงก์ตอนสัตว์และสิ่งมีชีวิตหน้าดิน

ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง

ระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ในกลุ่ม crustacean เป็นแบบไม่จำเพาะเจาะจง (non-specific immune response) ในการป้องกันจากสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย ซึ่งเกิดจากกิจกรรมของเม็ดเลือด น้ำเลือด และส่วนของเนื้อเยื่อต่าง ๆ ในร่างกาย (กิจการ และคณะ, 2543) โดยที่กลไกการป้องกันตัวโดยใช้เซลล์ของสัตว์ในกลุ่ม Crustacean ส่วนมากจะอาศัยเซลล์เม็ดเลือด (Cellular immunity) และสารในน้ำเลือด (Humoral immunity) ที่หมุนเวียนในร่างกาย ซึ่งสัตว์ในกลุ่มนี้ส่วนมากจะอาศัยอยู่ในสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลาซึ่งมีโอกาสที่สัมผัสกับเชื้อโรคอยู่เสมอ แม้ว่าสัตว์ในกลุ่มนี้จะมีการป้องกันตัวเองโดยอาศัยเปลือก สิ่งห่อหุ้มร่างกาย และสารเมือก แต่ก็มีโอกาสที่เชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมจะเข้าสู่ร่างกายได้ง่ายไม่ว่าจะเป็นการแทรกซึมเข้าทางเหงือก หรือทางปากโดยการกินเข้าไปโดยตรง ในบางครั้งอาจเป็นเชื้อที่ฉวยโอกาสในช่วงที่สภาพแวดล้อมมีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว หรือในช่วงที่มีการลอกคราบ ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งสามารถแบ่งได้ออกเป็น 2 ส่วน คือ

ระบบภูมิคุ้มกันแบบอาศัยเซลล์ (Cellular immunity)

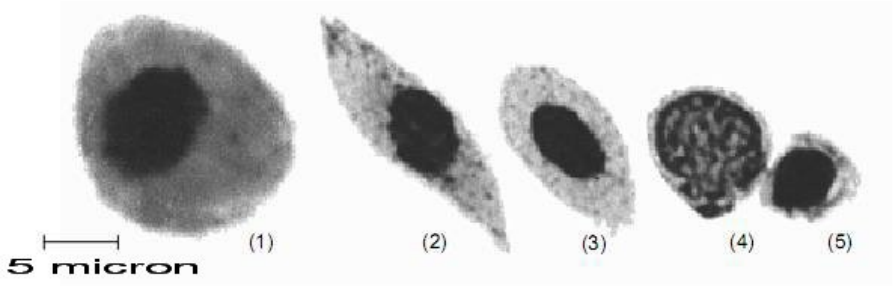
กลไกการป้องกันตัวโดยใช้เซลล์เป็นกลไกที่ใช้ในการกำจัดเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมที่พบในสิ่งมีชีวิตเกือบทุกชนิด แต่มีข้อแตกต่างตามวิวัฒนาการ ซึ่งสัตว์ในกลุ่ม Crustacean ส่วนมากมีการตอบสนองโดยอาศัยเซลล์เม็ดเลือด (Haemocyte) ที่หมุนเวียนในร่างกายเป็นศูนย์กลางการตอบสนองในระบบภูมิคุ้มกัน และสามารถจำแนกได้ 3 กลุ่ม (Soderhall and Cerenius, 1992) ดังนี้คือ

1.1 granular cell (granulocyte, large granular cell) เป็นเซลล์ที่มีรูปร่างใหญ่ ลักษณะเป็นรูปไข่ มีความยาวประมาณ 12.2-14.6 μm และความกว้าง 7.2-7.8 μm มี endoplasmic reticulum

แบบเรียบและแบบขรุขระมาก พบ granule ในเซลล์มาก มีหน้าที่ในการป้องกันสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายโดยอาศัยขบวนการ Prophenoloxidase activating system [ภาพที่ 1(1)]

1.2 semi-granular cells (semigranulocyte) มีรูปร่างเป็นรูปกระสวย มีนิวเคลียสอยู่ตรงกลางหรือที่ขอบ โดยเซลล์มีขนาดความกว้าง 4.2-6.8 µm และยาว 9.0-14.2 µm พบ endoplasmic reticulum แบบเรียบและแบบขรุขระ ภายในไซโทพลาสซึมมี granule ขนาดเล็ก พบลักษณะของเท้าเทียม มีหน้าที่ในการป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยอาศัยขบวนการ Nodule formation, encapsulation และ Prophenoloxidase activating system [ภาพที่ 1(2,3)]

1.3 hyaline cells (non-granular cells, hyalinocyte) เป็นเซลล์ที่มีขนาดเล็ก รูปร่างแบน ผิวเรียบคล้ายกระสวย มีนิวเคลียสขนาดใหญ่อยู่ตรงกลางเซลล์ บริเวณโครงสร้างที่ผิวของเซลล์ไม่พบเท้าเทียม (Pseudopodia) เซลล์มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6.4-8.3 µm รูปร่างกลมแบนไม่มี granule มีหน้าที่ทำลายสิ่งแปลกปลอมโดยใช้กระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม (Phagocytosis) [ภาพที่ 1(4,5)]



ภาพที่ 1 ลักษณะรูปร่างของเซลล์เม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ ของกุ้งได้แก่ granular cell (1) semi-granular cells (2,3) และ hyaline cells (4,5)

ที่มา: Van de Braak (2002)

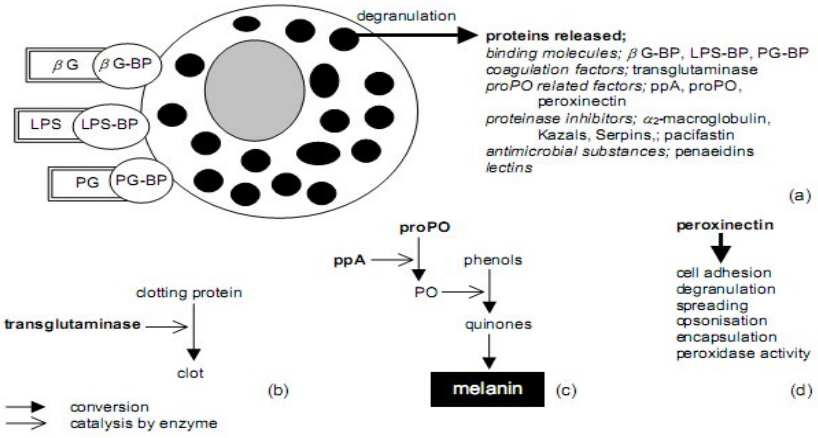
ระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยสารในน้ำเลือด (Humoral immunity)

การทำงานของระบบนี้เป็นการทำงานของหลาย ๆ ปฏิกิริยาในน้ำเลือด เช่น ขบวนการแข็งตัวของเลือด (Blood clotting, Coaglulation) โดยใช้ Clotting Protein ทำให้เกิดการตกตะกอนของเซลล์ของสิ่งแปลกปลอมได้ โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ Transglutaminase และขบวนการ Prophenoxidase เป็นการทำงานของเอนไซม์ phenoloxidase ที่ทำให้เกิดขบวนการสร้าง Melanin (Melanization) ซึ่งเป็นขบวนการห้อมล้อมเซลล์ของสิ่งแปลกปลอมเพื่อไม่ให้แพร่กระจายภายในร่างกาย รวมถึงการทำหน้าที่เป็น opsonization ให้กับเซลล์ต่าง ๆ ในขบวนต่อต้านสิ่งแปลกปลอม

กลไกการป้องกันเชื้อโรคของสัตว์ในกลุ่ม Crustacean

Pattern Recognition Proteins

ในขั้นตอนการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง จะพบว่า มีกลุ่มของโปรตีนที่เรียกว่า Pattern Recognition Proteins (PRPs) ซึ่งเป็นสารที่ช่วยในการจดจำรูปแบบของสิ่งแปลกปลอม สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังส่วนใหญ่สามารถใช้ PRPs ในการจดจำส่วนของโครงสร้างผนังเซลล์ และส่วนประกอบของเซลล์ (Soderhall *et al*., 1996) ซึ่งได้แก่ คาร์โบไฮเดรตที่เป็นส่วนประกอบของจุลชีพ คือ Lipopolysaccharides (LPS), peptidoglycans (PG) จากแบคทีเรีย β-1, 3-glucans จากยีสต์และรา (Vargas-Albores *et al*., 1996; 1997) และยังมีสารที่ทำหน้าที่แยกระหว่าง self และ non-self คือ Agglutinin หรือ Lectin ซึ่งเป็นโปรตีนที่สามารถเชื่อมระหว่างคาร์โบไฮเดรตที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์และหลังจาก PRPs จับกับสิ่งแปลกปลอมแล้วจะเกิดกระบวนการต่าง ๆ ในระบบภูมิคุ้มกันทั้งระบบตามมา (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 การทำงานของระบบภูมิคุ้มกันหลังการเข้าจับของ PRPs (a) จะเกิดกระบวนการต่อเนื่องที่เกิดจากการปล่อย granule ของเซลล์เม็ดเลือดได้แก่ ขบวนการแข็งตัวของเลือด (b) ขบวนการ Prophenoloxidase system (proPO) (c) และ Peroxinectin ซึ่งจะเกิดขบวนการตามมาหลายขบวนการ เช่น Opsonisation, Encapsulation และ Degranulation (d)

ที่มา: ดัดแปลงจาก Van de Braak (2002)

กลไกการแข็งตัวของเลือด (Coaglulation, Blood clotting)

การแข็งตัวของเลือดเป็นกลไกที่สำคัญในระบบการป้องกันสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย ทั้งในสัตว์มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลัง เพื่อป้องกันการสูญเสียเลือดในกรณีที่ร่างกายเกิดบาดแผล โดยอาศัยเอนไซม์ Transglutaminase (TGase) และ Clottable protein ซึ่งมี Ca^{2+} เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาบริเวณที่เกิดบาดแผล ทำให้เกิดโครงข่ายของโปรตีน คล้ายเจล บริเวณบาดแผลเพื่อป้องกันสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกาย (Kopacek *et al*., 1993; Yeh *et al*., 1998)

กระบวนการที่เกิดขึ้นจะอาศัยการทำงานของเม็ดเลือดชนิด granulocyte ซึ่งจะปล่อย สารที่พบใน granule ออกมาสู่กระแสเลือดเมื่อมีสิ่งแปลกปลอมมากระตุ้นในรูปเอนไซม์ที่เป็น non active ซึ่งเมื่อได้รับการกระตุ้นจากการสัมผัสผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมบวกและลบ เอนไซม์จะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูป active เพื่อไปกระตุ้น proclotting enzyme ให้เปลี่ยนเป็น clotting enzyme ที่มีคุณสมบัติในการเปลี่ยนโปรตีน coagulogen ที่อยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้ให้อยู่ในรูป coagulin ที่มีลักษณะคล้ายเจล ที่สามารถทำให้เกิดการแข็งตัวของเลือดได้ (Kawabata *et al*., 1996)

การกลืนกินและทำลายสิ่งแปลกปลอม (Phagocytosis)

ขบวนการ Phagocytosis เป็นกลไกการตอบสนองต่อเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอม ซึ่งเป็นระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (non specific immune response) พบในสิ่งมีชีวิตเกือบทุกชนิดแต่แตกต่างกันออกไปตามวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต โดยทำงานร่วมกับโปรตีน peroxinectin ในน้ำเลือด ทำให้เกิดการเกาะติดระหว่างเซลล์เม็ดเลือดและสิ่งแปลกปลอม (Soderhall and Cerenius, 1992)

กลไกการทำงานของขบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมจะเริ่มขึ้นเมื่อมีการรับรู้การเข้ามาของสิ่งแปลกปลอม และเคลื่อนที่เข้าหาสิ่งแปลกปลอมนั้น ซึ่งจะทำงานร่วมกับโปรตีนชนิด peroxinectin ที่ทำหน้าที่เป็น opsonin ให้กับเซลล์เม็ดเลือด หลังจากนั้นเม็ดเลือดจะนำสิ่งแปลกปลอมนั้นเข้าไปในเซลล์ เกิดเป็น Phagosome อยู่บริเวณ cytoplasm ซึ่งจะมีเอนไซม์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการทำลายและย่อยเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอม อาทิเช่น เอนไซม์ DNAases, lipases, RNAases, phosphatases และ proteases นอกจากเอนไซม์ที่ใช้ย่อยที่กล่าวข้างต้นแล้ว ยังมีขบวนการ Respiratory burst ที่สร้าง Toxic peroxide ชนิดต่าง ๆ เพื่อใช้ในการฆ่าและย่อยสลายเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมซึ่งเกิดขึ้นบริเวณผิวเซลล์และบริเวณ Phagolysosome ขบวนการจะเริ่มต้นขึ้นเมื่อเซลล์มีการรับรู้การเข้ามาของสิ่งแปลกปลอมและทำงานร่วมกับโปรตีน Peroxinectin ซึ่งทำหน้าที่จับกับเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอม จากนั้นจะมีการดึงเอาออกซิเจนเข้าสู่เซลล์อย่างรวดเร็ว หลังจากนั้นออกซิเจนจะถูกรีดิวส์เป็น superoxide anion (O_2^-) โดยอาศัยเอนไซม์ NADPH oxidase และได้สารอนุมูลอิสระที่เกิดจากเมตาบอไลต์ของออกซิเจนซึ่งมีอยู่หลายชนิดแต่เรียกรวม ๆ ว่า Reactive Oxygen Intermediates (ROIs) เช่น superoxide anion (O_2^-), Hydrogenperoxide (H_2O_2), Hydroxyl radical (OH^-) และ singlet oxygen (O_2^{-1}) (Holmblad and Soderhall, 1999)

Nodule formation และ encapsulation

กระบวนการ nodule formation และ encapsulation เป็นการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมที่มีขนาดใหญ่กว่าเชื้อแบคทีเรีย โดยการล้อมตัวของสิ่งแปลกปลอมเอาไว้ การตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมที่มีขนาดใหญ่จะอาศัยกระบวนการ encapsulation และสิ่งแปลกปลอมที่มีจำนวนมากจะอาศัยกระบวนการ nodule formation โดยในกระบวนการเกิด nodule formation จะเกิดการรวมตัวของเซลล์เม็ดเลือด เพื่อที่จะโอบล้อมสิ่งแปลกปลอมไม่ให้กระจายหรือเคลื่อนที่ไปใน

ร่างกาย และมักพบการเกิดขบวนการสร้าง melanin ดำเนินต่อไป โดยการทำงานของปฏิกิริยาเอนไซม์ phenoloxidase ส่วนกระบวนการ encapsulation เป็นกระบวนการที่คล้ายกับการเกิดขบวนการ nodule formation แต่จะเกิดขึ้นกับสิ่งแปลกปลอมที่มีขนาดใหญ่มากกว่า 10 μm เช่น เชื้อรา ไข่และตัวอ่อนของปรสิต หนอนตัวกลม ซึ่งเซลล์เม็ดเลือดไม่สามารถใช้กระบวนการ Phagocytosis ในการทำลายได้ (Soderhall and Cerenius, 1992)

การป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยระบบ Prophenoloxidase system (proPO)

ระบบ prophenoloxidase เป็นระบบการทำลายสิ่งแปลกปลอมโดยการทำงานของเอนไซม์ phenoloxidase ซึ่งเป็นกลไกการป้องกันตัวของสัตว์ในกลุ่ม crustacean โดยมี β-1, 3 glucan, Lipopolysaccharide และ Peptidoglycan ซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ยีสต์และแบคทีเรีย เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยา ซึ่งสามารถควบคุมการกระจายของสิ่งแปลกปลอมในร่างกาย โดยการทำงานของระบบนี้จะเริ่มจากร่างกายจะรับรู้หรือถูกกระตุ้นว่ามีสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกาย โปรเอนไซม์ (Pro-enzyme) ที่เรียกว่า prophenoloxidase (pro PO) ซึ่งสามารถพบได้ใน granule ของเซลล์เม็ดเลือดชนิด semi granulocyte และ granulocyte จะถูกหลั่งออกจากเซลล์ (degranulate) มาทำปฏิกิริยากับ prophenoloxidase activating enzyme (ppA) ซึ่งเป็นเอนไซม์กลุ่ม serine protease เปลี่ยน pro PO เป็นเอนไซม์ Phenoloxidase ซึ่งจะออกซิไดซ์สารในกลุ่ม Phenol ให้เป็นสารประกอบ Quinone และเปลี่ยนไปเป็น melanin ในที่สุด ซึ่ง melanin จะห้อมล้อมสิ่งแปลกปลอมเอาไว้ไม่ให้แพร่กระจายหรือเคลื่อนที่ได้ในร่างกายได้ (Soderhall *et al*., 1996; Soderhall and Cerenius, 1992)

Schizochytrium limacinum

S. limacinum เป็นสิ่งมีชีวิตในกลุ่ม Thraustochytrids พบแพร่กระจายตามนิเวศป่าชายเลน ซึ่งเป็นแหล่งอาหารของสัตว์น้ำวัยอ่อนชนิดต่าง ๆ ในปัจจุบัน *S. limacinum* เป็นที่สนใจของนักวิจัยด้านการเพาะเลี้ยงและอนุบาลสัตว์น้ำ เนื่องจากสิ่งมีชีวิตชนิดนี้มีความพิเศษ คือ สามารถสร้างกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงสายยาว (Poly Unsaturated Fatty Acid: PUFA) ในกลุ่มโอเมก้า-3 คือ Eicosapentaenoic acid (EPA; 20:5) และ Docosahexaenoic acid (DHA; 22:6) ซึ่งจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตเนื่องจากไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นเองได้ อีกทั้งยังสามารถเป็นแหล่งพลังงานสำหรับการเจริญเติบโตด้วย

