



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ)
.....
ปริญญา

.....
เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

.....
เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การใช้เบต้ากลูแคนเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งขาว
(*Litopenaeus vannamei* Boone)

Application of betaglucan as Immunostimulant in Pacific White Shrimp
(*Litopenaeus vannamei* Boone)

นามผู้วิจัย นางสาวณัฏชนัน ศรีไพศาล

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(.....
ผู้ช่วยศาสตราจารย์นนทวิทย์ อารีรักษ์, Ph.D.)

กรรมการ

(.....
อาจารย์เรืองวิทย์ ชื่นพันธ์, D.Tech.Sc.)

กรรมการ

(.....
ผู้ช่วยศาสตราจารย์นิติ ชูเชิด, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(.....
ผู้ช่วยศาสตราจารย์วราห์ เทพาคูดี, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(.....
รองศาสตราจารย์วินัย อาจคงหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 5 เดือน เมษายน พ.ศ. 2549

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การใช้เบต้ากลูแคนเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei* Boone)

Application of Betaglucan as Immunostimulant in Pacific White Shrimp

(*Litopenaeus vannamei* Boone)

โดย

นางสาวนัทชนัน ศิริไพศาล

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ)

พ.ศ. 2549

ISBN 974-16-1462-4

ฉันทนัน ศิริไพศาล 2549: การใช้เบต้ากลูแคนเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งขาว
(*Litopenaeus vannamei* Boone) ปรินญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ)
สาขาวิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ปรธานกรรมการที่ปรึกษา:
ผู้ช่วยศาสตราจารย์นันทวิทย์ อาริย์ชน, Ph.D. 55 หน้า
ISBN 974-16-1462-4

การศึกษาการใช้เบต้ากลูแคนเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei* Boone) โดยประเมินจากองค์ประกอบทางภูมิคุ้มกันต่าง ๆ ได้แก่ total haemocyte count, phenoloxidase specific activity, bactericidal activity และความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* พบว่ากุ้งขาวที่ได้รับเบต้ากลูแคน 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 2 สัปดาห์ มีระดับภูมิคุ้มกันแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) จากกลุ่มที่ได้รับเบต้ากลูแคน 1 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัมและกลุ่มควบคุม แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) จากกลุ่มที่ได้รับเบต้ากลูแคน 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม การศึกษาเพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสม พบว่ากุ้งขาวที่ได้รับเบต้ากลูแคน 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ภายในเวลา 1 เดือน นาน 4 สัปดาห์ มีระดับภูมิคุ้มกันสูงกว่ากลุ่มที่ให้ 2 และ 3 สัปดาห์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และระดับภูมิคุ้มกันยังคงมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมประมาณ 4 สัปดาห์หลังจากหยุดให้สารเบต้ากลูแคน และเมื่อให้เบต้ากลูแคนอีกในระดับเท่าเดิม พบว่ากุ้งขาวมีระดับภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้น ดังนั้นในการเลี้ยง ในกุ้งขาวที่ใช้เวลาประมาณ 90 - 110 วัน จึงควรใช้เบต้ากลูแคนที่ 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 1 เดือนในช่วงเดือนที่ 2 ของการเลี้ยง และหยุดให้ 1 เดือน จากนั้นจึงให้อีกครั้งที่ระดับ และระยะเวลาเท่าเดิม ซึ่งจะมีผลในการเพิ่มระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวให้สูงขึ้นตลอดช่วงระยะเวลาของการเลี้ยง

ฉันทนัน ศิริไพศาล
ลายมือชื่อนิติ


ลายมือชื่อประธานกรรมการ

3 / 04 / 2549

Chatchanan Siripaisan 2006: Application of Betaglucan as Immunostimulant in Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone). Master of Science (Aquaculture), Major Field: Aquaculture, Department of Aquaculture. Thesis Advisor: Assistant Professor Nontawith Areechon, Ph.D. 55 pages.
ISBN 974-16-1462-4

Application of betaglucan as immunostimulant was studied in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone). The immune parameters including total haemocyte count, phenoloxidase specific activity, bactericidal activity and resistance against pathogenic bacteria (*Vibrio harveyi*) were studied. Optimum concentration was determined which indicated that betaglucan at 3 g/kg feed could significantly ($P<0.05$) enhance those immune parameters when compared to control and betaglucan at 1 g/kg but not significantly different from 5 g/kg after 2 weeks of application in feed. Second part of the research was to investigate the optimum time for the application of betaglucan at 3 g/kg during one month period. It was found that four week application could significantly ($P<0.05$) enhance the immune parameters compared to two and three week application. Furthermore, these significant elevated parameters lasted for another four weeks after the application of betaglucan had been stopped when compared to the control. And when the application of betaglucan was repeated after four weeks of normal feed, the immune parameters were enhanced again. Based upon these findings, for the culture of Pacific white shrimp which takes about 90-110 days, we recommend the use of betaglucan at 3 g/kg for four consecutive weeks during the second month of the culture, normal feed for four weeks and repeat the application again if needed. This should significantly enhance the immune levels of Pacific white shrimp throughout the crop.