อนุกรมวิธานของ *Schizochytrium limacinum*

ในส่วนของการศึกษาทางด้านอนุกรมวิธานมีรายงานการศึกษาอนุกรมวิธานของ *S. limacinum*ไว้ ดังนี้ Sparrow (1943) จัด *S. limacinum*ให้อยู่ใน Phylum Oomycetes ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตจำพวกรา เนื่องจากมีรูปร่างลักษณะ รวมถึงการสืบพันธุ์คล้ายรา เช่น มี Thallus แบบ monocentric และมีการสืบพันธุ์โดยการแบ่งตัวแบบ biflagellate zoospore ต่อมา Olive (1975) ได้ย้าย *S. limacinum* ที่อยู่ใน order Thraustochytriaceae ออกจาก phylum Oomycetes เข้าไปอยู่ใน subphylum Labyrinthulina ตามองค์ประกอบทางเคมีภายในเซลล์ องค์ประกอบของผนังเซลล์ และลักษณะโครงสร้างของ ectoplasmic net element (Darley and Fuller, 1970) ซึ่ง subphylum Labyrinthulina ภายหลังมีการจำแนกให้อยู่ใน Class Labyrinthulomycetes (Moss, 1991) หลังจากนั้น Honda *et al*. (1998) ได้ลำดับอนุกรมวิธานของ *S. limacinum* อีก โดยใช้ความแตกต่างจากลักษณะสปอร์ ขนาดของ zoosporangia จำนวนของ zoospore ภายใน sporangia โครงสร้างและส่วนประกอบของเซลล์ ต่อมา Honda *et al*. (1999) จัดอนุกรมวิธานของสิ่งมีชีวิตชนิดนี้อีกครั้งโดยการใช้ 18s Ribosomal RNA gene เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตชนิดนี้ได้ดังนี้

Superkingdom Eucaryota
Kingdom Stramenopila
Phylum Labyrinthulomycota
Order Labyrinthulida
Family Thraustochytriidae
Genus *Schizochytrium*

Species: *Schizochytrium limacinum* (Honda *et al*., 1999)

ชีววิทยาของ *Schizochytrium limacinum*

S. limacinum มาจากรากศัพท์ภาษาลาตินคำว่า limacine ที่แปลว่า slug-like คือ ทากที่กินใบไม้เป็นอาหารซึ่งคล้ายกับสิ่งมีชีวิตในกลุ่มนี้ที่มีช่วงของวงจรชีวิตที่มีลักษณะเป็น limaciform amoeboid cells ที่ถูกปล่อยออกจาก vegetative cell คือ สามารถเคลื่อนที่ได้ช้า ๆ และกิน

สารอินทรีย์จากการย่อยสลายใบไม้ที่ทับถมกัน ซึ่งทำหน้าที่เป็นผู้ย่อยสลายในธรรมชาติ สามารถเจริญเติบโตได้ในช่วงความเค็มที่กว้าง คือ ตั้งแต่ 0-30 ppt เซลล์ของ *S. limacinum* มีลักษณะเป็นเซลล์กลมมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 7-15 μm และมีขนาดมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 12-24 μm เมื่อรวม ectoplasmic net element ที่ยื่นยาวเกาะกับใบไม้หรือแหล่งของสารอินทรีย์ เพื่อดูดซึมสารอินทรีย์เหล่านี้เป็นอาหาร ในส่วนการสืบพันธุ์ของ *S. limacinum* เป็นการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual reproduction) Thallus จะเจริญไปเป็น sporangium ซึ่ง sporangium จะมีการแบ่งครึ่งแบบทวีคูณ (successive binary division) จำนวน 4-5 ครั้ง โดยแต่ละเซลล์จะผลิต zoospore ได้ 16-64 เซลล์ ซึ่งพบว่าบางเซลล์มีลักษณะเป็น amoeboid cell ซึ่งจะมีลักษณะรูปร่างเซลล์ยาวขึ้น zoospore มีรูปร่างรีเกือบกลมมี flagella ทำหน้าที่ในการเคลื่อนที่ และยึดเกาะ (Honda *et al*, 1998) โดยที่สิ่งมีชีวิตนี้ชนิดนี้สามารถสร้างกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงในกลุ่มโอเมก้า-3 ได้มากถึง 33-37.5% ของปริมาณกรดไขมันทั้งหมดภายในเซลล์ (Song *et al*., 2007)

คุณค่าทางโภชนะของ *S. limacinum*

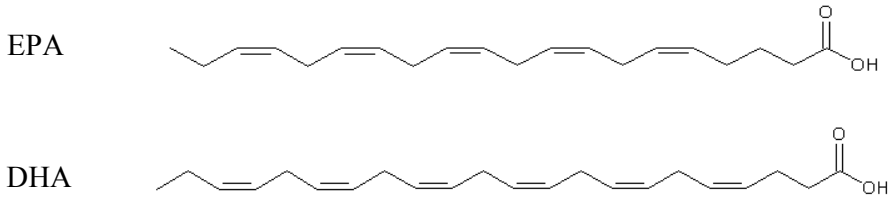
S. limacinum มีโภชนะที่สำคัญหลายประการ คือโปรตีน 32.99% ไขมันรวม 30.18% คาร์โบไฮเดรต 7.78% (Yongmanitchai *et al*., 2007) องค์ประกอบทางเคมีของ *S. limacinum* มีความชื้น น้ำมัน โปรตีน เถ้า คาร์โบไฮเดรต และเยื่อใย ซึ่งจะขึ้นอยู่กับสัดส่วนปริมาณอาหารที่ใช้เลี้ยงแต่องค์ประกอบเหล่านี้ไม่แตกต่างกันมากนัก *S. limacinum* ที่ใช้นี้มีปริมาณของโปรตีนประมาณ 32% และไขมันประมาณ 30.18% องค์ประกอบของกรดไขมันใน *S. limacinum* ประกอบด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัวจำพวก DHA (22:6) ประมาณ 30.3-36.1% และ EPA (20:5) ประมาณ 6.02-8.01% ของปริมาณกรดไขมันทั้งหมดภายในเซลล์ (Kamlangdee and Fan, 2003)

กรดไขมันและผลที่มีต่อสัตว์น้ำ

กรดไขมัน (fatty acid) เป็นสารอินทรีย์ที่จัดอยู่ในพวก lipid ซึ่งส่วนใหญ่แล้ว lipid ประกอบไปด้วยกรดไขมันและอนุพันธุ์ของไขมัน โมเลกุลของกรดไขมันจัดเป็นพวก carboxylic acid, -COOH โดยปกติจะมีคาร์บอนอะตอมเป็นเลขคู่อยู่ระหว่าง 14-24 อะตอม ซึ่งปกติจะพบคาร์บอนตั้งแต่ 16-18 อะตอมในธรรมชาติ โดยมากกรดไขมันจะเป็นสายยาวไม่มีการแตกกิ่งก้าน ซึ่งคุณสมบัติของกรดไขมันขึ้นอยู่กับความยาวของสายไฮโดรคาร์บอนหรือจำนวนอะตอม และจำนวนพันธะคู่ในสายคาร์บอนโดยเรียงตัวในลักษณะไอโซเมอร์แบบซิส (cis-configuration)

กรดไขมันโอเมก้า-3 จัดอยู่ในประเภทไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน หมายถึง กรดไขมันที่มีธาตุคาร์บอนต่อกันด้วยพันธะคู่ (Double bond) อยู่หลายตำแหน่ง และเรียงตัวในลักษณะไอโซเมอร์แบบซิส ซึ่งกรดไขมันในตระกูลโอเมก้า-3 เป็นกรดไขมันที่มีตำแหน่งพันธะคู่ตำแหน่งแรกอยู่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 โดยนับจากปลายด้านเมธิลในสายไฮโดรคาร์บอนของกรดไขมันนั้น (ภาพที่ 3)

กรดไขมันไม่อิ่มตัวในกลุ่มโอเมก้า-3 ที่สำคัญมีหลายชนิด คือ Eicosapenteanoic acid (EPA) และ Docosahexaenoic acid (DHA) ซึ่งทั้ง DHA และ EPA สร้างมาจากกรด linolenic acid กรดไขมัน EPA เป็นกรดไขมันที่มีคาร์บอนอะตอม 20 อะตอมและมีพันธะคู่ 5 พันธะที่ตำแหน่ง 5, 8, 11, 14 และ 17 โดยนับจากปลายด้านคาร์บอกซิล และอยู่ตำแหน่งที่ 3 เมื่อนับจากปลายด้านเมธิล ส่วน DHA จะมีคาร์บอน 22 อะตอม และมีพันธะคู่ 6 พันธะ ที่ตำแหน่ง 4, 7, 10, 13, 16 และ19 เมื่อนับจากด้านคาร์บอกซิลและอยู่ตำแหน่งที่ 3 เมื่อนับจากปลายด้านเมธิล



ภาพที่ 3 โครงสร้างของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงในกลุ่มโอเมก้า-3 คือ Eicosapenteanoic acid (EPA; 20:5) และ Docosahexaenoic acid (DHA; 22:6)

Eicosapentaenoic acid และ Docosahexaenoic acid เป็นกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า-3 ที่มีความสำคัญในสัตว์มากเนื่องจากไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นเองได้ ต้องได้รับจากอาหารเท่านั้น ซึ่งถ้าขาดหรือได้รับจากอาหารน้อย จะมีอัตราการเจริญเติบโตช้า เบื่ออาหาร ซึ่งกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงเหล่านี้เป็นกรดไขมันที่จำเป็นต่อระบบเมตาบอลิซึม การดำรงชีพ การเจริญเติบโต รวมถึงการอยู่รอดของสัตว์น้ำวัยอ่อนด้วย ซึ่งแหล่งที่พบกรดไขมันในกลุ่มโอเมก้า-3 นี้ คือ ในปลาทะเลเขตน้ำเย็น น้ำมันจากสัตว์ทะเล สาหร่ายทะเล (micro algae) หรือแพลงก์ตอนพืช (Phytoplankton) และเมล็ดพันธุ์พืชต่าง ๆ เช่น เมล็ดฝ้าย (Flax seed) และ ผลวอลนัท (Walnut)

การศึกษาความสำคัญของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงและผลที่มีต่อสัตว์น้ำ

เวียง (2542) รายงานว่า สัตว์น้ำต้องได้รับกรดไขมันที่จำเป็น (Essential fatty acid) เพื่อใช้ในการสร้างฟอสโฟไลปิดที่เยื่อหุ้มเซลล์เพื่อเพิ่มความยืดหยุ่นของผนังเซลล์และควบคุมการผ่านเข้าออกของน้ำและสารต่าง ๆ สารอาหารประเภทไขมัน ฟอสโฟไลปิด จากกรดไขมันที่มีความไม่อิ่มตัวสูง (HUFA) จะมีความยืดหยุ่นและควบคุมการซึมผ่านของแร่ธาตุ ได้ดีกว่าฟอสโฟไลปิดจากกรดไขมันที่มีความอิ่มตัว สัตว์น้ำจืดทั้งในเขตร้อนและเขตหนาว มีความต้องการกรดไขมันในอาหารประมาณ 1-2% และในปลาน้ำเค็มมีความต้องการกรดไขมันต่างกันตั้งแต่ 0.5-2%

Stanley-Samuelson and Dadd (1983) พบว่า กรดไขมันไม่อิ่มตัวเป็นสารตั้งต้นของสารประกอบ Eicosanoids ซึ่งเป็นสาร modified fatty acid มีหลายชนิดคือ Prostaglandins, Leukotrienes และ Thromboxanes ซึ่งสารเหล่านี้มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาระบบสืบพันธุ์ และขบวนการที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ในกลุ่ม crustacean ด้วย

จากการศึกษาของ Palacios *et al.* (2004) พบว่า HUFA ในกลุ่มโอเมก้า-3 ได้แก่พวก EPA และ DHA ซึ่งเป็นกรดไขมันที่จำเป็น และมีผลต่อพัฒนาการ การอยู่รอดของลูกกุ้งขาวแวนนาไม และยังมีความสำคัญต่อการสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ (Cell membrane) โดยเฉพาะบริเวณเหงือกซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับขบวนการรักษาสมดุลของเกลือแร่ (Osmoregulation) โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ Na^{+}/K^{+}ATPase และ Carbonic anhydrase ซึ่งจากการทดสอบความทนทานต่อสภาพเครียดโดยการลดความเค็มอย่างเฉียบพลัน (salinity stress test) พบว่า ลูกกุ้งที่ได้รับ HUFA มีอัตราการตายสะสมน้อยกว่าลูกกุ้งที่ไม่ได้รับ HUFA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งให้ผลการทดลองคล้ายกับการศึกษาของ Kiron *et al.* (1993) ซึ่งรายงานไว้ว่า HUFA สามารถส่งเสริมการทำงานของผนังเซลล์ในสัตว์น้ำในขบวนการควบคุมการผ่านเข้าออกของน้ำ และกระตุ้นการทำงานของเม็ดเลือดขาวในขบวนการป้องกันสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายให้ทำงานดีขึ้น เช่น ขบวนการ Phagocytosis

Pruitt (1990) ทำการศึกษาเกี่ยวกับระบบ Osmoregulation ของสัตว์ในตระกูล crustacean พบว่าเมื่อภาวะที่อุณหภูมิลดลงจะส่งผลให้การทำงานของระบบนี้ทำงานด้อยลง และเมื่อเสริมอาหารด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงจำพวก HUFA พบว่าสัตว์ทดลองสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนไปได้ดีขึ้น โดยการลดขบวนการผ่านเข้าออกของสารและของเหลวภายในเซลล์

Chim *et al.* (2001) รายงานการทดสอบผลของการเสริมอาหารด้วย HUFA ในกุ้ง *Penaeus stylirostris* ต่อการทนทานต่อความเครียดและระบบภูมิคุ้มกันพบว่า การเสริมอาหารด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงจำพวก HUFA สามารถเพิ่มความทนทานต่อสภาพเครียดจากการทดสอบ Osmotic stress test และยิ่งไปกว่านั้นยังสามารถเพิ่มความต้านทานต่อเชื้อก่อโรคโดยจะส่งเสริมขบวนการ agglutination ของน้ำเลือดและขบวนการ Phagocytosis ของเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งให้ดีขึ้น

การใช้กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงจากแหล่งต่าง ๆ ในการอนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อน

กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (HUFA) เป็นกรดไขมันที่มีความสำคัญหลายประการต่อสัตว์น้ำ ในด้านการเจริญเติบโต การอยู่รอด การสืบพันธุ์ ตลอดจนสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ อีกทั้งยังเป็นสารตั้งต้น (Precursor) ของสารที่ทำหน้าที่คล้ายฮอร์โมนหลายชนิดที่เกี่ยวกับขบวนการเมตาบอลิซึม เช่น Prostaglandin, Thromboxanes และ Leucotrienes (Marcus, 1984) ซึ่งในปัจจุบันมีการเสริมกรดไขมันไม่อิ่มตัวให้สัตว์น้ำวัยอ่อนด้วยวิธีต่าง ๆ เพื่อเพิ่มอัตรารอด พัฒนาการและความแข็งแรง

ปกป้อง และนนทวิทย์ (2542) ทดลองอนุบาลลูกกุ้งกุลาดำระยะ Postlarva 10 ด้วยการเสริมกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (HUFA)ในอัตราส่วนของ EPA และ DHA ต่างกัน 3 ระดับ คือ 1:1 (กลุ่มที่ 1), 1:2 (กลุ่มที่ 2) และ 1:5 (กลุ่มที่ 3)โดยผ่านทาง *Artemia* จนถึงระยะ Postlarva 15 และนำมาทดสอบความทนทานต่อความเครียดบางประการพบว่า การทดสอบค่า LC_{50} ที่ 24 ชม.ของแอมโมเนีย (TAN) ของกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ 1, 2 และ 3 มีค่าดังนี้ 50, 56, 53 และ 53.50 ppm ตามลำดับ การทดสอบความทนทานต่อสภาพที่ไม่มีออกซิเจน พบว่า ลูกกุ้งในกลุ่มที่ได้รับ HUFA ทุกกลุ่มมีการตายน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) การทดสอบความทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงความเค็มอย่างเฉียบพลันจาก 30 ppt เป็น 0 ppt พบว่า ลูกกุ้งที่ได้รับ HUFA ที่อัตราส่วน EPA:DHA เท่ากับ 1:1 และ 1:2 มีอัตราการตายต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ในส่วนของการทดสอบความทนทานต่อความเครียดโดยการแช่ฟอร์มาลิน 200 ppm และความทนทานต่อเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ไม่พบความแตกต่างของอัตราการตายในทุกชุดการทดลอง ซึ่งผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเสริม HUFA มีผลทำให้ลูกกุ้งมีความทนทานต่อสภาพเครียดบางประการมากขึ้น แต่ไม่มีผลเมื่อทดสอบกับฟอร์มาลิน 200 ppm และความต้านทานต่อเชื้อ *V. parahaemolyticus*

Barclay and Zeller (1996) ได้ทำการทดลองเกี่ยวกับวิธีการเสริมกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงในกลุ่ม HUFA เพื่ออนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อน โดยใช้ *S. limacinum* ในรูปแบบ spray-dried โดยวิธีการผ่านทาง *Artemia* ที่ความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าจากการวิเคราะห์จากน้ำหนักแห้ง มี DHA เพิ่มขึ้น 0.8% และ EPA เพิ่มขึ้น 0.4% ซึ่งจากผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าการการเพิ่มปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวผ่าน *Artemia* โดยใช้ *S. limacinum* สามารถนำพากรดไขมันได้ดีจากการวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันทั้งหมดภายในตัว *Artemia* และเหมาะสำหรับนำไปอนุบาลสัตว์วัยอ่อนได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Song *et al*. (2007) ทำการทดลองหาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเสริมกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงโดยใช้ *S. limacinum* สายพันธุ์ OUC88 ในรูปผงแห้ง ผ่านทาง *Artemia* และ Rotifer โดยการแช่ *Artemia*ใน *S. limacinum* ที่มีความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และแช่ Rotiferโดยใช้ *S. limacinum* ความเข้มข้น 80 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้ *Artemia* และ Rotifer ที่ความหนาแน่นที่ 100 ตัวต่อมิลลิลิตร และใช้เวลาในการแช่ดังนี้ คือ 3, 6, 9, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดแล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันทั้งหมดภายในตัว โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ใช้ *Artemia* และ Rotifer แช่ในยีสต์ ซึ่งพบว่า เวลาในการแช่ *Artemia* และ Rotifer ที่เหมาะสมและได้ปริมาณ DHA สูงที่สุด คือ ที่ 12 ชั่วโมง โดยใน *Artemia* พบ DHA 13.4% และใน Rotifer พบ 10.9% จากปริมาณกรดไขมันทั้งหมดซึ่งสูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ DHA มีค่าน้อยมากจนไม่สามารถหาค่าได้ จากนั้นนำ *Artemia* และ Rotifer ที่ผ่านการเสริม *S. limacinum* แล้ว มาอนุบาลลูกปลา Turbot (*Scophthalmus maximus*) และประเมินประสิทธิภาพในการอนุบาลสัตว์น้ำ พบว่าสามารถลดภาวะ Pseudoalbinism ของลูกปลา Turbot ได้ประมาณ 40% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

Boeing (1997) ทดลองใช้ *S. limacinum* แบบ spray-dried (ผลิตภัณฑ์ของ Aquafauna Bio-Marine) เพื่อทดแทนการให้แพลงก์ตอนพืชแบบปกติที่ใช้ คือ *Tetraselmis suecica* และ *Chaetoceros sp*. ในการเลี้ยงหอยกาบ (*Tapes semidecussata*) และหอยนางรม (*Crassostrea gigus*) พบว่า *S. limacinum* มีประสิทธิภาพในการทดแทนการใช้แพลงก์ตอนพืชแบบปกติได้ถึง 40% โดยไม่ทำให้อัตราการรอด และอัตราการเจริญเติบโตลดลง

Langdon and Ebru (1999) ทดลองการเลี้ยงหอยกะพงเมดิเตอเรเนียน (*Mytilus galloprovincialis*) โดยให้ *S. limacinum* ในรูปแบบสารละลาย (suspension) เพื่อทดแทนการให้แพลงก์ตอนพืชแบบปกติซึ่งปัจจุบันนิยมใช้ไดอะตอมพวก *Isochrysis galbana* และ *Chaetoceros*

calcitrans โดยพบว่า *S. limacinum* สามารถทดแทนได้ถึง 80% ของแพลงก์ตอนพืชที่ให้แบบปกติ ซึ่งให้ผลการทดลองไม่แตกต่างกับการให้แพลงก์ตอนพืชแบบปกติ

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*, Boone) น้ำหนักประมาณ 10 -15 กรัม จากฟาร์มเอกชน
2. ลูกกุ้งขาวระยะนอเพลียส (nauplius) จากฟาร์มเอกชน
3. *Schizochytrium limacinum* แบบน้ำ (suspension) ความเข้มข้น 10^8 cell/ml และแบบอบแห้ง (freeze-dry)

ตู้กระจกขนาด 40 ลิตร

4. อุปกรณ์ให้อากาศ
5. อุปกรณ์สำหรับคลุมตู้ และบ่อ
1. บ่อซีเมนต์ขนาด 1.5 x 1.5 เมตร
2. น้ำเค็มสำหรับใช้เลี้ยงและอนุบาลลูกกุ้งขาวแวนนาไม
3. ไดอะตอมชนิด *Chaetocesros calcitrans* ที่เลี้ยงด้วยปุ๋ยสูตร Conway
4. ไข่ *Artemia* (Cyst)
5. อาหารกุ้งสำเร็จรูปและน้ำมันปลาหมึก
6. เครื่องชั่งทศนิยม 2 และ 3 ตำแหน่ง
7. สารเคมีที่ใช้ในการทำความสะอาดอุปกรณ์ ตู้ และบ่อทดลอง
8. กล้องจุลทรรศน์
9. Salino-refractometer
10. Haemacytometer
11. แบคทีเรีย *Vibrio harveyi* AQVH001 จากห้องปฏิบัติการสุขภาพสัตว์น้ำ
12. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ Tryptic soy agar (TSA), Thiosulphate citrate bile salt sucrose agar (TCBS) และ Tryptic soy broth (TSB)
13. อุปกรณ์ในการเขี่ยเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ ตะเกียงแอลกอฮอล์ เข็มเขี่ยเชื้อ และแท่งแก้วสามเหลี่ยม
14. ฟอร์มาลิน (Formalin, 37% formaldehyde)
15. Heamacytometer
16. กระบอกฉีดยาขนาด 3 มิลลิลิตรและเข็มฉีดยาขนาด 24 G x1.0 นิ้ว

17. Microcentrifuge tube

18. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge)

19. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)

20. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave)

21. สารเคมีในการวิเคราะห์ระบบภูมิคุ้มกัน

22. เครื่องผสมสาร (Vortex mixer)

23. เครื่องเขย่าชนิดควบคุม (Psychrotherm controlled)

24. สีย้อม Wright and Giemsa

25. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพน้ำ ได้แก่แอมโมเนีย ไนไตรท์ ความเป็นกรดด่าง และปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ

26. เครื่องแก้วสำหรับทดลอง (หลอดทดลอง จานแก้ว บีกเกอร์ แท่งแก้วสามเหลี่ยม และจานเพาะเชื้อ)

วิธีการ

1. ศึกษาอัตรารอดและอัตราการเจริญเติบโตของลูกกุ้งขาวหลังการให้ *Schizochytrium limacinum* โดยการทดแทนและเสริม *Chaetoceros* sp.

1.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง

ในการทดลองใช้ลูกกุ้งขาวระยะ Nauplius 4 จากฟาร์มเอกชนในจังหวัดสมุทรสงคราม นำลูกกุ้งมาปรับสภาพก่อนทำการทดลอง โดยทดลองในตู้ทดลองขนาด 40 ลิตร จำนวน 12 ตู้ ความหนาแน่น 100 ตัวต่อลิตร ใช้น้ำความเค็ม 30 ppt ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยคลอรีน ให้อากาศตลอดเวลา คลุมตู้ทดลองด้วยพลาสติกสีดำเพื่อพรางแสงและควบคุมอุณหภูมิ ให้ลูกกุ้งปรับสภาพและเข้าสู่ระยะ Zoea 1 จึงเริ่มให้อาหารทดลอง

1.2 การเตรียมอาหารทดลองและการให้อาหาร

เลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ของ *Chaetoceros* sp.ในขวดเลี้ยงแพลงก์ตอนขนาด 1 ลิตร ในน้ำที่มีความเค็ม 30 ppt ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยใช้อาหารเลี้ยงแพลงก์ตอนสูตร Conwey ให้แสงสว่าง

จากหลอดฟลูออเรสเซนต์ 2,500 – 3,000 ลักซ์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน เลี้ยงในขวดเลี้ยงแพลงก์ตอนจนกระทั่ง *Chaetoceros* sp. มีความหนาแน่น 1-5 x10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตรจึงนำไปอนุบาลลูกกุ้ง

S. limacinum ที่ใช้ในการทดลองนี้แยกได้จากป่าชายเลน อำเภอท่าหลวง จังหวัดภูเก็ต ด้วยวิธี baiting technique หลังจากนั้นนำเชื้อบริสุทธิ์ของ *S. limacinum* มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ GPY medium (7.5% glucose, 0.5% peptone, 0.5% yeast extract, 0.25% soybean meal และ 0.75% NaCl) เขย่าด้วยเครื่อง rotary shaker 140 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน (Yongmanitchai *et al*., 2007) หลังจากนั้นนำไปพาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่อง Centrifuge 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกอาหารเลี้ยงเชื้อออก แล้วล้างด้วย 0.85% normal saline 3 ครั้ง ก่อนนำไปใช้เป็นอาหารทดลอง ส่วน*Artemia* ที่ใช้เป็น *Artemia* แรกฟักในระยะ Instar 1 แยกเปลือกไข่ออกและล้างน้ำจืด 3 ครั้งก่อนนำไปอนุบาลลูกกุ้ง

ในการทดลองใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) โดยแบ่งเป็น 4 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ ดังนี้

<u>ชุดการทดลองที่ 1</u> (ชุดควบคุม) ให้ *Chaetoceros* sp. 100% ในระยะ Zoea 1 ถึงระยะ Zoea 3 และให้ *Artemia* ตั้งแต่ระยะ Mysis 1 ถึงระยะ Postlarva 15

<u>ชุดการทดลองที่ 2</u> ให้ *Chaetoceros* sp. และ *S. limacinum* อัตราส่วน 50%:50% ในระยะ Zoea 1 ถึงระยะ Zoea 3 และให้ *Artemia* ตั้งแต่ระยะ Mysis 1 ถึงระยะ Postlarva 15

<u>ชุดการทดลองที่ 3</u> ให้ *Chaetoceros* sp. และ *S. limacinum* อัตราส่วน 75%:25% ในระยะ Zoea 1 ถึงระยะ Zoea 3 และให้ *Artemia* ตั้งแต่ระยะ Mysis 1 ถึงระยะ Postlarva 15

<u>ชุดการทดลองที่ 4</u> ให้ *Chaetoceros* sp. 100% และเสริมด้วย *S. limacinum* 25% ในระยะ Zoea 1 ถึงระยะ Zoea 3 และให้ *Artemia* ตั้งแต่ระยะ Mysis 1 ถึงระยะ Postlarva 15

เริ่มให้อาหารทดลองเมื่อกุ้งเข้าสู่ระยะ Zoea 1 โดยเติม *S. limacinum* และ *Chaetoceros* sp.ให้ได้ปริมาณ 3–5 x10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในระยะ Zoea 1 และ 5–8 x10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตรในระยะ Zoea 2 ถึง Zoea 3 และเปลี่ยนเป็น *Artemia* เมื่อกุ้งเข้าสู่ระยะ Mysis 1- Postlarva 1 ในปริมาณ

3–5 ตัวต่อมิลลิลิตร และระยะ Postlarva 1- Postlarva 15 ในปริมาณ 5–8 ตัวต่อมิลลิลิตร จนกระทั่งลูกกุ้งเข้าสู่ระยะ Postlarva 15 (ประจวบ, 2530) ตรวจสอบปริมาณอาหารทุก ๆ 8 ชั่วโมง ซึ่งระหว่างการทดลองจะเปลี่ยนน้ำ 20-30% ทุกวัน เมื่อกุ้งเข้าสู่ระยะ Mysis 1 และตรวจวัดคุณภาพน้ำบางประการทุกวันได้แก่ อุณหภูมิ ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (dissolved oxygen) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ปริมาณไนไตรท์ (NO_2^-) และแอมโมเนีย (NH_3)

1.3 การเก็บและวิเคราะห์ข้อมูล

ประเมินอัตรารอดของลูกกุ้งในระยะ Mysis 1, Postlarva 1 และ 15 ประเมินอัตราการเจริญเติบโตโดยวัดความยาวของลูกกุ้งที่ระยะ Postlarva 1, 7 และ 15 น้ำหนักเฉลี่ยที่ระยะ Postlarva 15 วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variances) เปรียบเทียบความต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธีของ Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (บุญอ้อม, 2550)

2. การทดสอบความทนทานต่อสภาพเครียดบางประการและความต้านทานต่อเชื้อ *V. harveyi* ของลูกกุ้งที่อนุบาลด้วย *S. limacinum* โดยการทดแทนและเสริม *Chaetoceros* sp.

2.1 การทดสอบความทนทานต่อความเครียดโดยการแช่ฟอร์มาลิน 200 ppm นาน 24 ชั่วโมง (Formalin stress test)

นำลูกกุ้งขาวระยะ Postlarva 15 แต่ละชุดการทดลองจากการทดลองที่ 1 มาเลี้ยงในโหลทดลองขนาด 3 ลิตร โหลละ 20 ตัว ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำให้อากาศเบา ๆ และให้ *Artemia* เป็นอาหารตามปกติ ปรับสภาพลูกกุ้งก่อนทำการทดลอง 3 ชั่วโมงก่อนทำการทดลอง หลังจากนั้นใส่ฟอร์มาลิน (37% formaldehyde) ความเข้มข้น 200 ppm และบันทึกอัตราการตายของลูกกุ้งที่เวลา 15, 30, 45, 60 นาที และทุกชั่วโมงจนครบ 24 ชั่วโมง

2.2 การทดสอบความทนทานต่อความเครียดโดยการลดความเค็มอย่างเฉียบพลันจาก 30 ppt เป็น 5 ppt (Osmotic stress test)

ใช้ลูกกุ้งขาวระยะ Postlarva 15 ที่อนุบาลในน้ำเค็ม 30 ppt จากการทดลองที่ 1 นำมาใส่โหลทดลองขนาด 10 ลิตร โหลละ 20 ตัว ใช้ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำโดยใช้น้ำที่มีความเค็ม 5 ppt ให้อากาศและ *Artemia* เป็นอาหารตามปกติ บันทึกอัตราการตายของลูกกุ้งทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน

2.3 การทดสอบความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคชนิด *V. harveyi*

นำลูกกุ้งขาวระยะ Postlarva 15 จากการทดลองที่ 1 จำนวน 20 ตัวมาเลี้ยงในโหลแก้วขนาด 3 ลิตร ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ ใส่เชื้อ *V. harveyi* ความเข้มข้นที่ทดสอบมาก่อนแล้วว่าทำให้กุ้งตายประมาณ 50% ภายใน 7 วัน ให้อากาศและ *Artemia* เป็นอาหารตามปกติ บันทึกอัตราการตายของลูกกุ้งทุก ๆ 24 ชั่วโมงเป็นเวลา 7 วัน และนำตัวอย่างลูกกุ้งที่ตายไปแยกเชื้อเพื่อยืนยันสาเหตุการตายในอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS

2.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

เปรียบเทียบอัตราการตายของลูกกุ้งที่อนุบาลด้วย *S. limacinum* โดยการทดแทนและเสริม *Chaetoceros* sp.จากการทดสอบความทนทานความเครียดบางประการและความต้านทานต่อเชื้อ *V. harveyi* โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variances) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธีของ Duncan’s New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (บุญอ้อม, 2550)

3. การศึกษาระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (non - specific immune response) ของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *S. limacinum*

3.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง

ในการทดลองใช้กุ้งขาวที่มีขนาด 10-15 กรัม จากฟาร์มเอกชน เลี้ยงที่ความหนาแน่น 15 ตัวต่อตารางเมตร ในบ่อซีเมนต์ขนาด 1.5 x 1.5 x 1.2 ตารางเมตร บรรจุน้ำทะเลความเค็ม 30 ppt ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยคลอรีน คลุมด้วยพลาสติกเพื่อพรางแสงและควบคุมอุณหภูมิ ให้อาหาร 4 มื้อ เวลา 8.00, 12.00, 16.00 และ 20.00 น. เปลี่ยนถ่ายน้ำและดูดตะกอนทุก ๆ 3 วัน และเลี้ยงเพื่อปรับสภาพเป็นเวลา 7 วันก่อนทำการทดลอง

3.2 การเตรียมอาหารทดลองและการให้อาหาร

ใช้การทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) โดยแบ่งเป็น 4 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ ดังนี้

<u>ชุดการทดลองที่ 1</u> (ชุดควบคุม) ให้อาหารกุ้งเบอร์ 4 (โปรตีน 32%) เคลือบด้วยน้ำมันปลาหมึก

<u>ชุดการทดลองที่ 2</u> ให้อาหารกุ้งเบอร์ 4 ผสม *S. limacinum* แบบผงแห้ง 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม และเคลือบด้วยน้ำมันปลาหมึก

<u>ชุดการทดลองที่ 3</u> ให้อาหารกุ้งเบอร์ 4 ผสม *S. limacinum* แบบผงแห้ง 10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม และเคลือบด้วยน้ำมันปลาหมึก

<u>ชุดการทดลองที่ 4</u> ให้อาหารกุ้งเบอร์ 4 ผสม *S. limacinum* แบบผงแห้ง 20 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม และเคลือบด้วยน้ำมันปลาหมึก

อาหารทดลองผสม *S. limacinum* ตามระดับความเข้มข้นที่กำหนดข้างต้น เคลือบด้วยน้ำมันปลาหมึก ผึ่งให้แห้งในที่ร่ม โดยอาหารที่ให้จะให้ในปริมาณ 5% ของน้ำหนักตัวต่อวัน ให้