Chatchanan Siripaisan

Student's signature

Nontawith Areechon 31/04/2006

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อารีย์ชน, Ph. D. ประธานกรรมการ
ที่ปรึกษา ที่ได้ช่วยเหลือในการวางแผนงานวิจัย ตลอดจนให้คำปรึกษาและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์
ฉบับนี้ ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์เรืองวิทย์ ชื่นพันธ์, D. Tech. Sc. กรรมการวิชาเอก
ผู้ช่วยศาสตราจารย์นิติ ชูเชิด, Ph. D. กรรมการวิชาการ และ อาจารย์จินตนา สและน้อย, Ph. D.
ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่ให้ความกรุณาแนะนำตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้เสร็จสมบูรณ์ยิ่งขึ้น
และขอขอบพระคุณ อาจารย์วัชรียา ภูริวิโรจน์กุล และ อาจารย์ประพันธ์ศักดิ์ ศิริษะภูมิ, Ph. D. ที่
กรุณาให้คำปรึกษาและความรู้เกี่ยวกับการทำงานวิจัยในครั้งนี้เป็นอย่างดี พร้อมทั้งคำแนะนำที่ดีใน
เรื่องอื่น ๆ นอกเหนือจากเรื่องงานวิจัย

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่สนับสนุนทุนในการทำงานวิจัยใน
ครั้งนี้

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา ที่สนับสนุนทุนการศึกษา น้ำชัยวัฒน์ น้ำไพศาล ลิ้มปะนวรรณกุล
ตลอดจนเพื่อน ๆ และน้อง ๆ ห้องปฏิบัติการสุขภาพสัตว์น้ำ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัย
เกษตรศาสตร์ ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำในการทำงานวิจัยในครั้งนี้ จนวิทยานิพนธ์
ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์

ฉัทชนัน ศิริไพศาล

มีนาคม 2549

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
กึ่งขาว	4
ระบบมีคัมกันของกึ่ง	8
เบต้ากลูแคน	13
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	17
อุปกรณ์และสารเคมี	17
วิธีการทดลอง	19
สถานที่และระยะเวลาทำการวิจัย	25
แหล่งทุนสนับสนุน	25
ผลการทดลอง	
วิจารณ์ผลการทดลอง	38
สรุปผลการทดลอง	42
ข้อเสนอแนะ	43
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	44
ภาคผนวก	51

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ปริมาณเม็ดเลือดรวม ($\times 10^6$ เซลล์/มล.) ของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปผสมเบต้ากลูแคนระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 2 สัปดาห์	27
2 กิจกรรมเอนไซม์ phenoloxidase (unit/min/mg protein) ของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปผสมเบต้ากลูแคนระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 2 สัปดาห์	28
3 อัตราส่วนการเจือจางมากที่สุดของซีรัมที่สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียลง 50 เปอร์เซ็นต์ (bactericidal activity) ของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมเบต้ากลูแคนระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 2 สัปดาห์	29
4 อัตราการตาย (%) ของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปผสมเบต้ากลูแคนระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 2 สัปดาห์ หลังจากฉีดเชื้อ <i>Vibrio harveyi</i> เป็นเวลา 7 วัน	30
5 ปริมาณเม็ดเลือดรวม ($\times 10^6$ เซลล์/มล.) ของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปผสมเบต้ากลูแคน 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัมเป็นเวลา 0, 2, 3 และ 4 สัปดาห์ ให้อาหารปกติ 4 สัปดาห์และให้อาหารผสมเบต้ากลูแคนอีกครั้ง	33
6 กิจกรรมเอนไซม์ phenoloxidase (unit/min/mg protein) ของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปผสมเบต้ากลูแคน 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัมเป็นเวลา 0, 2, 3 และ 4 สัปดาห์ ให้อาหารปกติ 4 สัปดาห์และให้อาหารผสมเบต้ากลูแคนอีกครั้ง	35
7 อัตราส่วนการเจือจางมากที่สุดของซีรัมที่สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียลง 50 เปอร์เซ็นต์ (bactericidal activity) ของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปผสมเบต้ากลูแคน 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัมเป็นเวลา 0, 2, 3 และ 4 สัปดาห์ ให้อาหารปกติ 4 สัปดาห์และให้อาหารผสมเบต้ากลูแคนอีกครั้ง	37