อาหารทดลองเป็นเวลา 30 วัน และเลี้ยงต่อด้วยอาหารปกติเป็นเวลา 20 วัน ทำการสุ่มเก็บเลือดจากทุกชุดการทดลองทุก ๆ 10 วัน เป็นเวลา 50 วัน

3.3 การศึกษาระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว

ทำการสุ่มเก็บเลือดจากกุ้งทุกชุดการทดลองชุดการทดลองละ 15 ตัวโดยจะเก็บซ้ำละ 5 ตัว โดยเจาะเลือดจาก ventral sinus ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ภายในหลอดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (anticoagulant) ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ซึ่งมีอัตราส่วนเลือดต่อสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดเท่ากับ 1:2 หลังจากนั้นนำไปวิเคราะห์ ปริมาณเม็ดเลือดรวม (Total haemocytes count) กิจกรรมการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม (Phagocytic activity) กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้งขาว (Bactericidal activity) กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ Phenoloxidase ตามขั้นตอนดังนี้

3.3.1 ปริมาณเม็ดเลือดทั้งหมด (total haemocytes count)

นำเลือดที่ได้ตรวจนับปริมาณเม็ดเลือดโดยใช้ haemacytometer และคำนวณปริมาณเม็ดเลือดเป็นหน่วยเซลล์ต่อมิลลิลิตร

3.3.2 กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ Phenoloxidase

นำเลือดที่เจาะได้จากวิธีการข้างต้น มาทำการแยกเซลล์เม็ดเลือด โดยนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใสไปวิเคราะห์กิจกรรมการทำลายแบคทีเรีย (Bactericidal activity) ของน้ำเลือด (ในข้อ 3.3.4) นำส่วนที่เป็นตะกอนมาล้างด้วย K-199 แยกเม็ดเลือดส่วนหนึ่งมาทดสอบกิจกรรมการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม (Phagocytic activity) (ในข้อ 3.3.5) อีกส่วนหนึ่งมาละลายในสารละลาย cacodylate buffer pH 7.4 และนำไปทำให้เซลล์เม็ดเลือดแตกและตกตะกอนโดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นแยกส่วนใส ซึ่งเป็น hemocyte lysate supernatant (HLS) และนำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase ตามวิธีที่ดัดแปลงจากรายงานของ Soderhall and Hall (1984) (ในข้อ 3.3.2) และวิเคราะห์โปรตีนตามวิธีของ Lowry *et al.* (1951) (ในข้อ 3.3.3)

การวิเคราะห์กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ phenoloxidase

1) นำ HLS มา 500 ไมโครลิตรผสมกับสารละลายทริปซิน (0.1% ทริปซินใน cacodylate buffer) 500 ไมโครลิตร ทิ้งไว้เกิดปฏิกิริยา 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง

2) เติมสารละลาย L-dihydroyphenylalanine (L-DOPA) 500 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง

3) นำสารละลายจากข้อ 2). มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร เป็นเวลา 2 นาที โดยเปรียบเทียบกับสารละลายควบคุม (blank) ซึ่งสารละลายควบคุม ใช้ทริปซินผสมกับ L- DOPA และ cacodylate buffer (แทน HLS)

4) วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนใน HLS โดยวิธีของ Lowry *et al.* (1951) ตามวิธีข้อ 3.3.3 นำค่าที่ได้มาคำนวณหน่วย (Unit) ของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ตามรายละเอียดภาพผนวก

3.3.3 การวิเคราะห์โปรตีนใน HLS ตามวิธีของ Lowry *et al.* (1951) ดังนี้

1) นำ HLS มา 0.01 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 0.09 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

2) เติม reagent C (รายละเอียดการเตรียมสารอยู่ในภาคผนวก) 1 มิลลิลิตร เขย่าและทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที

3) เติม reagent D (รายละเอียดการเตรียมสารอยู่ในภาคผนวก) 0.1 มิลลิลิตร เขย่าและทิ้งไว้อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที

4) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และเทียบกับสารละลายมาตรฐานของ albumin โดย blank จะใช้ สารละลายบัฟเฟอร์ 0.01 มิลลิลิตร ผสมในน้ำกลั่น 0.09 มิลลิลิตร เขยย่าให้เข้ากัน เติม reagent C 1 มิลลิลิตร และ D 0.1 มิลลิลิตร

3.3.4 กิจกรรมการทำลายแบคทีเรีย (Bactericidal activity) ของน้ำเลือด

1) นำซีรั่มที่แยกได้จาการทดลองข้างต้น มาเจือจางด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 2.6% ที่ระดับ 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 และ 1:64 โดยปรับปริมาตรการเจือจางให้ได้ หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร

2) นำเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* บริสุทธิ์ที่เลี้ยงในอาหาร Tryptic soy broth ผสมโซเดียมคลอไรด์ 1.5% ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปั่นล้างด้วย สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 1.5% ที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที 3 ครั้ง นำเชื้อที่ได้มาละลายใน

สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 1.5% ที่ปลอดเชื้อ และนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร ให้ได้ค่า OD ประมาณ 0.1-0.15 นำเชื้อไปเติมในแต่ละหลอดที่เจือจางซีรั่มไว้แล้วในปริมาตรที่เท่ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

3) นำส่วนผสมแต่ละหลอดมาตรวจหาปริมาณเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี spread plate ลงใน TCBS agar

4) บันทึกค่าของการเจือจางซีรั่มที่สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียลงได้ 50% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ในระยะเวลา 3 ชั่วโมง

3.3.5 กิจกรรมการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม (Phagocytic activity) ดัดแปลงจากวิธีของ Itami *et al*. (1994)

1) นำเม็ดเลือดจากข้อ 3.3.2 ปริมาตร 200 µm หยดลงบน cover slip ให้ทั่วแผ่นและทิ้งไว้เป็นเวลา 60 นาทีเพื่อให้เซลล์เม็ดเลือดเกาะกับ cover slip

2) เมื่อครบ 60 นาทีแล้ว ล้างด้วย Shrimp saline 3 ครั้ง

3) หยดสารละลายของ Heat-killed yeast (จำนวนเซลล์ประมาณ 5×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ให้ทั่ว cover slip เป็นเวลา 2 ชั่วโมงเพื่อให้เซลล์เม็ดเลือดกลืนกินยีสต์

4) ล้างเศษเซลล์ที่ไม่เกาะติด cover slip ออกด้วย shrimp saline

5) ย้อมสีด้วยชุด DIP QUICK แล้วตั้งที่ไว้ให้แห้ง

6) ทำการนับเซลล์เม็ดเลือด โดยนับเซลล์เม็ดเลือดกุ้ง 100 เซลล์ต่อ 1 ตัวอย่าง ซึ่งมีวิธีการนับดังนี้คือ จำนวนเม็ดเลือดกุ้งที่จับกินยีสต์ และจำนวนยีสต์ที่ถูกเม็ดเลือดจับกิน ภายใน 100 เซลล์ของเม็ดเลือดกุ้ง นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณค่า Phagocytic Index และ Percent Phagocytosis ซึ่งนำมาคำนวณ ดังนี้

$$\text{Percent Phagocytosis} = \frac{\text{จำนวนเม็ดเลือดที่จับกินยีสต์ x 100}}{\text{จำนวนเม็ดเลือดทั้งหมด}}$$

$$\text{Phagocytic Index} = \frac{\text{จำนวนเม็ดเลือดที่จับกินยีสต์}}{\text{จำนวนเม็ดเลือดทั้งหมด}} \times \frac{\text{จำนวนยีสต์ที่ถูกจับกินทั้งหมด x 100}}{\text{จำนวนเม็ดเลือดทั้งหมด}}$$

3.4 การเก็บและวิเคราะห์ข้อมูล

ประเมินประสิทธิภาพของระบบภูมิคุ้มกันโดยวิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูล ดังนี้คือ ปริมาณเม็ดเลือดรวม กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase กิจกรรมการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม กิจกรรมการทำลายแบคทีเรีย อัตราการเจริญเติบโต และอัตรารอด วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variances) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธีของ Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (บุญอ้อม, 2550)

สถานที่ทำการวิจัย

ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ระยะเวลาทำการวิจัย

ดำเนินการทดลองระหว่างเดือนตุลาคม 2551 – มีนาคม 2552

ผลและวิจารณ์

ผล

1. ศึกษาอัตรารอดและอัตราการเจริญเติบโตของลูกกุ้งขาวหลังการให้ *S. limacinum* โดยการทดแทนและเสริม *Chaetoceros* sp.

จากการทดลองใช้ *S. limacinum* ในการอนุบาลลูกกุ้งขาวแบบทดแทนและแบบเสริม *Chaetoceros* sp. พบว่า อัตรารอดของลูกกุ้งในระยะ Mysis 1 ของชุดทดลองที่อนุบาลด้วย *Chaetoceros* sp. 100% เสริมด้วย *S. limacinum* 25% มีอัตรารอดสูงสุด คือ 89.81 $\pm$ 10.69% (ตารางที่ 1) ซึ่งสูงกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มที่อนุบาลด้วย *Chaetoceros* sp. 50% ร่วมกับ *S. limacinum* 50% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตารางที่ 1 อัตรารอด (เปอร์เซ็นต์) ของลูกกุ้งขาวในระยะ Zoea 1 ถึง Mysis 1, Mysis 1 ถึง Postlarva 1 และ Postlarva 1 ถึง Postlarva 15 (ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD) ที่อนุบาลด้วย *Chaetoceros* sp. แบบเสริมและแบบทดแทน *S. limacinum* ในระยะ Zoea 1 – Zoea 3

ชุดการทดลอง	อัตรารอด (เปอร์เซ็นต์)			
	Zoea1-Mysis1	Mysis 1-PL1	PL 1-PL15	Nauplius - PL 15
Chaetoceros sp. 100%	65.76 $\pm$ 11.12^{b}	53.51 $\pm$ 10.44^{b}	85.7 $\pm$ 1.10^{a}	19.59 $\pm$ 8.12^{a}
Chaetoceros sp. 50% + *S. limacinum* 50%	63.88 $\pm$ 11.01^{b}	67.31 $\pm$ 11.10^{a}	87.9 $\pm$ 0.90^{a}	24.56 $\pm$ 9.55^{a}
Chaetoceros sp. 75% + *S. limacinum* 25%	86.57 $\pm$ 10.77^{a}	65.36 $\pm$ 10.86^{a}	88.40 $\pm$ 1.30^{a}	32.50 $\pm$ 9.14^{b}
Chaetoceros sp. 100% + *S. limacinum* 25%	89.81 $\pm$ 10.69^{a}	64.46 $\pm$ 10.59^{a}	86.77 $\pm$ 0.97^{a}	32.64 $\pm$ 10.58^{b}

หมายเหตุ ตัวอักษรที่แสดงเหนือตัวเลขที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกัน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *($P<0.05$)*

ส่วนอัตรารอดจากระยะ Mysis 1 ถึง Postlarva 1 พบว่า ชุดควบคุมมีอัตรารอดต่ำสุด คือ 53.51±10.44% และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับชุดทดลองที่ได้รับ *S. limacinum* และ *Chaetoceros* sp. ในทุก ๆ ชุดการทดลอง ส่วนอัตรารอดที่ระยะ Postlarva 1 ถึง Postlarva 15 พบว่า ไม่มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างชุดควบคุมและชุดการทดลอง ($P>0.05$)

ในส่วนของอัตรารอดตั้งแต่ระยะ Nauplius 1 ถึงระยะ Postlarva 15 พบว่า มีอัตรารอดเป็นไปในแนวทางเดียวกันกับอัตรารอดจากระยะ Zoea 1 - Postlarva 15 คือ ชุดทดลองที่อนุบาลด้วย *Chaetoceros* sp. 75% ร่วมกับ *S. limacinum* 25% และ *Chaetoceros* sp. 100% และเสริมด้วย *S. limacinum* 25% มีอัตรารอดสูงกว่าชุดควบคุมและชุดที่ให้ *Chaetoceros* sp. 50% ร่วมกับ *S. limacinum* 50% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ซึ่งมีอัตรารอดดังนี้ คือ 32.50±9.14, 32.64±10.58, 19.59 ± 8.12 และ 24.56 ± 9.55% ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

การประเมินอัตราการเจริญเติบโตของลูกกุ้ง พบว่า ความยาวของลูกกุ้งที่ระยะ Postlarva 1, 7 และ 15 ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) ระหว่างชุดควบคุมและทุกชุดการทดลอง ส่วนน้ำหนักเฉลี่ยที่ระยะ Postlarva 15 พบว่า ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) ระหว่างชุดควบคุมและทุกชุดการทดลองเช่นกัน (ตารางที่ 2 และ 3)

ตารางที่ 2 ความยาวเฉลี่ย (มิลลิเมตร) ของลูกกุ้งขาวระยะ Postlarva 1, 7 และ 15 ที่อนุบาลด้วย *Chaetoceros* sp. แบบเสริมและแบบทดแทน *S. limacinum* ในระยะ Zoea1 – Zoea 3

ชุดการทดลอง	ความยาวเฉลี่ย (มิลลิเมตร)		
	PL1	PL7	PL15
Chaetoceros sp. 100%	4.65 ± 0.33	7.05 ± 0.12	11.91 ± 4.12
Chaetoceros sp. 50% + *Schizochytrium limacinum* 50%	4.64 ± 1.16	7.08 ± 0.92	12.00 ± 1.22
Chaetoceros sp. 75% + *Schizochytrium limacinum* 25%	4.69 ± 1.92	7.13 ± 1.62	12.03 ± 2.12
Chaetoceros sp. 100% + *Schizochytrium limacinum* 25%	4.75 ± 1.32	7.14 ± 1.02	12.00 ± 1.32

หมายเหตุ ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) ระหว่างชุดการทดลอง

ตารางที่ 3 น้ำหนักเฉลี่ย (มิลลิกรัม) ของลูกกุ้งขาวระยะ Postlarva 15 ที่อนุบาลด้วย *Chaetoceros* sp. แบบเสริมและแบบทดแทน *S. limacinum* ในระยะ Zoea 1 – Zoea 3

ชุดการทดลอง	น้ำหนักเฉลี่ยลูกกุ้ง PL 15 (มิลลิกรัม)
Chaetoceros sp. 100%	1.93 ± 0.31
Chaetoceros sp. 50% +*S. limacinum* 50%	1.95 ± 0.11
Chaetoceros sp. 75% +*S. limacinum* 25%	1.96 ± 0.23
Chaetoceros sp. 100% +*S. limacinum* 25%	1.95 ± 0.23

หมายเหตุ ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) ระหว่างชุดการทดลอง

เมื่อพิจารณาอัตราส่วนของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงระหว่าง Eicasapentaenoic acid (EPA) และ Docosahexaenoic (DHA) จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี พบว่าในชุดการทดลองที่ให้ *Chaetoceros* sp. 100% มีอัตราส่วนของ EPA/DHA สูงสุด คือ 7.9/1 และในชุดการทดลองที่ให้ *Chaetoceros* sp. 50% + *S. limacinum* 50% มีอัตราส่วนของ EPA/DHA ต่ำสุด คือ 1/2.5 และส่วนในชุดทดลองที่ให้ *Chaetoceros* sp. 75% + *S. limacinum* 25% และ *Chaetoceros* sp. 100% + *S. limacinum* 25% มีอัตราส่วนของ EPA/DHA ใกล้เคียงกัน ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1/1 และ 1.3/1 ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 อัตราส่วนของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงระหว่าง Eicasapentaenoic acid (EPA) และ Docosahexaenoic (DHA) ในอาหารที่ให้ระยะ Zoea 1 – Zoea 3 จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

ชุดการทดลอง	% HUFA ในอาหารทดลอง	EPA/DHA
Chaetoceros sp. 100%	3.03	7.9/1
Chaetoceros sp. 50% + *S. limacinum* 50%	7.82	1/2.5
Chaetoceros sp. 75% + *S. limacinum* 25%	5.15	1/1
Chaetoceros sp. 100% + *S. limacinum* 25%	7.31	1.3/1

2. การทดสอบความทนทานต่อสภาพเครียดบางประการและความต้านทานต่อเชื้อ *V. harveyi* ของลูกกุ้งที่อนุบาลด้วย *S. limacinum* แบบทดแทนและเสริม *Chaetoceros* sp.

2.1 การทดสอบความทนทานต่อความเครียดโดยการแช่ฟอร์มาลิน 200 ppm นาน 24 ชั่วโมง พบว่า ในชุดควบคุมมีอัตราการตายของลูกกุ้งสูงที่สุดเท่ากับ 76.55±3.16% และมีความแตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$) กับชุดทดลองทั้ง 3 ชุดที่อนุบาลด้วย *Chaetoceros* sp. และ *S. limacinum* ที่มีอัตราการตาย เท่ากับ 67.56±6.16%, 64.22±18.16% และ 63.22±15.16% ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

2.2 การทดสอบความทนทานต่อการลดความเค็มอย่างเฉียบพลันจาก 30 ppt เป็น 5 ppt เป็นเวลา 7 วัน พบว่า ชุดควบคุมมีอัตราการตายสะสมมากที่สุด คือ 35.55±5.73% และมีความ

แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) กับชุดทดลองทั้ง 3 ชุดที่มีอัตราการตายเท่ากับ 24.44±6.41%, 24.33±5.86% และ 26.67±6.55% ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

2.3 การทดสอบความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* หลังจากนำลูกกุ้งจากการทดลองที่ 1 มาเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *V. harveyi* เป็นเวลา 7 วัน พบว่า อัตราการตายในทุกกลุ่มการทดลองไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 อัตราการตายสะสมของลูกกุ้งระยะ Postlarva 15 ที่อนุบาลด้วย *S. limacinum* โดยการทดแทนและเสริม *Chaetoceros* sp. หลังการทดสอบความทนทานต่อความเครียดและความต้านทานต่อเชื้อ *V. harveyi*

ชุดการทดลอง	Formalin stress test	Osmotic stress test	Challenge with *V. harveyi*
Chaetoceros sp. 100%	76.55±3.16 [b]	35.55±5.73 [b]	62.23±8.16 [a]
Chaetoceros sp. 50% + *S. limacinum* 50%	67.56±6.16 [a]	24.44±6.41 [a]	62.13±9.16 [a]
Chaetoceros sp. 75% + *S. limacinum* 25%	64.22±18.16 [a]	24.33±5.86 [a]	61.67±5.16 [a]
Chaetoceros sp. 100% + *S. limacinum* 25%	63.22±15.16 [a]	26.67± 6.55 [a]	60.16±9.16 [a]

หมายเหตุ ตัวอักษรที่แสดงเหนือตัวเลขที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกัน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

3. การศึกษาระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (non-specific immune response) ของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *S. limacinum*

จากการทดลองให้อาหารเม็ดผสม *S. limacinum* ในอัตราส่วนต่าง ๆ เมื่อพิจารณาปริมาณ HUFA ในอาหารที่ผสม *S. limacinum* พบว่า ในกลุ่มที่ให้อาหารเม็ดผสม *S. limacinum* 15 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีค่าสูงสุดคือ 5.64% ส่วนในกลุ่มควบคุมมีปริมาณ HUFA ต่ำสุดคือ 3.42% และเมื่อพิจารณาอัตราส่วน EPA/DHA ในอาหารพบว่าในกลุ่มควบคุมมีอัตราส่วนที่ 4.4/1 ส่วนในกลุ่มทดลองที่ให้ *S. limacinum* ผสมอาหารเม็ด ในอัตราส่วน 5, 10 และ 15 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม พบว่า มีค่าเท่ากับ 2.2/1, 1/1.5 และ 1/3 ตามลำดับ (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 อัตราส่วนของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงระหว่าง Eicasapentaenoic acid (EPA) และ Docosahexaenoic (DHA) ในอาหารในกลุ่มควบคุมและในกลุ่มทดลองที่ให้ *S. limacinum* ผสมอาหารจากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

ปริมาณ *S. limacinum* (กรัม/อาหาร 1. กก.)	% HUFA ในอาหารทดลอง	EPA/DHA
0	3.42	4.4/1
5	4.16	2.2/1
10	4.90	1/1.5
15	5.64	1/3

จากการทดลองจะเริ่มให้อาหารทดลองเป็นเวลา 30 วันและให้อาหารปกติเป็นเวลา 20 วัน ทำการสุ่มเก็บเลือดเพื่อประเมินระดับภูมิคุ้มกันทุก ๆ 10 วัน ซึ่งมีผลการทดลอง ดังนี้

3.1 ปริมาณเม็ดเลือดทั้งหมด (Total haemocytes count)

หลังจากการนับปริมาณเม็ดเลือดกุ้งในชุดทดลองและชุดควบคุมที่ 10 วันแรก พบว่ากุ้งในกลุ่มที่ให้อาหารเม็ดผสม *S. limacinum* 10 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัมมีปริมาณเม็ดเลือดรวมสูงสุด คือ 1.43 x 10^7 เซลล์/มล. และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับชุดการทดลองที่ให้ *S. limacinum* ที่ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม และชุดควบคุม ซึ่งมีปริมาณเม็ดเลือดรวมดังนี้ คือ 1.26 x 10^7 และ 1.21 x 10^7 เซลล์/มล. ตามลำดับ และในวันที่ 20 หลังการให้อาหารทดลอง พบว่าในชุดทดลองที่ให้อาหารผสม *S. limacinum* 15 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีปริมาณเม็ดเลือดรวมสูงสุดคือ 1.42 x 10^7 เซลล์/มล. ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับชุดการทดลองที่ให้ *S. limacinum* 5 และ 10 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัมและชุดควบคุม ซึ่งมีปริมาณเม็ดเลือดรวมเฉลี่ย 1.18 x 10^7, 1.30 x 10^7 และ 1.20 x 10^7 เซลล์/มล. ตามลำดับ และวันที่ 30 ของการให้อาหารทดลองพบว่า ในชุดทดลองที่ให้อาหารผสม *S. limacinum* 15 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีปริมาณเม็ดเลือดรวมสูงสุดคือมีปริมาณเม็ดเลือดเฉลี่ยอยู่ที่ 1.41 x 10^7 เซลล์/มล. ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับชุดการทดลองที่ให้ *S. limacinum* 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม และชุดควบคุม ซึ่งมีปริมาณเม็ดเลือดรวมเฉลี่ย 1.14 x 10^7 เซลล์/มล.และ 1.16 x 10^7 เซลล์/มล. ตามลำดับ

ในส่วนของปริมาณเม็ดเลือดเฉลี่ยหลังจากการหยุดให้อาหารทดลองแล้ว ปรากฏว่าที่ 10 วันหลังจากการหยุดให้อาหารทดลอง พบว่า ชุดการทดลองที่ให้ *S. limacinum* 15 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัมยังคงมีปริมาณเม็ดเลือดรวมสูงสุด คือ มีค่าเฉลี่ยคือ 1.33×10^7 เซลล์/มล. และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับชุดควบคุมและชุดการทดลองที่ให้ *S. limacinum* 5 และ 10 กรัม/กิโลกรัม ซึ่งมีค่า 1.10×10^7, 1.24×10^7, 1.24×10^7 เซลล์/มล. และหลังจากหยุดให้อาหารทดลองที่ 20 วัน พบว่า ปริมาณเม็ดเลือดเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างในทางสถิติ ($P>0.05$) ระหว่างชุดการทดลองและชุดควบคุม (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 7 ปริมาณเม็ดเลือดรวม (Total heamocytes x 10^7 cell/ml) ของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปผสม *S. limacinum* ในระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 30 วัน และหยุดให้เป็นเวลา 20 วัน

ปริมาณ *S. limacinum*	ปริมาณเม็ดเลือดรวม (x 10^7เซลล์/มล.)				
(กรัม/อาหาร 1. กก.)	10 วัน	20 วัน	30 วัน	40 วัน	50 วัน
0	1.21 ± 0.61^a	1.20 ± 0.72^a	1.16 ± 0.65^a	1.10 ± 0.84^a	1.18 ± 0.48^a
5	1.26 ± 0.66^a	1.18 ± 0.88^a	1.14 ± 1.12^a	1.24 ± 1.05^a	1.13 ± 0.91^a
10	1.43 ± 0.81^b	1.30 ± 0.90^{ab}	1.32 ± 1.72^{ab}	1.24 ± 1.32^a	1.24 ± 0.95^a
15	1.41 ± 0.78^b	1.42 ± 0.94^b	1.41 ± 0.71^b	1.33 ± 0.94^b	1.20 ± 1.04^a

หมายเหตุ อักษรที่แตกต่างกันในสดมภ์เดียวกัน แสดงถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

3.2 กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ Phenoloxidase activity

จากการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ Phenoloxidase ของกุ้งทดลองที่ให้อาหารผสม *S. limacinum* ในอัตราส่วนต่าง ๆ พบว่า ที่ 10 วันแรกของการทดลองชุดการทดลองที่ให้อาหารผสม *S. limacinum* 15 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีค่าสูงสุด คือ 194.62 unit/min/mg protein และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับชุดควบคุมและชุดทดลองที่ให้ *S. limacinum* 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับชุดการทดลองที่ให้ *S. limacinum* 10 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ในส่วนของวันที่ 20 และ 30 หลังการให้อาหารทดลอง

พบว่า ในชุดการทดลองที่ให้อาหารผสม *S. limacinum* 15 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ยังคงมีปริมาณเอนไซม์ Phenoloxidase สูงสุด คือ เท่ากับ 201.7 และ 206.52 unit/min/mg protein ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับชุดการทดลองที่ให้ *S. limacinum* ในระดับ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม และชุดควบคุม ซึ่งไม่แตกต่างจากทางสถิติกับชุดการทดลองที่ให้ *S. limacinum* 10 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัมเช่นกัน และหลังจากหยุดให้อาหารผสม *S. limacinum* เป็นเวลา 10 วัน พบว่าปริมาณเอนไซม์ Phenoloxidase ในชุดการทดลองที่ให้ *S. limacinum* ผสมอาหาร 15 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ยังคงมีค่าสูงสุด คือ 201.79 unit/min/mg protein และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับชุดควบคุมและชุดทดลองที่ให้อาหารผสมให้ *S. limacinum* ผสมอาหาร 5 และ 10 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ส่วนในวันที่ 20 หลังจากหยุดให้อาหารทดลองปรากฏว่าไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) ระหว่างชุดควบคุมและชุดการทดลองที่ให้อาหารผสม *S. limacinum* (ตารางที่ 7) ซึ่งจากการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ Phenoloxidase ของกุ้งทดลองโดยภาพรวมแล้ว พบว่า ชุดทดลองที่ให้อาหารผสมให้ *S. limacinum* ผสมอาหาร 15 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีระดับกิจกรรมของเอนไซม์ Phenoloxidase สูงสุดทุกช่วงเวลาที่ใช้ในการทดสอบ

ตารางที่ 8 กิจกรรมของเอนไซม์ Phenoloxidase (unit/min/mg protein) ของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปผสม *S. limacinum* ในระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 30 วัน และหยุดให้เป็นเวลา 20 วัน

ปริมาณ *S .limacinum* (กรัม/อาหาร 1. กก.)	กิจกรรมของเอนไซม์ Phenoloxidase (unit/min/mg protein)				
	10 วัน	20 วัน	30 วัน	40 วัน	50 วัน
0	161.07±60.7[a]	181.33±58.3[a]	179.17±59.2[a]	180.38±42.1[a]	182.95±42.3[a]
5	168.73±47.5[a]	187.02±53.2[a]	172.94±98.3[a]	185.2±94.1[a]	184.3±99.6[a]
10	178.01±49.4[ab]	196.88±99.2[ab]	193.34±63.2[ab]	188.75±86.6[a]	185.66±80.3[a]
15	194.62±89.9[b]	201.70±70.4[b]	206.52±77.7[b]	201.79±91.5[b]	188.41±81.6[a]

หมายเหตุ อักษรที่แตกต่างกันในสดมภ์เดียวกัน แสดงถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

3.3. กิจกรรมการทำลายแบคทีเรีย (Bactericidal activity) ของน้ำเลือด

เมื่อพิจารณากิจกรรมการทำลายเชื้อแบคทีเรียของกุ้งขาวที่ให้อาหารที่ผสม *S. limacinum* ในระดับต่าง ๆ พบว่า ที่ 10 วันค่ากิจกรรมการทำลายเชื้อแบคทีเรียของกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *S. limacinum* 15 และ 10 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มี Bactericidal activity คือ ที่ 1:8 และที่ 20 วันหลังจากให้อาหารทดลอง พบว่า ในชุดควบคุมมีค่า Bactericidal activity ต่ำสุด คือที่ 1:4 ซึ่งในทุกชุดทดลองที่ได้รับ *S. limacinum* มีค่า Bactericidal activity เท่ากับ 1:8 ที่ 30 วันค่ากิจกรรมการทำลายเชื้อแบคทีเรียของกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *S. limacinum* 10 และ 15 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีค่า Bactericidal activity คือ ที่ 1:16 และหลังจากการหยุดให้อาหารทดลอง 10 วันพบว่าค่า Bactericidal activity ยังคงมีค่าสูงสุดในชุดการทดลองที่ให้อาหารผสม *S. limacinum* 15 และ 10 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ในส่วนของวันที่ 20 หลังการหยุดให้อาหารทดลอง Bactericidal activity ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 9 กิจกรรมการทำลายแบคทีเรีย (Bactericidal activity) (ค่ามัธยฐาน) ของน้ำเลือดกุ้งขาวที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปผสม *S. limacinum* ในระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 30 วัน และหยุดให้เป็นเวลา 20 วัน

ปริมาณ *S. limacinum*	**กิจกรรมการทำลายแบคทีเรีย (Bactericidal activity)**				
(กรัม/อาหาร 1. กก.)	10 วัน	20 วัน	30 วัน	40 วัน	50 วัน
0	1:4	1:4	1:8	1:8	1:8
5	1:4	1:8	1:8	1:8	1:8
10	1:8	1:8	1:16	1:16	1:8
15	1:8	1:8	1:16	1:16	1:8

3.4 กิจกรรมการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม (Phagocytic activity)

จากการทดลอง เมื่อพิจารณาค่า Percent Phagocytosis ของกุ้งทดลองที่ให้อาหารผสม *S. limacinum* ในความเข้มข้นระดับต่าง ๆ พบว่า หลังจากให้อาหารเป็นเวลา 10, 20 และ 30 วัน ค่า Percent Phagocytosis ของชุดการทดลองที่ให้ *S. limacinum* และชุดควบคุมไม่มีความแตกต่าง

ทางสถิติ (*P>0.05*) และเช่นเดียวกับที่ 10 และ 20 วันหลังการให้อาหารทดลองที่ค่า Percent Phagocytosis ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (*P>0.05*) ระหว่างชุดทดลองและชุดควบคุม (ตารางที่ 9)

เมื่อพิจารณาค่า Phagocytic Index ที่ 10, 20 และ 30 วันของการให้อาหารทดลอง พบว่าชุดการทดลองที่ให้ *S. limacinum* ผสมอาหารและชุดควบคุมไม่พบความแตกต่างทางสถิติ (*P>0.05*) ของค่า Phagocytic Index และเมื่อหยุดให้อาหารทดลองก็ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ (*P>0.05*) เช่นกัน (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 Percent Phagocytosis ของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปผสม *S. limacinum* ในระดับต่างกันเป็นเวลา 30 วัน และหยุดให้เป็นเวลา 20 วัน

ปริมาณ *S. limacinum*	Percent Phagocytosis Activity				
(กรัม/อาหาร 1. กก.)	10 วัน	20 วัน	30 วัน	40 วัน	50 วัน
0	29.44±4.98	23.55±3.69	31.72±10.75	25.98±3.47	28.22±8.21
5	30.52±7.39	27.44±5.63	32.89±9.4	27.39±10.77	29.37±6.99
10	30.31±7.57	29.9±6.63	32.02±6.11	29.33±3.44	29.32±9.34
15	32.41±3.47	30.41±8.21	33.91±7.39	28.45±5.63	30.01±11.4

หมายเหตุ ไม่พบความแตกต่างในทางสถิติ (*P>0.05*) ระหว่างชุดการทดลอง

ตารางที่ 11 Percent Phagocytic Index ของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปผสม *S. limacinum* ในระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 30 วัน และหยุดให้เป็นเวลา 20 วัน

ปริมาณ *S. limacinum*	Percent Phagocytic Index				
(กรัม/อาหาร 1. กก.)	10 วัน	20 วัน	30 วัน	40 วัน	50 วัน
0	7.76±1.63	5.7±1.53	7.09±2.04	6.54±1.21	6.81±4.55
5	7.91±5.16	6.65±2.88	6.7±3.09	7.37±1.88	7.73±2.67
10	8.67±3.58	6.01±2.42	6.86±3.36	6.21±4.15	5.73±4.94
15	9.02±2.88	5.98±3.09	7.91±3.36	6.01±5.15	5.98±4.24

หมายเหตุ ไม่พบความแตกต่างในทางสถิติ (*P>0.05*)

ในส่วนของน้ำหนักของกุ้งทดลองหลังจากทดลองเป็นเวลา 50 วัน พบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*P>0.05*) ระหว่างชุดควบคุมและชุดการทดลองในทุก ๆ ครั้งของการเก็บข้อมูล (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 12 น้ำหนักของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปผสม *S. limacinum* ในระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 30 วัน และหยุดให้เป็นเวลา 20 วัน

ปริมาณ *S. limacinum*	น้ำหนัก (กรัม)				
(กรัม/อาหาร 1. กก.)	10 วัน	20 วัน	30 วัน	40 วัน	50 วัน
0	19.53±0.76	20.67±1.42	21.7±0.80	22.4±1.20	23.4±0.90
5	19.22±1.30	20.44±1.09	21.08±0.86	23.44±0.90	24.9±0.77
10	19.61±0.87	20.83±0.96	21.8±0.74	23.4±1.14	24.26±0.57
15	19.16±0.82	20.7±0.92	22.7±0.65	24.1±0.87	25.3±0.94

หมายเหตุ ไม่พบความแตกต่างทางสถิติระหว่างทุกชุดการทดลองและชุดควบคุม (*P>0.05*)

วิจารณ์

1. อัตรารอดและอัตราการเจริญเติบโตของลูกกุ้งขาวหลังการให้ *Schizochytrium limacinum* โดยการทดแทนและเสริม *Chaetoceros* sp.