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 สูตรโครงสร้างของเบต้ากลูแคน	13
2 ปริมาณเม็ดเลือดรวม ($\times 10^6$ เซลล์/มล.) ของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปผสมเบต้ากลูแคนระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 2 สัปดาห์	27
3 กิจกรรมเอนไซม์ phenoloxidase (unit/min/mg protein) ของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปผสมเบต้ากลูแคนความเข้มข้นระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 2 สัปดาห์	28
4 อัตราการตาย (%) ของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปผสมเบต้ากลูแคนระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 2 สัปดาห์ หลังจากฉีดเชื้อ <i>Vibrio harveyi</i> เป็นเวลา 7 วัน	31
5 ปริมาณเม็ดเลือดรวม ($\times 10^6$ เซลล์/มล.) ของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปผสมเบต้ากลูแคน 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัมเป็นเวลา 0, 2, 3 และ 4 สัปดาห์	34
6 กิจกรรมเอนไซม์ phenoloxidase (unit/min/mg protein) ของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปผสมเบต้ากลูแคน 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัมเป็นเวลา 0, 2, 3 และ 4 สัปดาห์	36
 ภาพผนวกที่	
1 กราฟมาตรฐานโปรตีน (Bovine Serum Albumin) โดยวิธี Lowry	55

การใช้เบต้ากลูแคนเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งขาว

(*Litopenaeus vannamei* Boone)

Application of Betaglucan as Immunostimulant in Pacific White Shrimp

(*Litopenaeus vannamei* Boone)

คำนำ

การเลี้ยงกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei* Boone) ในประเทศไทยมีจำนวนมากขึ้น เนื่องจากมีปัจจัยหลายด้านที่เอื้อต่อปริมาณผลผลิตที่ได้ดีกว่ากุ้งกุลาดำ เช่น โตเร็ว ให้ผลผลิตดี ใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงสั้นและมีต้นทุนที่ต่ำกว่าการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ประกอบกับเป็นช่วงที่เกษตรกรกำลังประสบปัญหาโรคระบาด การโตช้าและมีขนาดแตกต่างกันเมื่อจับขายของกุ้งกุลาดำในหลายพื้นที่ เกษตรกรส่วนหนึ่งจึงหันมาให้ความสนใจกุ้งขาว พื้นที่ของการเลี้ยงกุ้งกุลาดำส่วนใหญ่จึงถูกปรับเปลี่ยนมาเลี้ยงกุ้งขาว จึงนับเป็นจุดเริ่มต้นที่กุ้งขาวเข้ามาเป็นกุ้งเศรษฐกิจตัวใหม่ในอุตสาหกรรม การเลี้ยงกุ้งของไทย ซึ่งระบบการเลี้ยงกุ้งขาวเป็นเช่นเดียวกับการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ซึ่งเป็นการเลี้ยงแบบพัฒนา (intensive) มีการปล่อยกุ้งในอัตราหนาแน่น ให้อาหารปริมาณมาก และเป็นการเลี้ยงแบบระบบปิด ดังนั้นอาหารที่เหลือและของเสียจากการขับถ่ายของกุ้งจึงสะสมอยู่มาก ทำให้สภาพแวดล้อมในบ่อเสื่อมโทรม ปัจจัยเหล่านี้ล้วนแต่ก่อความเครียดและความอ่อนแอให้กับกุ้ง ทำให้ระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งลดลง จึงเกิดการติดเชื้อได้ง่ายขึ้น

ที่ผ่านมามีโรคหลายชนิดที่สร้างความเสียหายในการเลี้ยงกุ้งขาว โดยเฉพาะโรคทอรา ซึ่งเกิดจากเชื้อ Taura syndrome virus (TSV) ทำให้กุ้งขาวตายเป็นจำนวนมาก (ชลอ และ พรเลิศ, 2547) และเนื่องจากโรคดังกล่าวมีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัสจึงไม่สามารถรักษาได้ วิธีการที่ดีที่สุดในการควบคุมโรคคือการใช้ลูกพันธุ์ที่ปลอดเชื้อไวรัสและปรับเปลี่ยนรูปแบบการเลี้ยงเป็นระบบปิด ซึ่งเป็นการเลี้ยงในเชิงป้องกันการเกิดโรคมากกว่าการแก้ไข

การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Immunostimulant) เป็นวิธีหนึ่งในการเสริมสุขภาพ ให้กุ้งมีระดับภูมิคุ้มกันสูงขึ้น มีความสามารถในการป้องกันและกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย ปัจจุบันได้มีการศึกษากลุ่มของสารที่เกี่ยวข้องในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดยพบว่าเบต้ากลูแคน

สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงของกิ้งได้ อย่างไรก็ตามการศึกษาส่วนใหญ่เป็นการศึกษาผลต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Scholz *et al.*, 1999) ซึ่งยังขาดในส่วนของการประยุกต์ใช้ การศึกษาครั้งนี้เป็นการใช้เบต้ากลูแคนเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกิ้งขาว โดยศึกษาถึงระดับของเบต้ากลูแคนที่ผสมในอาหารและระยะเวลาการให้เบต้ากลูแคนที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกิ้งขาว