ปัจจุบันได้มีการนำจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Thraustochyrids* เช่น *Schizochytrium limacinum* มาใช้ในการอนุบาลสัตว์ทะเลไม่ว่าจะเป็นการให้โดยตรงหรือให้ผ่านทาง *Artemia* และ Rotifer เพื่อเสริมคุณค่าทางอาหาร และมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มอัตรารอด การเจริญเติบโต และทดแทนอาหารที่ใช้ในปัจจุบัน ซึ่งประสบผลสำเร็จในการอนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อนหลายชนิด เช่น การนำ *S. limacinum* ในรูปแบบ Spray-dried มาอนุบาลหอยกะพงเมดิเตอร์เรเนียนโดยใช้อนุบาลร่วมกับ *Spirulina* sp. และ *Hematococcus* sp. (Langdon and Onal, 1999) การอนุบาลปลา Turbot โดยใช้ในรูปแบบ spray-dried โดยให้ผ่านทาง *Artemia* และ Rotifer ซึ่งจากการทดลองพบว่าสามารถเพิ่มอัตรารอดและภาวะ Pseudobilism ของลูกปลา turbot ได้ (Song *et al*., 2007) การเสริม HUFAจาก *S. limacinum* ในรูปแบบ Spray-dried ให้ผ่านทาง *Artemia* เพื่อนำไปอนุบาลสัตว์ทะเลวัยอ่อนหลายชนิดพบว่าสามารถเพิ่มระดับกรดไขมันได้แก่ DHA และ EPA ใน *Artemia* ซึ่งเหมาะสำหรับนำไปอนุบาลสัตว์ทะเลวัยอ่อนเช่น ปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) (สุทธินี และคณะ, 2551) Boeing (1997) ประสบผลสำเร็จในการอนุบาลหอยกาบ (*Tapes semidecussata*) และหอยนางรม (*Crassostrea gigas*) โดยใช้ *S. limacinum* ในรูปแบบ spray-dried เพื่อทดแทน *Tetraselmis* sp. และ *Chaetoceros* sp. บางส่วนซึ่งทดแทนได้ดี หรือการนำ *S. limacinum* มาสกัดเอาน้ำมันที่มีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง ได้แก่ DHA เพื่อนำมาทดแทนการใช้น้ำมันปลาในอาหารอัดเม็ดเนื่องจากการควบคุมคุณภาพของน้ำมันปลาเป็นไปได้ยาก ซึ่งพบว่า สามารถทดแทนน้ำมันปลาโดยมีอัตรารอดและการเจริญเติบโตเป็นปกติเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้น้ำมันปลา (Miller *et al*., 2007)

จากการทดลองนำ *S. limacinum* มาอนุบาลลูกกุ้งขาวแบบเสริมและทดแทน *Chaetoceros* sp. พบว่า ลูกกุ้งขาวในกลุ่มที่ได้รับ *Chaetoceros* sp. 75% *S. limacinum* 25% และ *Chaetoceros* sp. 100% เสริมด้วย *S. limacinum* 25% มีอัตรารอดสูงกว่ากลุ่มควบคุมทางสถิติ จากระยะ Zoea 1- Zoea 3 และในระยะ Mysis 1- Postlarva 1 แต่เมื่อพิจารณาปริมาณ HUFA ในอาหารทั้งหมดพบว่าถึงแม้ว่ากลุ่มที่ให้ *Chaetoceros* sp. 50% *S. limacinum* 50% จะมีปริมาณ HUFA ในอาหารมากที่สุดคือ 7.82% แต่เมื่อพิจารณาสัดส่วน EPA/DHA ซึ่งมีค่า 1/2.5 จึงอาจทำให้เกิดความไม่สมดุลของสัดส่วน EPA/DHA ในอาหาร (Lavens and Sorgeloos, 2000) เมื่อเทียบกับชุดการทดลองที่ให้

Chaetoceros sp. 75% *S. limacinum* 25% และ *Chaetoceros* sp. 100% เสริมด้วย *S. limacinum* 25% ที่มีปริมาณ HUFA ในอาหาร 5.15 และ 7.31% ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาจากอัตราส่วนกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงระหว่าง EPA/DHA พบว่าในกลุ่มที่ได้รับ *Chaetoceros* sp. 75% *S. limacinum* 25% มีค่า EPA/DHA เท่ากับ 1/1 และในกลุ่ม *Chaetoceros* sp. 100% เสริมด้วย *S. limacinum* 25% มีค่า EPA/DHA เท่ากับ 1.3/1 ซึ่งเป็นไปในแนวทางเดียวกับการทดลองของ Rodriguez *et al*. (1994) ที่ศึกษาผลของการเสริม HUFA ในอาหารลูกปลา gilthead seabream (*Sparus aurata*) ที่ 2 ระดับของ EPA/DHA คือ 1/1.5 และ 2/1 จากการเสริม HUFA 1% ในอาหาร พบว่าการให้อาหารที่มีอัตราส่วนของ EPA/DHA เท่ากับ 1/1.5 มีผลทำให้ลูกปลา gilthead seabream มีการเจริญเติบโตดีกว่าในกลุ่มที่ให้ HUFA ที่อัตราส่วนของ EPA/DHA เท่ากับ 2/1 เนื่องจากสัตว์ทะเลวัยอ่อนมีความต้องการกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (HUFA) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง EPA และ DHA ในอัตราส่วนที่สมดุลกันคือ อัตราส่วนระหว่าง 1/1 และ 1/2 ซึ่ง Sargent *et al*.(1995) ให้เหตุผลว่ากรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญที่ใช้ในการเจริญเติบโตเนื่องจากไขมันสามารถให้พลังงานมากกว่าโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตมากกว่า 2 เท่า และกรดไขมันยังทำให้การทำงานต่าง ๆ ของเซลล์ดำเนินกิจกรรมทางชีวภาพได้อย่างปกติ ซึ่งกรดไขมันไม่อิ่มตัวทั้ง 2 ชนิด คือ EPA และ DHA มีหน้าที่และบทบาทสำคัญในเซลล์ต่างกัน คือ กรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิด EPA ทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นที่ใช้ในการสังเคราะห์ฮอร์โมนที่สำคัญในการดำรงชีพและดำเนินกิจกรรมของร่างการในการเจริญเติบโต ได้แก่สารประกอบในกลุ่ม Eicosanoid เช่น Prostaglandins, thromboxane และ Leukotrienes ส่วนกรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิด DHA ส่วนใหญ่พบว่าเป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์และทำหน้าที่เป็น extra และ intracellular fluid คอยควบคุมและรักษาสมดุลแร่ธาตุ ดังนั้นการที่ลูกกุ้งได้รับ HUFA ในอัตราส่วนของ EPA/DHA ที่เหมาะสมจะทำให้ลูกกุ้งมีอัตรารอดและการเจริญเติบโตเป็นไปอย่างปกติ

จากการศึกษาครั้งนี้ยังพบอีกว่าอัตรารอดในระยะ Zoea 1- Zoea 3 ที่ให้ *S. limacinum* 25% *Chaetoceros* sp. 75% และในกลุ่ม *Chaetoceros* sp. 100% เสริมด้วย *S. limacinum* 25% มีอัตรารอดสูงกว่ากลุ่มควบคุมซึ่งผลการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Reitan *et al*. (1994) ที่รายงานว่า การเพิ่มระดับกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (HUFA)ในอาหารสัตว์น้ำวัยอ่อน ในระดับที่เหมาะสมจะทำให้การเจริญเติบโต และการพัฒนารูปร่างเป็นไปได้อย่างต่อเนื่อง ด้วยสาเหตุที่ระยะวิกฤตของสัตว์น้ำวัยอ่อน ซึ่งเป็นระยะที่มีการเพิ่มจำนวนเซลล์และเนื้อเยื่อ สัตว์น้ำวัยอ่อนจึงต้องการสารอาหารในการเจริญเติบโตโดยเฉพาะอย่างยิ่งกรดไขมันที่จำเป็น (Essential fatty acid) ซึ่งสัตว์วัยอ่อนไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นมาเองได้ แต่ต้องได้รับจากอาหารเท่านั้น อย่างไรก็ตามจากการ

ทดลองครั้งนี้ อัตรารอดในระยะ Postlarva 1-Postlarva 15 และการเจริญเติบโตของลูกกุ้งในระยะ Postlarva 1, 7 และ 15 ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ทั้งนี้การทดลองนี้เริ่มให้อาหารทดลองตั้งแต่ระยะ Zoea 1- Zoea 3 และเปลี่ยนอาหารเป็น *Artemia* ตั้งแต่ระยะ Mysis 1 จนกระทั่งเข้าสู่ระยะ Postlarva 15 โดยระยะเวลาดังกล่าว ลูกกุ้งมีการเจริญเติบโตและมีการลอกคราบอย่างต่อเนื่อง ดังนั้นการให้ *S. limacinum* ในระยะ Zoea 1- Zoea 3 จึงไม่อาจส่งผลต่อเนื่องในระยะยาวไปถึงระยะ Postlarva 15

2. การทดสอบความทนทานต่อสภาพเครียดบางประการและความต้านทานต่อเชื้อ *V. harveyi* ของลูกกุ้งที่อนุบาลด้วย *S. limacinum* โดยการทดแทนและเสริม *Chaetoceros* sp.

การทดสอบความทนทานต่อความเครียดบางประการของลูกกุ้ง เป็นการประเมินความแข็งแรงเบื้องต้นของลูกกุ้งเพื่อสร้างความเชื่อมั่นในการเลี้ยง ส่งเสริมให้การเลี้ยงในบ่อดินให้ประสบผลสำเร็จ ซึ่งมีผู้วิจัยหลายท่านได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการประเมินคุณภาพลูกกุ้ง เช่น Palacios and Racotta (2007) กล่าวว่า การทดสอบความทนทานต่อความเครียดของลูกกุ้งขาวระยะ Postlarva โดยการลดความเค็มอย่างเฉียบพลัน (Salinity stress test) เป็นการทดสอบความแข็งแรงและการทำงานระบบ Osmoregulation โดยที่ลูกกุ้งจะพยายามรักษาสมดุลแร่ธาตุภายในร่างกายไว้ ซึ่งจากการศึกษาของ Palacios *et al.* (2004) ที่ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการควบคุมสมดุลของแร่ธาตุในร่างกายของลูกกุ้งขาวแวนนาไมระยะ Postlarva 20 ซึ่งพบว่า อวัยวะหลักที่ใช้ในการความคุมสมดุลแร่ธาตุ คือ เหงือก และ epipodite โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ Na^+/K^+-ATPase และ Carbonic anhydrase ในกิจกรรมการแลกเปลี่ยนแร่ธาตุภายในร่างกาย ซึ่งพบกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ Na^+/K^+-ATPase ประมาณ 85% อยู่บริเวณ Posterior gill และสามารถเพิ่มการทำงานของเอนไซม์เหล่านี้โดยการเสริม HUFA ในอาหาร (Palacios *et al*., 2004; Estevez and Kanazawa, 1996; Song *et al.,* 2007) เนื่องจากเมื่อลูกกุ้งได้รับอาหารที่เสริมด้วย HUFA แล้วจะมีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของเนื้อเยื่อบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ และทำหน้าที่เป็น membrane transport ซึ่งทำหน้าที่รักษาระดับของเหลวในร่างกาย โดยการควบคุมการลำเลียงโมเลกุลของสารผ่านเข้าออกเซลล์ ด้วยสาเหตุที่กรดไขมันจำพวก HUFA มีความไม่อิ่มตัวสูงและมีจุดหลอมต่ำ ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์มีความยืดหยุ่นสูง ซึ่งถูกกำหนดโดยชนิดของกรดไขมันไม่อิ่มตัวในโมเลกุลของ Phospholipid ทำให้สามารถควบคุมการไหลผ่านเข้าออกของของเหลวและโมเลกุลของของสารต่าง ๆ ได้ดี รวมถึงการส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ Na^+/K^+-ATPase และ Carbonic anhydrase บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ จากการศึกษาในครั้งนี้ใช้การทดสอบความทนทานต่อความเครียดบางประการ

เพื่อเป็นการทดสอบความแข็งแรงของลูกกุ้ง เนื่องจากลูกกุ้งจะต้องพบกับสภาพเครียดเช่น การเปลี่ยนแปลงความเค็มจากฝนที่ตกลงมาสู่บ่อเลี้ยง และสารพิษที่เกิดขึ้นบริเวณพื้นบ่อหรือแพลงก์ตอนบางชนิด

จากผลทดลองครั้งนี้ พบว่า การทดสอบความทนทานต่อฟอร์มาลิน (Formalin stress test) และการเปลี่ยนแปลงความเค็มแบบเฉียบพลัน (Salinity stress test) ของลูกกุ้งที่ผ่านการอนุบาล ด้วย *Chaetoceros* sp. และ *S. limacinum* มีอัตราการตายสะสมน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการให้ *S. limacinum* มีผลต่อความทนทานต่อความเครียด เนื่องจากในชุดการทดลองที่ให้ *Chaetoceros* sp. และ *S. limacinum* มีปริมาณของ HUFA ในอาหารมากกว่าชุดควบคุม คือ 7.82, 5.15 และ 7.31% ในชุดการทดลองที่ 1, 2 และ 3 ส่วนในชุดควบคุมมี HUFA ทั้งหมด 3.03% ในอาหาร ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Hurtado *et al*. (2007) ที่ทำการศึกษาเกี่ยวกับผลของการให้กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (Highly unsaturated fatty acid) ต่อการตอบสนองของลูกกุ้งขาวขนาด 3.5 กรัม ในสภาพความเครียดจากการเปลี่ยนแปลงความเค็ม ซึ่งพบว่าลูกกุ้งในกลุ่มที่ได้รับกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง มีความทนทานต่อการลดความเค็มได้ดีกว่ากุ้งในกลุ่มควบคุม เนื่องจากกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงจะส่งเสริมกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ Na^+/K^+-ATPase ในระบบ Osmoregulation และ Chim *et al*. (2001) ที่ทำการทดสอบการให้กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงในกลุ่ม HUFA ในกุ้งแชบ๊วย (*Penaeus styrirostris*) ขนาด 5-7 กรัมพบว่า สามารถเพิ่มความทนทานต่อความเครียดโดยการลดอุณหภูมิจาก 28 °C เหลือ 17 °C และลดความเค็มอย่างเฉียบพลัน จาก 35 ppt เหลือ 10 ppt ซึ่งจากการทดลองโดยรวมแล้ว พบว่า การเสริม HUFA ในอาหารมีผลต่อความต้านทานต่อความเครียดเนื่องจากบทบาทและหน้าที่ของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงในกุ้งนอกจากเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญแล้วยังมีบทบาทในการรักษาสมดุลของเซลล์ในการดำเนินกิจกรรมทางชีวภาพด้วย

ในส่วนของการทดสอบความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* เป็นการประเมินระบบภูมิคุ้มกันของลูกกุ้งระยะ Postlarva 15 เมื่อต้องพบกับเชื้อก่อโรค ซึ่ง *V. harveyi* เป็นเชื้อก่อโรคที่มีความรุนแรงมากโดยเฉพาะอย่างยิ่งในโรงเพาะฟักซึ่งมีรายงานว่าทำให้เกิดการตายประมาณ 20% ภายใน 1-2 วันหลังมีการติดเชื้อ และอาจพบการตายถึง 100% ในระยะเวลาอันสั้น (ลิลา และคณะ, 2540) จากการทดลองครั้งนี้ พบว่า ลูกกุ้งกลุ่มควบคุมและทุกชุดการทดลองมีการตอบสนองต่อเชื้อ *V. harveyi* ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ซึ่งมีผลคล้ายกับการทดลองของ ปกป้องและนนทวิทย์ (2542) ที่ศึกษาผลของกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวในกลุ่มโอเมก้า-3 ที่มีอัตราส่วนของ

EPA/DHA ที่ 1/1, 1/2 และ 1/5 ต่อความเครียดและความต้านทานโรคในลูกกุ้งกุลาดำระยะ Postlarva 10 โดยการให้ผ่าน *Artemia* ซึ่งผลการทดลอง พบว่า ไม่มีผลต่อความต้านทานเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ซึ่งจากผลที่ได้ในการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า การเสริมกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงจาก *S. limacinum* ในระยะ Zoea 1- Zoea 3 ไม่มีผลต่อความต้านทานเชื้อ *V. harveyi* ในระยะ Postlarva 15 เนื่องจากลูกกุ้งที่ทำการทดลองได้รับ *S. limacinum* ตั้งแต่ระยะ Zoea 1- Zoea 3 จึงไม่อาจส่งผลในระยะยาว เมื่อพิจารณาจากอัตราการตายของลูกกุ้งในระยะ Postlarva 15 หลังจากการทดสอบความต้านทานต่อเชื้อ *V. harveyi* ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองซึ่งมีอัตราการตายไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) แต่อย่างไรก็ตามการเสริมกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงจาก *S. limacinum* ในระยะ Zoea 1- Zoea 3 มีบทบาทในด้านอื่น ๆ เช่น ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ รักษารักษาสมดุลน้ำและเกลือแร่ ซึ่งจะเพิ่มความทนทานต่อความเครียด จากการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพเช่น การเปลี่ยนแปลงความเค็มอย่างเฉียบพลัน หรือการเพิ่มปริมาณของสารพิษในสิ่งแวดล้อมเช่น แอมโมเนีย และไนไตรท์ เป็นต้น

3. การศึกษาระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (non - specific immune response) ของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *S. limacinum*

การนำ *S. limacinum* มาเป็นแหล่งของกรดไขมันไม่อิ่มตัว (HUFA) ในการเลี้ยงสัตว์น้ำในปัจจุบันเริ่มมีการใช้กันอย่างแพร่หลาย ไม่ว่าจะนำมาสกัดเพื่อนำมาเป็นแหล่งของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงซึ่งได้แก่ EPA และ DHA ในอาหารทดแทนการใช้น้ำมันจากปลาและน้ำมันสกัดจากพืชซึ่งใช้กันอยู่ในปัจจุบัน เนื่องจากในขั้นตอนการผลิตน้ำมันจากแหล่งดังกล่าวไม่สามารถควบคุมด้านคุณภาพและปริมาณกรดไขมันที่จำเป็น (Essential fatty acid) โดยเฉพาะกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง ซึ่งจำเป็นต่อการเจริญเติบโต เพิ่มความทนทานต่อความเครียด และความต้านทานโรค (Chim *et al*., 2001; Miller *et al*., 2007) ซึ่งในการเพิ่มระดับภูมิคุ้มกันโดยใช้กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงโดยเฉพาะ EPA และ DHA มีผู้วิจัยหลายท่านประสบผลสำเร็จในการศึกษาสัตว์น้ำชนิดต่าง ๆ ตัวอย่างเช่น Chim *et al*. (2001) ซึ่งพบว่า ให้กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (HUFA) ในกุ้งแชบ๊วย (*Penaeus styrirostris*) ขนาด 5-7 กรัมสามารถเพิ่มความต้านทานโรคโดยสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของขบวนการ Respiratoty burst โดยการวัดปริมาณ superoxide anion และการวัดค่า Agglutination titer ของน้ำเลือดกุ้ง และ Wu *et al*. (2003) ได้ทำการทดลองให้กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงที่อัตราส่วนของ EPA/DHA ในระดับต่าง ๆ เพื่อทดสอบความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลากะรัง (*Epinephelus malabaricus*) ซึ่งพบว่า อัตราส่วนของ EPA/DHA ที่ 1/2 และ 1/3

สามารถเพิ่มระดับการทำงานของกิจกรรมการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม (Phagocytic activity) และส่งเสริมการทำงานของระบบ Respiratory burst ในขั้นตอนการผลิต Superoxide anion (O^-_2)

ในการทดลองครั้งนี้ พบว่า การให้อาหารที่ผสม *S. limacinum* เพื่อเป็นการเสริมกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่อัตราส่วนต่าง ๆ คือ 0, 5, 10 และ 15 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เพื่อศึกษาองค์ประกอบต่าง ๆ ทางด้านระบบภูมิคุ้มกันซึ่งได้แก่ ปริมาณเม็ดเลือดรวม (Total haemocytes count) กิจกรรมการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม (Phagocytic activity) และกิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้งขาว (Bactericidal activity) กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ Phenoloxidase พบว่าปริมาณเม็ดเลือดรวมของชุดทดลองที่ให้ *S. limacinum* ผสมอาหาร 10 และ 15 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีปริมาณมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในช่วง 30 วันของการให้อาหารทดลองแสดงให้เห็นว่า กุ้งมีการตอบสนองในด้านการสร้างเม็ดเลือดเมื่อได้รับ *S. limacinum* ที่ 10 และ 15 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัมเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม การที่กุ้งได้รับ HUFA จะส่งผลโดยตรงต่อการซ่อมแซมและสร้างเซลล์เม็ดเลือด และเนื้อเยื่อต่าง ๆ นอกจาก HUFA จะเป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์แล้วยังทำหน้าที่เกี่ยวกับกลไกทางชีววิทยาของเซลล์ทำให้ดำเนินตามปกติด้วย (Hazel, 1995; Hulbert and Else, 1999) เช่น การสร้างสารในกลุ่ม eicosanoid ได้แก่ prostaglandins, leukotrienes และ thromboxane ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับกิจกรรมการเจริญเติบโต การสร้างเซลล์สืบพันธุ์ และระบบภูมิคุ้มกัน (Howard and Stanley, 1999) อย่างไรก็ตามผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่าขัดแย้งกับการศึกษาของ Chim *et al*. (2001) ที่พบว่า กุ้งแชบ๊วย (*Penaeus styrirostris*) ขนาด 5-7 กรัม ที่ผ่านการเสริมกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงในอาหาร 14 กรัม/กิโลกรัม มีค่าปริมาณเม็ดเลือดรวมไม่แตกต่างกันทางสถิติกับชุดควบคุม ($P>0.05$) ซึ่งผู้วิจัยให้เหตุผลว่ากรดไขมันที่เข้าไปในตัวกุ้งจะสะสมอยู่ภายในตัวเท่านั้นไม่สามารถส่งเสริมการสร้างเม็ดเลือดได้ การทดลองครั้งนี้ยังพบว่า เมื่อหยุดให้อาหารทดลองเป็นเวลา 10 วัน ปริมาณเม็ดเลือดรวมในชุดการทดลองที่ให้ *S. limacinum* 15 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัมยังคงมีปริมาณเม็ดเลือดสูงที่สุดและแตกต่างทางสถิติกับชุดการทดลองอื่น ($P<0.05$) ส่วนในวันที่ 20 หลังการหยุดให้อาหารทดลองไม่พบความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง ($P>0.05$) แสดงให้เห็นว่าการให้ *S. limacinum* ผสมอาหารสามารถเพิ่มระดับปริมาณเม็ดเลือดรวมได้ในกลุ่มที่ให้ *S. limacinum* 15 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม

ในส่วนการทำงานของกิจกรรมของเอนไซม์ Phenoloxidase จากการทดลองครั้งนี้ พบว่าหลังการให้อาหารทดลองที่ 10, 20 และ 30 วันกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ Phenoloxidase ในชุดการทดลองที่ให้อาหารผสม *S. limacinum* 15 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัมมีค่าสูงที่สุด และมีความ

แตกต่างทางสถิติกับชุดควบคุม ($P<0.05$) แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับชุดที่ให้อาหารผสม *S. limacinum* 10 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ซึ่งแนวโน้มของค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ Phenoloxidase เป็นไปในแนวทางเดียวกันกับการเพิ่มของปริมาณเม็ดเลือดรวม เนื่องจากเอนไซม์ Phenoloxidase จะถูกหลั่งออกมาจากเม็ดเลือด ซึ่งโดยส่วนใหญ่จะถูกหลั่งจากเม็ดเลือดชนิด granulocyte (Soderhall and Cerenius,1992) แสดงให้เห็นว่าการให้ อาหารผสม *S. limacinum* 15 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม สามารถกระตุ้นการสร้างเม็ดเลือด และการทำงานของเอนไซม์ Phenoloxidase ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Chim *et al*. (2001) ที่พบว่า การเสริมกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงในกลุ่ม HUFA ในอาหารกุ้งแชบ๊วย (*Penaeus styrirostris*) ขนาด 5-7 กรัมสามารถส่งเสริมการทำงานในระบบภูมิคุ้มกันจากการวัดจากค่า Agglutination titer และ ค่า Superoxide anion แต่อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) ของปริมาณเม็ดเลือดรวม (Total haemocytes) ในส่วนของกิจกรรมของเอนไซม์ Phenoloxidase หลังการหยุดให้อาหารทดลองเป็นเวลา 10 วัน ยังคงมีค่าสูงอย่างต่อเนื่องและสอดคล้องกับปริมาณเม็ดเลือดรวมที่มีปริมาณสูงหลังการหยุดให้ แสดงให้เห็นว่าการให้อาหารผสม *S. limacinum* 15 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม สามารถส่งเสริมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันได้ต่อเนื่องเป็นเวลา 10 วันหลังการหยุดให้

ผลของการศึกษากิจกรรมการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม (Phagocytic activity) และ Phagocytic index พบว่า ไม่มีความแตกต่างในทางสถิติระหว่างชุดทดลองและชุดควบคุม ซึ่งกลไกในการเพิ่มระดับของกิจกรรมการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมนั้นมีผู้วิจัยหลายท่านได้ทำการทดลองและให้ความเห็นดังนี้ Cinader *et al*. (1983) ได้ทำการทดลองกับหนูให้ความเห็นว่าระดับกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงโดยให้อัตราส่วน EPA/DHA เท่ากับ 1/2 ในอาหารที่หนูกินจะทำให้องค์ประกอบของ Phospholipid ที่เยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดขาวเปลี่ยนไป ซึ่งกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงที่พบบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์นั้นจะมีความยืดหยุ่นกว่ากรดไขมันไม่ที่ไม่อิ่มตัว จะทำให้เกิดขบวนการ Chaemotaxis ได้รวดเร็วขึ้นและสามารถทำงานได้ดีในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมด้วยวิธี Phagocytosis และ Wu *et al*. (2003) ซึ่งทำการทดลองในปลากะรัง (*Epinephelus malabaricus*) ให้ความเห็นว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมของกรดไขมันไม่อิ่มตัวระหว่าง EPA/DHA คือ 1/2 และ 1/3 จะสามารถส่งเสริมการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวในกระบวนการ Phagocytosis และ ขบวนการ Respiratory burst แต่ในการทดลองครั้งนี้ พบว่า อัตราส่วนของ EPA/DHA มีค่า คือ 2.2/1, 1/1.5 และ 1/3ในชุดการทดลองที่ผสม *S. limacinum* 5, 10 และ 15 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ตามลำดับ ซึ่งจากการศึกษาของ Watanabe (1993) และ Song *et al*. (2007) ได้ให้ความเห็นว่า การให้กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงนั้นจะต้องมีความสมดุลระหว่างอัตราส่วนของ EPA/DHA จึงจะส่งผลต่อการเจริญเติบโต

ความทนทานต่อความเครียด รวมถึงการส่งเสริมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน และเมื่อพิจารณาค่า Bactericidal activity จากการทดลองครั้งนี้ พบว่า ชุดการทดลองที่ให้อาหารผสม *S. limacinum* 10 และ 15 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีกิจกรรมนี้สูงขึ้นกว่ากลุ่มอื่น ๆ ซึ่งมีผลในแนวทางเดียวกับการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันกับกุ้งชนิดอื่น เช่น การใช้เบต้ากลูแคนในกุ้งขาว (ฉัทชนัน และคณะ, 2549) เปปติโดกลัยแคน และวิตามินซีในกุ้งกุลาดำ (วัชริยา, 2549; พชรวดี และคณะ, 2549)

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

จากการทดลองอนุบาลลูกกุ้งขาวตั้งแต่ระยะ Zoea 1 – Zoea 3 ด้วย *Schizochytrium limacinum* เพื่อเพิ่มอัตรารอด ความทนทานต่อความเครียด และความต้านทานต่อเชื้อก่อโรค พบว่า การอนุบาลลูกกุ้งด้วย *S. limacinum* แบบเสริมและทดแทน *Chaetoceros* sp. ที่อัตราส่วน *Chaetoceros* sp. 75% + *S. limacinum* 25% และ *Chaetoceros* sp. 100% + *S. limacinum* 25% มีผลทำให้ลูกกุ้งมีอัตรารอดสูงขึ้น และทนทานต่อความเครียดได้ดีจากการทดสอบโดยการแช่ฟอร์มาลินและการลดความเค็มอย่างเฉียบพลัน แต่ไม่มีผลต่อความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคชนิด *Vibrio harveyi*

การทดลองใช้ *S. limacinum* ในรูปแบบ spray-dried ผสมอาหารเพื่อเป็นแหล่งกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง และศึกษาระดับภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของกุ้ง ซึ่งได้แก่ Total haemocytes count, Phenoloxidase activity, Percent phagocytosis, Phagocytic index และ Bactericidal activity พบว่า การใช้ *S. limacinum* ผสมอาหาร 15 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีผลทำให้ Total haemocytes count, Phenoloxidase activity และ Bactericidal activity สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แต่ไม่มีผลต่อค่า Percent phagocytosis และ Phagocytic index ส่วนในด้านการเจริญเติบโต พบว่า ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$)

ดังนั้นการใช้ *S. limacinum* ในการอนุบาลลูกกุ้งขาวในระยะ Zoea1- Zoea3 ควรใช้ *Chaetoceros* sp. เป็นอาหารปกติและเสริมด้วย *S. limacinum* 25% ส่วนการเลี้ยงกุ้งขาววัยรุ่นควรใช้ *S. limacinum* ผสมอาหาร 15 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม และควรให้ทุกวันตลอดการเลี้ยง

ข้อเสนอแนะ

ในการอนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อนนั้น อาหารเป็นปัจจัยหลักในการอยู่รอดและการเจริญเติบโต เนื่องจากช่วงวิกฤตของสัตว์น้ำเป็นช่วงหลังจากใช้อาหารจากไข่แดงที่ติดตัวมาแต่กำเนิดหมด การใช้จุลินทรีย์ชนิด *Schizochytrium limacinum* เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการอนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อน เนื่องจากมีปริมาณโปรตีน และกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานที่จำเป็นต่อการสร้างเซลล์และเนื้อเยื่อในการเจริญเติบโต โดยการให้ได้หลากหลายรูปแบบไม่ว่าจะเป็นการให้ในรูปแบบที่ยังคงรูปร่างเซลล์อยู่ ในรูปแบบ Spray-dried หรือจะเป็นการให้ผ่านทาง *Artemia* และ Rotifer ดังนั้นควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในแนวทางการอนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อนชนิดต่าง ๆ และในส่วนของการเสริม *S. limacinum* ในระยะที่เลี้ยงในบ่อดินควรเสริม *S. limacinum* ในอาหารเม็ดสำเร็จรูปอย่างต่อเนื่อง เพื่อเพิ่มระดับภูมิคุ้มกันตลอดระยะเวลาการเลี้ยง

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กิจการ ศุภมาตย์, สุภาพ เกียรติทับทิว และ R. Hoffmann. 2543. ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ: III. การศึกษาทางจุลทรรศน์อิเลคตรอนของเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำ. **วารสารสงขลานครินทร์**. ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22 (ฉบับพิเศษ): 589-596.

กลุ่มวิเคราะห์การค้าสินค้าประมงระหว่างประเทศ. 2551. รายงานปริมาณและมูลค่าการส่งออกกุ้งทะเลปี พ.ศ. 2542-2551. กองประมงต่างประเทศ. กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

ฉัทชนัน ศิริไพศาล, นนทวิทย์ อารีย์ชน, เรืองวิชญ์ ยุ้นพันธ์ และนิติ ชูเชิด. 2549. การใช้เบต้ากลู-แคนเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*, Boone), น.279-290. *ใน* **การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44,** 30 มกราคม - 2 กุมภาพันธ์ 2549.

บุญอ้อม โฉมที. 2550. **หลักการวางแผนการทดลอง**. ภาควิชาสถิติ, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ปกป้อง อุ่มอยู่ และนนทวิทย์ อารีย์ชน. 2542. ผลของกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว (กลุ่มโอเมก้า 3) ที่มีอัตราส่วนของกรด Eicosapentaenoic (EPA) และกรด Docosahexaenoic (DHA) ต่างกันต่อความเครียดและความต้านทานโรคของกุ้งโดยการให้ผ่านอาร์ทีเมีย, น. 308-319. *ใน* **เอกสารประกอบการประชุมกุ้งทะเลแห่งชาติครั้งที่ 1 "การวิจัยกับการพัฒนาอุตสาหกรรมกุ้งทะเล"** โรงแรมบีพี จังหวัดสงขลา.

ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์. 2546. ศาสตร์การเลี้ยงกุ้งขาวลิโทพีเนียสแวนนาไม. **สัตว์น้ำ** 14 (162): 119-122.

ประจวบ หลำอุบล. 2530. **ความรู้เรื่องการเลี้ยงกุ้ง.** ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล. คณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพ ฯ.

_____. 2537. **สรีรวิทยาของกุ้ง**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

พชรวดี เลาหะมงคลรักษ์, นนทวิทย์ อารีย์ชน, สุนทราภรณ์ ลิ่มสกุล และสุริยัน ธัญญกิจจานุกิจ. 2549 . **การใช้วิตามินซีเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius)**, น. 291-302. *ใน* การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44, 30 มกราคม – 2 กุมภาพันธ์ 2549

เพ็ญศรี บุญเรือง และสุชาติ สว่างอารีย์รักษ์. 2539. **นิเวศวิทยาของกุ้งวัยอ่อนกลุ่มพีเนอิดบริเวณป่าไม้ชายเลนและพื้นที่ใกล้เคียงในอ่าวพังงา,** น. 320–332. *ใน* รายงานการสัมมนาวิชาการประจำปี 2539 กรมประมง วันที่ 18 – 20 กันยายน 2539 ณ ห้องประชุมอานนท์และสถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืด บางเขน.

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

ลิลา เรืองแป้น, วารินทร์ ธนาสมหวัง และกุลวรา แสงรุ่งเรือง. 2540. แบคทีเรียในกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในบ่อระบบพัฒนา, น. 3-10. *ใน* **การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 35**, 3-5 กุมภาพันธ์ 2540.

วัชริยา ภูรีวิโรจน์กุล. 2549. **การกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* Fabricius**. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

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

สุทธินี ลิ้มธรรมมหิศร, มนทกานติ ท้ามติ้น และคมคาย ลาวัณยวุฒิ. 2551. **การเสริมเชื้อรา *Schizochytrium* sp. แบบผงเพื่อเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการของโรติเฟอร์ (*Brachionus rotundifermis*, Tschugunoff, 1921) และไรน้ำเค็ม (*Artemia* sp.) เพื่อใช้อนุบาลลูกปลากะพงขาว (*Lates calcarifer* Bloch, 1790).** เอกสารวิชาการฉบับที่ 53/2551.สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง. กรมประมง. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ.

Alvarez, A., I. Racotta, O. Arjona and E. Palacios. 2004. Salinity stress test as a predictor of survival during growout in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture** 237: 237–249.