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาระดับเบต้ากลูแคนที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว
2. ศึกษาระยะเวลาการให้เบต้ากลูแคนในระดับที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว

การตรวจเอกสาร

กุ้งขาว

อนุกรมวิธาน

กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ถูกค้นพบโดย Boone ในปี ค.ศ. 1931 ชื่อวิทยาศาสตร์ของกุ้งชนิดนี้เมื่อก่อนไม่มีคำว่า “Lito” จะใช้เพียงคำว่า “Penaeus” ต่อมาในปี 1997 Dr. Isabel Perez Farfante และ Dr. Brian Kenley ได้ลำดับอนุกรมวิธานของกุ้งชนิดนี้ โดยให้ใช้ชื่อเป็น *Litopenaeus vannamei*

อนุกรมวิธานของกุ้งขาว Perez Farfante and Kenley (1997) มีดังนี้

Phylum Arthropoda

Class Crustacea

Subclass Malacostraca

Order Decapoda

Suborder Natantia

Family Penaeidae

Genus *Litopenaeus*

Species *Litopenaeus vannamei*

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Litopenaeus vannamei*

ลักษณะทั่วไป

ลักษณะทั่วไปของกุ้งสกุลนี้ คือ กรี (rostrum) มีความยาวปานกลาง มีฟันกรีด้านล่าง 2-4 อัน ในวัยอ่อนกรีจะยาวกว่า antennular peduncle และเมื่อโตขึ้นจะมีขนาดสั้นลง บางครั้งอาจมีความยาวถึงครึ่งหนึ่งของปล้องที่ 2 หนวดคู่ที่ 1 (antennular) บริเวณ carapace มีหนวดคู่ที่ 2 (antenna) และ hepatic spine ชัดเจน ไม่มี orbital spine และ pterygostomian spine ไม่มี postocular sulcus ขนาดของ postrostral carina มีหลายขนาด ในบางครั้งอาจพบว่ายาวถึงขอบด้านหลังของเปลือกคลุมหัว ไม่มี branchiocardiac carina, longitudinal sutures และ transverse sutures ลำตัวปล้องที่ 6 จะมีสันเรียงตัวตามขวางของลำตัวด้านบน (cicatrices) 3 อัน ร่องในแนวยาวลำตัวด้านบน (dorsolateral sulcus) แคบมากหรืออาจไม่มี ส่วนหาง (telson) เรียบ หนวดคู่ที่ 1 (antennule) ไม่มี parapenaeid spine, antennular flagella สั้นกว่าส่วน carapace มาก แผ่นระยางค์ของ maxilla คู่ที่ 1 ยาวมี 3-4 ปล้อง ส่วนปลายเป็นเส้นเหมือน flagella ischial spine อยู่ปล้องที่ 1 และ basial spine ในปล้องที่ 2 ของขาเดิน (pereopod) คู่ที่ 1 (Perez Farfante and Kensley, 1997; จิรพร, 2547) ลักษณะที่สังเกตได้เด่นชัดของกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei* คือ สีของลำตัวเป็นสีขาว กรีด้านบนจะหยักและถี่ปลาย กรีตรงโดยที่มีฟันกรีด้านล่าง 2 อัน และด้านบน 8 อัน ความยาวของกรีจะยาวกว่าลูกตาไม่มาก และเห็นลำไส้ชัดเจนกว่ากุ้งขาวอื่นๆ (กัญญา, 2545) กุ้งชนิดนี้มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพของน้ำ ดันตกใจง่าย ลักษณะที่พิเศษของกุ้งสายพันธุ์นี้คือสามารถปรับตัวเข้ากับสภาวะแวดล้อมภายใต้ระบบการเพาะเลี้ยงได้ โดยทำการเพาะเลี้ยงได้ทั้งในน้ำที่มีระดับความเค็ม 0-35 ppt แต่ระดับความเค็มที่เจริญเติบโตได้ดีคือ 10-22 ppt อุณหภูมิของน้ำในระดับที่เหมาะสมคือ 26-29 องศาเซลเซียส ซึ่งอาจทำการเพาะเลี้ยงได้ทั้งในบริเวณพื้นที่ชายฝั่งหรือบริเวณพื้นที่ในแผ่นดินที่เป็นเขตพื้นที่ความเค็มต่ำ (ปิยะบุตร, 2546ก)

ถิ่นที่อยู่อาศัยและการแพร่กระจาย

กุ้งขาว อาศัยอยู่ตามแนวชายฝั่ง บริเวณที่เป็นพื้นโคลน ลงไปจนถึงระดับความลึก ประมาณ 72 เมตร หรือ 235 ฟุต พบบริเวณชายฝั่งมหาสมุทรแปซิฟิกตะวันออก จากตอนเหนือของประเทศเม็กซิโก เรื่อยลงมาตามแนวชายฝั่งทะเลประเทศโคลัมเบีย เปรู เวเนซุเอลา เบลีซ กัวเตมาลา อเมริกา และเปอร์โตริโก (Dore and Frimodt, 1987) โดยมีการเลี้ยงเป็นจำนวนมากที่ประเทศเอกวาดอร์ (Holthuis, 1980)

อาหารและการกินอาหาร

นิพนธ์ (2522) รายงานว่า อนุปัสัยของกุ้งสกุล *Penaeus* เป็นพวกที่กินซากพืชและซากสัตว์ สิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก ที่อยู่ในโคลนเลน กุ้งขาวในธรรมชาติจะกินอาหารที่มีชีวิตบริเวณพื้นโคลนทั้งพืช สัตว์ที่มีขนาดเล็กและซากเน่าเปื่อย (Iversen and Hale, 1992) พฤติกรรมการกินอาหารของกุ้งชนิดนี้ คือ หากินทุกระดับน้ำ แต่ชอบกินอาหารบริเวณกลางน้ำเป็นส่วนใหญ่ สำหรับอาหารที่ตกลงไปอยู่บริเวณพื้นบ่อแล้ว กุ้งจะโฉบลงไปกินขึ้นมาเพะกินในกรณีที่มีอาหารยังไม่แตกตัว ส่วนกรณีที่มีอาหารแตกตัวแล้วกุ้งจะลงโฉบหรือคลานตามพื้นบ่อ ความต้องการอาหารและพฤติกรรมการกินอาหารของสัตว์น้ำเป็นสิ่งสำคัญที่ผู้เลี้ยงควรคำนึงถึง เพราะสัตว์น้ำแต่ละชนิดมีความต้องการสารอาหารแตกต่างกัน และยังมีพฤติกรรมการกินอาหารที่แตกต่างกันด้วย กุ้งมีความต้องการอาหารเพื่อการเจริญเติบโตและซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอของร่างกาย Lei *et al.* (1989) กล่าวว่า กุ้งที่เลี้ยงในความเค็มต่ำนั้นจะใช้โปรตีนเป็นแหล่งพลังงานมากกว่าไขมัน นอกจากนี้ปริมาณโปรตีนที่มากเกินไปก็ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของกุ้งขาว (Smith *et al.*, 1985) ในปัจจุบันการเลี้ยงกุ้งใช้อาหารเม็ดสำเร็จรูปที่มีคุณค่าทางโภชนาการตามความต้องการของกุ้ง โดยให้มีปริมาณโปรตีน 30-32 เปอร์เซ็นต์ คาร์โบไฮเดรต 16-17 เปอร์เซ็นต์ กาก 3-4 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 3.5-4 เปอร์เซ็นต์ และความชื้น 10-11 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีส่วนประกอบของ ปลาป่น เปลือกกุ้งป่น เปลือกหอยป่น กากถั่วลิสง กากถั่วเหลือง ไขมันสัตว์ วิตามิน แร่ธาตุ ไคโตแซน ฟอสเฟต และสารอนุมคุณภาพอาหารสัตว์ (ปิยะบุตร, 2546)

โรคที่เกิดกับกุ้งขาว

Limsuwan (2003) รายงานเกี่ยวกับโรคที่สำคัญที่เกิดกับกุ้งขาว ในประเทศไทยไว้ดังนี้คือ

1. White Spot Syndrome Virus (WSSV) หรือโรคไวรัสดวงขาว โรคนี้เกิดกับกุ้งทะเลทุกชนิดรวมทั้งกุ้งขาวด้วย การระบาดของโรคนี้ก่อให้เกิดความสูญเสียอย่างมากในพื้นที่เลี้ยงกุ้งกุลาดำและกุ้งขาวของประเทศไทย เนื่องจากพื้นที่การเลี้ยงอยู่ในบริเวณเดียวกัน ในช่วงอากาศร้อน ปัญหาโรคดวงขาวจะมีน้อยกว่าช่วงอากาศเย็น กุ้งที่เป็นโรคนี้จะมีลักษณะจุดขาวหรือดวงขาว มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.1- 2 มิลลิเมตร บริเวณเปลือก ซึ่งลักษณะที่ผิดปกตินี้เกิดจากการสะสมแคลเซียมและฟอสฟอรัสที่ผิดปกติ กุ้งที่ป่วยจะทยอยตายไปเรื่อย ๆ ภายใน 5 - 7 วัน กุ้งจะตายเกือบหมด

2. Taura Syndrome Virus (TSV) เป็นโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส กุ้งขาวที่เป็นโรคนี้จะสังเกตเห็นว่า ลำตัวมีสีชมพูถึงแดงและบริเวณปลายแพนหางจะมีสีแดงเข้มขึ้น ลำตัวอ่อนนุ่ม ผิดจากกุ้งที่เป็นปกติ เหนืออกกุ้งบางตัวอาจจะบวมพบได้ในกุ้งอายุประมาณ 25-60 วัน หลังจากปล่อยลงเลี้ยง กุ้งจะตายเป็นจำนวนมากหลังจากได้รับเชื้อแล้วลอกคราบครั้งแรก กุ้งที่ตายจะมีสีเข้มอมชมพู