Barclay, W. and S. Zeller. 1996. Nutritional enhancement of *n*-3 and *n*-6 fatty acids in rotifers and *Artemia* nauplii by feeding spray-dried *Schizochytrium* sp. **J. World Aquacult. Soc.** 27: 314–322.

Boeing, P. 1997. Use of spray-dried *Schizochytrium* sp. as a partial algal replacement for juvenile bivalves. **J. Shellfish.** 16: 284.

Chim, L., P. Lemaire, M. Delaporte, G. Le Moullac, R. Galois and J. L. M. Martin. 2001. Could a diet enriched with n-3 highly unsaturated fatty acids be considered a promising way to enhance the immune defenses and the resistance of Penaeid prawns to environmental stress. **Aquac. Res**. 32**:** 91–94.

Cinader, B., M.T. Clandinin, T. Hosokawa and N. M. Robblee. 1983. Dietary fat alters the fatty acid composition of lymphocyte membranes and the rate at which suppressor capacity is lost. **Immunology Letters** 6: 331–337.

Darley, W. M. and M. S. Fuller. 1970. Cell wall chemistry and taxonomic position of *Schizochytrium*. **Amer. J. bot.** 57, 761.

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

Estevez, A. and A. Kanazawa. 1996. Fatty acid composition of neural tissues of normally pigmented juveniles of Japanese flounder using rotifer and *Artemia* enriched in n-3 HUFA. **Fish. Sci.** 62: 88–93.

Gonzalez-Felix, M.L., A. L. Lawrence, D.M. Gatlin, and Perez-Valazquez. 2002. Growth, survival and fatty acid composition of juvenile *Litopenaeus vannamei* fed different oils in the presence and absence of phospholipids. **Aquaculture** 207: 151-167.

Hall, M., R. Wang, R. Van Antwerpen, L. Sottrup-Jensen and K. Soderhall. 1999. The crayfish plasma clotting protein: a vitellogenin-related protein responsible for clot formation in crustacean blood. **Proc. Natl. Acad. Sci**. U. S. A. 96: 1965-1970.

Harel, M., W. Koven, I. Lein, Y. Bar, P. Behrens, J. Zohar and A. R. Place. 2002. Advanced DHA, EPA and ARA enrichment materials for marine aquaculture using single cell heterotrophs. **Aquaculture** 213: 347-362.

Hazel, J.R. 1995. Thermal adaptation in biological membranes: is homeoviscous adaptation the explanation. **Annu. Rev. Physiol.** 57: 19–42.

Holmblad, T. and K. Soderhall. 1999. Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in crustacean, possible role in immunity. **Aquaculture** 172: 111-123.

Honda , D., T. Yokochi, T. Nakahara, M. Erata and T. Higashihara. 1998. *Schizochytrium limacinum* sp. nov., a new thraustochytrid from a mangrove area in the West Pacific Ocean. **Mycol. Res**. 102: 439–448.

Honda , D., T. Yokochi, T. Nakahara, S. Ragkumar, A. Nakagiri, K. Schaumann and T. Higashihara. 1999. Molecular phylogeny of labyrinthulids and thraustochytrids based on the sequencing of 18s ribosomal RNA gene. **J. Eukaryot. Mirrobiol.** 46(6): 637-647.

Howard, R. and D. Stanley. 1999. The tie that binds: eicosanoids in invertebrate biology. **Ann. Entomol. Soc. Am.** 92: 880–890.

Hulbert, A.J. and P.L. Else. 1999. Membranes as possible pacemakers of metabolism. **J. Theor. Biol.** 199: 257–274.

Itami, T., Y. Takahashi, E. Tsuchihira and H. Igusa. 1994 . Enhancement of disease resistance of kuruma prawn *Penaeus japonicus* and increase in phagocytic activity of prawn haemocyte after oral administration of β-glucan (Schizophyllan), pp 375-379. *In* L.M. Chou, A.D. Munro, T.J. Lam, T. W.Chen, L.K.K. Cheong, J.K. Hooi, H.W. Khoo, V.P.E. Phang, K.F.Shim and C.H. Tan, eds. **The Third Asian Fisheries Forum**. Asian Fisheries Society, Manila, Philippines.

Kamlangdee, N. and K. W. Fan. 2003. Polyunsaturated fatty acids production by *Schizochytrium* sp. isolated from mangrove. **Songklanakarin J. Sci. Technol**. 25(5):643-650.

Kawabata, S., T. Muta and S. Iwanaga. 1996. The clotting cascade and defense molecules found in the hemolymph of horseshoe crab, pp. 255–283. *In* K. Söderhäll, S. Iwanaga and G. R. Vasta, eds. **New Directions in Invertebrate Immunology**. SOS Publication, Fair Haven.

Kiron, V., A. Gunji, N. Okamoto, S. Satoh, Y. Ikeda and T. Watanabe. 1993. Dietary nutrients dependent variations on natural killer-activity of the leukocytes of rainbow trout. **Gyobyo Kenkyu** 28: 71-76.

Kopacek, P., L. Grubhoffer and K. Soderhall. 1993. Isolation and characterization of a hemagglutinin with affinity for lipopolysaccharides from plasma of the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. **Dev. Comp. Immunol**. 17: 407-418.

Langdon, C. and E. Onal. 1999. Replacement of living microalgae with spray-dried diets for the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Aquaculture** 180(3-4): 283-294.

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

Marcus, J. 1984. The eicosanoid in biology and medicine. **J. Lipid. Res**. 25 : 1511-1518.

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

Montano-Perez, K., G. Yepiz-Plascencia, I. Higuera-Ciapara and F. Vargas-Albores. 1999. Purification and characterization of the clotting protein from the white shrimp *Penaeus vannamei*. **Comp. Biochem. Physiol**. 122: 381 – 387.

Moss, S. T. 1991. Thraustochyrids and other zoosporic marine fungi. pp. 415-425. *In* D. J. Patterson and J. Larsen, eds. Clarendon Press. **The Biology of Free-living Heterotrophic Flaggellate**. Oxford, U. K.

Olive, L. S. 1975**. The Mycotozoans**. Academic Press: New York, U.S.A.

Palacios, E., A. Bonilla, A. Perez, I. S. Racotta and R. Civera. 2004. Influence of highly unsaturated fatty acids on the responses of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae to low salinity. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 299: 201-215.

Palacios, E. and I. S. Racotta. 2007. Salinity stress test and its relation to future performance and different physiological responses in shrimp postlarvae. **Aquaculture** 268: 123-135.

Laven P. and P. Sorgeloos. 2000. Experiences on importance of diet for shrimp Postlarval quality. **Aquaculture** 191: 169-176.

Perez Farfante, I. and B. Kensley. 1997. **Penaeoid and Sorgestiod Shrimp and Prawns of the World. Key and Diagnoses for the Family and Genera**. Memories du Museum National. Paris.

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

Reitan, K. I., J. R. Rainuzzo and Y. Olsen. 1994. Influence of lipid composition of live feed on growth, survival and pigmentation of turbot larvae. **Aquac. Int.** 2: 33–48.

Rodriguez, C., J.A. Perez, A. Lorenzo, M.S. Izquierdo and J.R. Cejas. 1994. n-3 HUFA requirement of larva gilhead seabream Sparus aurata when using high levels of eicosapentaenoic acid. **Comp. Biochem. Physiol.**107A. 693-698.

Sargent, J. R., J. G. Bell., M. V.Bell., R. J. Henderson. and D. R. Tocher. 1995. Requirement criteria for essential fatty acids. **J. Appl. Ichthyol.** 11: 183–198.

Soderhall, K. and L. Cerenius. 1992. Crustacean immunity. **Annual Review of Fish Diseases** 2: 3-23.

Soderhall, K., L. Cerenius. and M. W. Johansson. 1996. The prophenoloxidase activating system in invertebrates. pp. 229-253 *In* K. Soderhall, S. Iwanaga and G. R. Vasta, eds. **New Directions in Invertebrate Immunology**, SOS Publications, Fair Haven.

Soderhall, K. and L. Hall. 1984. Lipopolysaccharide induced activation of prophenoloxidase activating system in crayfish haemocyte lysate**. Biochem. Biophys. Acta.** 797: 99-104.

Song, X., X. Zhang, N. Guo, L. Zhu and C. Kuang. 2007. Assessment of marine thraustochytrid *Schizochytrium limacinum* OUC88 for mariculture by enriched feeds. **Fish. Sci.** 73 : 565–573.

Sparrow, F. K. 1943. **The Aquatic Phycomycetes**. University of Michigan Press: Ann Arbor, U.S.A.

Stanley-Samuelson, D. W. and R. H. Dadd. 1983. Long-chain polyunsaturated fatty acids: patterns of occurrence in insects. **Insect Biochem.** 13: 549–558.

Van de Braak. C. T. B. 2002. **Haemocytic defence in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*).** Ph.D. thesis, Wageningen Institute of Animal Sciences. Wageningen University. Wageningen, The Netherlands.

Vargas-Albores, F., M. A. Guzman and J. L. Ochoa. 1993. A lipopolysaccharide-binding agglutinin isolated from brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes) haemolymph. **Comp. Biochem. Physiol.** 104: 407-413.

Vargas-Albores, F., F. Jimenez-Vega and K. Soderhall. 1996. A plasma protein isolated from brown shrimp (*Penaeus californiensis*) which enhances the activation of prophenoloxidase system by β-1,3-glucan. **Dev. Comp. Immunol.** 20: 299-306.

Vargas-Albores, F., F. Jimenez-Vega and G. Yepiz-Plascencia. 1997. Purification and comparison of β - 1,3-glucan binding protein from white shrimp (*Penaeus vannamei*). **Dev. Comp. Immunol.** 116: 453-458.

Watanabe, T. 1993. Importance of docosahexaenoic acid in marine larval fish. **J. World Aquacult.** Soc. 24 : 152–161.

Wu, F. C., Y.Y.Ting and H. Y. Chen. 2003. Dietary docosahexaenoic acid is more optimal than eicosapentaenoic acid affecting the level of cellular defence responses of the juvenile grouper *Epinephelus malabaricus*. **Fish and Shellfish Immunol.** 14: 223–238.

Yeh, M. S., Y. L. Chen and I. H.Tsai. 1998. The hemolymph clottable proteins of tiger shrimp, *Penaeus monodon,* and related species. **Comp. Biochem. Physiol.** 121: 169-176.

Yongmanitchai, W., W. Chatdumrong, S. Limtong and W. Worawattanmateekul. 2007. Optimization of docosahexaenoic acid (DHA) production and improvement of astaxanthin content in a mutant *Schizochytrium limacinum* isolated from mangrove forest in Thailand. **Kasetsart J.** (Nat. Sci.) 41(2): 324-334.

ภาคผนวก

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือด K-199

1.1 Medium-199

ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ Medium-199 ละลายในน้ำกลั่น อัตราส่วน M-199 1 กรัมละลายน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร และเติม $NaHCO_3$ 0.44 กรัม

1.2 Salt mixture ประกอบด้วย

- KCl 0.4 กรัม
- $MgCl_2.6H_2O$ 3.3 กรัม
- $NaH_2PO_4.2H_2O$ 0.05 กรัม
- $MgSO_4.7H_2O$ 3.0 กรัม

ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

1.3 NaCl

ละลาย NaCl 11 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

1.4 $CaCl_2.H_2O$

ละลาย $CaCl_2.H_2O$ 0.9 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

1.5 L-glutamin

ละลาย L-glutamin 0.015 กรัมในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร

2. การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ K-199 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2.1 ใช้สารละลายดังต่อไปนี้

- M-199 50 มิลลิลิตร
- NaCl 10 มิลลิลิตร
- $CaCl_2.H_2O$ 10 มิลลิลิตร
- L-glutamin 1 มิลลิลิตร
- Hepes 0.238 กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตรและปรับ pH ด้วย HCl หรือ NaOH ให้อยู่ในช่วง 7.3-7.6

2.2 เติม tri- sodium citrate dehydrate ($C_6H_5Na_3.2H_2O$) 10 กรัม

3. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ Prophenoloxidase activity

3.1 สารละลาย Cacodylate buffer pH 7.4

เตรียมได้ดังนี้ คือ ผสมสารละลาย 0.2M Sodium Cacodylate ปริมาตร 50 มิลลิลิตร สารละลาย 0.2 M HCl ปริมาณ 2.7 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่น 47.3 มิลลิลิตร

3.2 L-dyhydrophenylalanine (L-DOPA)

L-dyhydrophenylalanine 4 มิลลิกรัมในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร

3.3 สารละลาย Trypsin

ใช้ 0.1% Trypsin ใน Cacodylate buffer

4. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ Phagocytic index activity

4.1 สารละลาย Shrimp saline เตรียมจาก

- NaCl 8.4 กรัม
- $MgCl_2.6H_2O$ 10 กรัม
- $MgSO_4.7H_2O$ 2 กรัม
- $CaCl_2.H_2O$ 2.25 กรัม
- KCl 0.7 กรัม
- Glucose 1 กรัม
- Hepes 2.38 กรัม

ผสมในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรอง 0.22 μm เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส

4.2 Heat-kill yeast

มีวิธีการเตรียมดังนี้คือ

1) ใช้ Baker's Yeast 0.5 กรัม ผสมใน 0.9% NaCl 250 มิลลิลิตร ต้มเป็นเวลา 1 ชั่วโมงหรือยีสต์แตกเป็นเม็ดออกจากกัน

2) ล้างด้วย Shrimp saline หลังจากนั้นปั่นล้างทำความสะอาดที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที 3 ครั้ง

3) ปรับความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์ด้วยสารละลาย Shrimp saline ให้มีความเข้มข้น 5×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

5. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์โปรตีน

1. Reagent a
   - เตรียมจาก 2% weight / volumn Na_2CO_3 ละลายใน 0.1 M NaOH

2. Reagent b
   - เตรียมจาก 0.5% $CuSO_4$ ละลายใน 1% Potassium tatrate

3. Reagent c
   - เตรียมจาก reagent a 50 มิลลิลิตร รวมกับ reagent b 1 มิลลิลิตร

4. Reagent d
   - เตรียมจาก Folin 1 ส่วนผสมน้ำ 2 ส่วน

6. การคำนวณปริมาณเม็ดเลือด (Total Hemocyte count) ของกุ้งทดลองโดยใช้ Haemacytometer

ปริมาตรของ hemacytometer (1 ช่องของ 9 ช่องใหญ่)

= กว้าง x ยาว x สูง

= 1 mm x 1 mm x 0.1 mm

= $0.1\ mm^3$

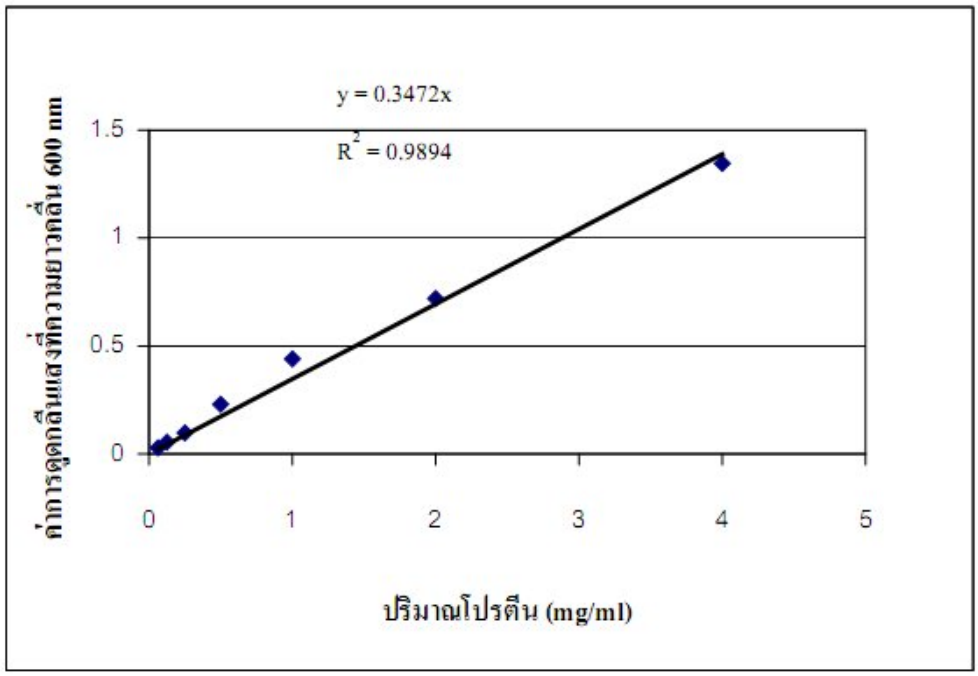
จำนวนเซลล์เม็ดเลือด /mm^3 = เม็ดเลือดที่นับได้

จำนวนเซลล์เม็ดเลือด /ml^3 = เซลล์เม็ดเลือดที่นับได้ x 10^4 x ค่า dilution

7. การคำนวณกิจกรรมเอนไซม์ Phenoloxidase

กำหนดให้ค่าดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลง 0.001 = 1 unit

Phenoloxidase specific activity = unit / min / mg protein



ภาพผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานค่าดูดกลืนแสงโปรตีน (Bovine Serum Albumin) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร โดยวิธีของ Lowry (1951)

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นายทรงทรัพย์ อรุณกมล
วัน เดือน ปี ที่เกิด	28 กันยายน 2524
สถานที่เกิด	อ. เมือง จ. สกลนคร
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (การประมง) มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ตำแหน่งปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและ/หรือรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-