กุ้งป่วยบางตัวจะว่ายน้ำเข้าหาขอบบ่อ บางส่วนตายที่พื้นบ่อ กุ้งที่เหลือรอดบางตัวจะมีเปลือกลักษณะคล้ายแผลสีดำ กุ้งเหล่านี้บางตัวจะมีชีวิตรอดได้ ถ้าสภาพบ่อมีคุณภาพน้ำที่ดี และสภาวะอากาศดี แต่ถ้าสภาพแวดล้อมไม่ดีขึ้น กุ้งเหล่านี้อาจจะตายในการลอกคราบครั้งต่อไป

3. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) หรือโรคตัวพิการ เป็นโรคที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัส พบได้ทั่วไประหว่างการเลี้ยง กุ้งขาวที่ติดเชื้อจะมีลักษณะที่สังเกตเห็นได้ง่าย คือ กริมีลักษณะผิดปกติ กุดหรือสั้นกว่าปกติ อาจบิดไปทางซ้ายหรือขวา นอกจากนี้ยังพบว่าลำตัวกุ้งคดงอ ลักษณะดังที่กล่าวมาจะสังเกตเห็นได้หลังจากปล่อยลูกกุ้งลงเลี้ยงในบ่อประมาณ 30 วัน กุ้งที่มีการติดเชื้อจะโตช้ามาก

3. Gill disease โรคเหงือกที่พบมากในกุ้งขาว คือ เหงือกดำ มักเกิดในบ่อที่น้ำมีสีเข้ม หรือมีเลนกระจายอยู่ทั่วบ่อ ซึ่งมีสาเหตุมาจากมีสารอินทรีย์สะสมอยู่มากภายในบ่อ ก่อนที่จะกุ้งแสดงอาการป่วยหรือเริ่มตาย มักจะพบว่ากุ้งมีเหงือกสีดำ ถ้าแก้ปัญหาไม่ทัน กุ้งจะตาย ซึ่งการแก้ปัญหาทำได้ง่าย คือ เมื่อพบว่าเหงือกของกุ้งบางตัวเริ่มมีสีเข้ม ควรจะลดอาหารลงเปลี่ยนถ่ายน้ำเพิ่มขึ้น และเพิ่มเครื่องให้อากาศ ก็จะหายไปเอง เมื่อสภาพในบ่อดีขึ้น หลังจากกุ้งลอกคราบ 2-3 ครั้ง เหงือกสีดำก็จะหายไปเอง

ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง

ระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์กลุ่ม Crustaceans ไม่มีภูมิคุ้มกันโรคแบบจำเพาะซึ่งทำงานโดยแอนติบอดีแต่มีการต่อต้านสิ่งแปลกปลอมเป็นแบบไม่จำเพาะเจาะจง (non-specific immune response) ซึ่งส่วนใหญ่เกิดจากกิจกรรมของเม็ดเลือด น้ำเลือดและเนื้อเยื่อต่าง ๆ ในร่างกาย (Soderhall and Cerenius, 1992) ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งแบ่งเป็น 2 ระบบ (Ratcliffe *et al.*, 1985) คือ ระบบภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์ (cellular defenses) และ ระบบภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยสารน้ำ (humoral defenses)

ชนิดและหน้าที่ของเม็ดเลือดกุ้งทะเล

เซลล์ที่มีบทบาทในระบบภูมิคุ้มกัน คือ เซลล์เม็ดเลือด (hemocyte) ซึ่งมีรายงานครั้งแรกโดย Haeckel ในปี ค.ศ. 1857 และได้จำแนกเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งทะเลออกเป็น 3 ชนิด (Martin and Graves, 1985; Hose *et al.*, 1990; Vargas-Albores, 1995) โดยการใช้การมีหรือไม่มี จำนวน ขนาด การย้อมสีและโครงสร้างของแกรนูลในไซโตพลาสซึม ดังนี้

1. hyaline cells (non-granular cells, hyalinocyte หรือ hyalocytes) เป็นเซลล์เม็ดเลือดที่มีขนาดเล็กที่สุด รูปร่างกลมแบน ผิวเรียบ ไม่มีแกรนูล นิวเคลียสขนาดใหญ่อยู่กลางเซลล์มีขอบเขตของไซโตพลาสซึมน้อย มีหน้าที่ phagocytosis สิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกาย (Soderhall and Smith, 1986)

2. semi-granular cells (semigranulocyte) มีลักษณะกึ่งกลางระหว่าง hyaline cell และ granulocyte มีรูปร่างเป็นรูปไข่หรือรูปกระสวย ขนาดของเซลล์มีความกว้าง 4.2-6.8 ไมครอน ยาว 9.0-14.2 ไมครอน (กิจการ และคณะ, 2543) นิวเคลียสมีขนาดเล็กตรงกลางเซลล์หรือขอบเซลล์ ภายในไซโตพลาสซึมมีแกรนูลขนาดเล็ก ลักษณะเซลล์ไม่แน่นอน มักแตกสลายตัวได้ง่าย เป็นเม็ดเลือดที่ทำหน้าที่รับรู้และมีปฏิกิริยาตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอม ในการสร้าง nodule formation และ encapsulation รวมทั้งใน phenoloxidase activating system

4. granular cell (granulocyte) เซลล์ชนิดนี้มีขนาดใหญ่ที่สุด รูปร่างเป็นรูปไข่ นิวเคลียส มีขนาดเล็ก รูปร่างโค้งคล้ายไต เส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์ 8-10 ไมครอน กว้าง 7.2-7.8 ไมครอน ยาว 12.2-14.6 ไมครอน (กิจการ และคณะ, 2543) ภายในไซโตพลาสซึมมีเกรนูลขนาดใหญ่ เมื่อเทียบกับ semigranulocyte (Baucha, 1981) มีหน้าที่หลักเกี่ยวกับการทำงานของระบบ phenoloxidase activating system (Soderhall and Cerenius, 1992)

เม็ดเลือดทั้ง 3 ชนิด ที่กล่าวจะไหลไปกับเลือดทั่วร่างกาย และทำหน้าที่เกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันเท่านั้น (Ratcliffe *et al.*, 1985) เม็ดเลือดจะเพิ่มจำนวนมาทดแทนส่วนที่แก่และตายไปจากเนื้อเยื่อที่สร้างเม็ดเลือด ซึ่งเรียกว่า hemopoietic tissue ในกึ่งพบได้ตรงตำแหน่ง ด้านบนของกระเพาะอาหารและโคนขาเดิน โดยอยู่เป็นกลุ่มในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและอยู่ใกล้เอนโดเธลิอัม ในน้ำเลือดจะมีรงควัตถุ hemocyanin ทำหน้าที่ในการแลกเปลี่ยนก๊าซ

ระบบภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์ (cellular defenses)

กระบวนการกลืนทำลาย (Phagocytosis)

Phagocytosis เป็นหน้าที่สำคัญของเม็ดเลือดในการทำลายสิ่งแปลกปลอมทั้งที่มีชีวิตและไม่มีชีวิตที่เข้าไปในร่างกายซึ่งเป็นแบบไม่จำเพาะเจาะจง (McKay and Jenkin, 1970) โดยมีการเคลื่อนที่ของ haemocytes ชนิด hyalinocyte ไปยังบริเวณที่มีสิ่งแปลกปลอมเข้ามาในร่างกาย (Fontaine and Lightner, 1975) เริ่มจากการยึดกันระหว่างสิ่งแปลกปลอมกับผิวของเซลล์ จากนั้นผิวเซลล์เว้าเข้าไปเกิดเป็น phagosome และจะสัมผัสกับ lysosome เกิดเป็น phagolysosome มีเอนไซม์หลายชนิดใน lysosome ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายเรียกว่า acid hydrolases ที่สามารถลดขนาดของสิ่งแปลกปลอมทั้งหลายให้เหลือเป็นหน่วยย่อย ๆ และมีการแตกตัวของออกซิเจน ซึ่งออกซิเจนเหล่านี้จะถูกรีดิวซ์เป็น superoxide anion ด้วย NADPH oxidase ต่อจากนั้นจากนั้นจะถูกเปลี่ยนเป็น hydrogen peroxide โดยการเร่งปฏิกิริยาด้วย superoxide dismutase และมีการทำลายอนุภาคภายใน phagolysosome (Klein, 1982)

Nodule formation และ encapsulation

ในกรณีที่สิ่งแปลกปลอมมีจำนวนเพิ่มขึ้นมาก หรือมีขนาดใหญ่เกินกว่า haemocyte ไม่สามารถใช้วิธีการ phagocytosis จะเกิดการรวมกลุ่มกันของ haemocyte จนทำให้เกิดเป็น nodule ล้อมรอบสิ่งแปลกปลอมเพื่อไม่ให้กระจายไปทั่วร่างกาย ซึ่งมีประสิทธิภาพในการจำกัดขอบเขตของการแพร่กระจายของเชื้อโรคได้มาก (Smith and Soderhall, 1986) โดย nodule formation จะเกิดขึ้นเมื่อสิ่งแปลกปลอมนั้นเข้ามาเป็นจำนวนมาก ส่วน encapsulation จะเกิดขึ้นเมื่อสิ่งแปลกปลอมนั้นมีขนาดใหญ่ เช่น เชื้อรา ไข่ของปรสิต Persson and Soderhall (1987) รายงานว่า semigranulocyte เป็น haemocyte พวกแรกที่เข้ามาเรียงตัวล้อมรอบสิ่งแปลกปลอมที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางใหญ่กว่า 10 ไมครอน ทำให้เกิดเป็นรูปร่างคล้าย capsule

ระบบภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยสารน้ำ (humoral defenses)

การแข็งตัวของเลือด (hemolymph clotting)

เป็นกระบวนการแรกที่เกิดขึ้นภายหลังได้รับบาดเจ็บ เพื่อป้องกันการสูญเสียเลือด และป้องกันการติดเชื้อโรคผ่านบาดแผล เกิดขึ้นโดยเม็ดเลือดชนิด hyalin cell ซึ่งมีแกรนูลอยู่ภายในและเมื่อแกรนูลแตกออก สารเคมีที่ถูกปล่อยออกมาจะไปกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของ coagulogen ซึ่งเป็นสารที่ทำให้เกิดการจับตัวเป็นก้อน การที่เลือดไม่สามารถแข็งตัวได้อาจเกิดจาก

ที่เม็ดเลือดมีปริมาณลดลงเนื่องจากการติดเชื้อ (Martin *et al.*, 1993) และพบว่าการแข็งตัวของเลือดจะเกิดขึ้นกับการสร้างเม็ดสีดำ (melanin) ที่เกิดขึ้นในระบบ phenoloxidase (Johansson and Soderhall, 1985)

Phenoloxidase activating system

เป็นระบบการทำลายเชื้อโรคและควบคุมการกระจายของเชื้อโรคภายในตัวกุ้ง ซึ่งเป็นระบบภูมิคุ้มกันที่สำคัญ โดยมีเอนไซม์ prophenoloxidase (proPO) เป็นสารเริ่มต้นของระบบที่พบได้ในแกรนูลที่อยู่ในเซลล์เม็ดเลือด (Soderhall and Smith, 1986) Sung *et al.* (1996) พบว่า

prophenoloxidase ของกุ้งกุลาดำ กุ้งก้ามกรามและกุ้งขาว ส่วนใหญ่จะอยู่ในไซโตพลาสซึมของเม็ดเลือดทั้ง semigranulocyte และ granulocyte ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Hose *et al.* (1987) ว่ากิจกรรมของเอนไซม์ในเม็ดเลือด มีค่าสูงกว่าในน้ำเลือด ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยน inactive prophenoloxidase ไปเป็น active prophenoloxidase ที่ไวต่อปฏิกิริยา ที่จะเปลี่ยนสารกลุ่มฟีนอลจากกรดอะมิโนบางชนิดไปเป็นสารประกอบ quinone โดยกระบวนการ oxidation และเปลี่ยนไปเป็น melanin ในที่สุด โดย melanin จะช่วยยับยั้งการแพร่กระจายของเชื้อแบคทีเรีย

สารออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (bactericidin)

สารออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย พบได้ในส่วนของซีรัมและส่วนใสของเซลล์เม็ดเลือดที่แตก (Noga *et al.*, 1996) สามารถถูกชักนำให้มีปริมาณสูงขึ้นได้เมื่อได้รับสารกระตุ้น มีความจำเพาะต่อเชื้อบางชนิด และไม่ทนต่อความร้อน (ชัยชาญ, 2545)

Agglutinin

พบโดยธรรมชาติในน้ำเลือดของครัสเตเชียน นอกจากจะเป็นสารก่อให้เกิดการจับตัวของสิ่งแปลกปลอมแล้ว ยังมีหน้าที่เป็น opsonin กระตุ้นกระบวนการ phagocytosis ในการป้องกันสิ่งแปลกปลอมของเซลล์ด้วย (Vargas-Albores, 1995)

การศึกษาเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง

Fontaine and Lightner (1975) รายงานเกี่ยวกับการตอบสนองของเซลล์ต่อการบาดเจ็บของกุ้งสกุล *Penaeus* ว่าเมื่อร่างกายได้รับบาดเจ็บปฏิกิริยาแรกที่เกิดขึ้นคือ มีการเคลื่อนที่ของ hemocytes ไปยังบริเวณที่บาดเจ็บ ต่อมาจะเกิดกระบวนการ phagocytosis กับสารอนุภาคเล็ก ๆ แล้วตามด้วย encapsulation เกิดเป็น multilayer capsules ซึ่งจะเห็น hemocytes รูปกระสวยบริเวณตรงกลาง ส่วนรอบนอกจะเป็น hemocytes ที่มีขนาดใหญ่ขึ้น หลังจากมี cellular infiltration และ encapsulation แล้วจะเกิดโครงข่ายของ fibroblast หนาแน่นขึ้นและมี collagen like fibres เกิดเป็นแผลถาวรและมีการสร้างรงควัตถุสีดำจากกระบวนการ melanization

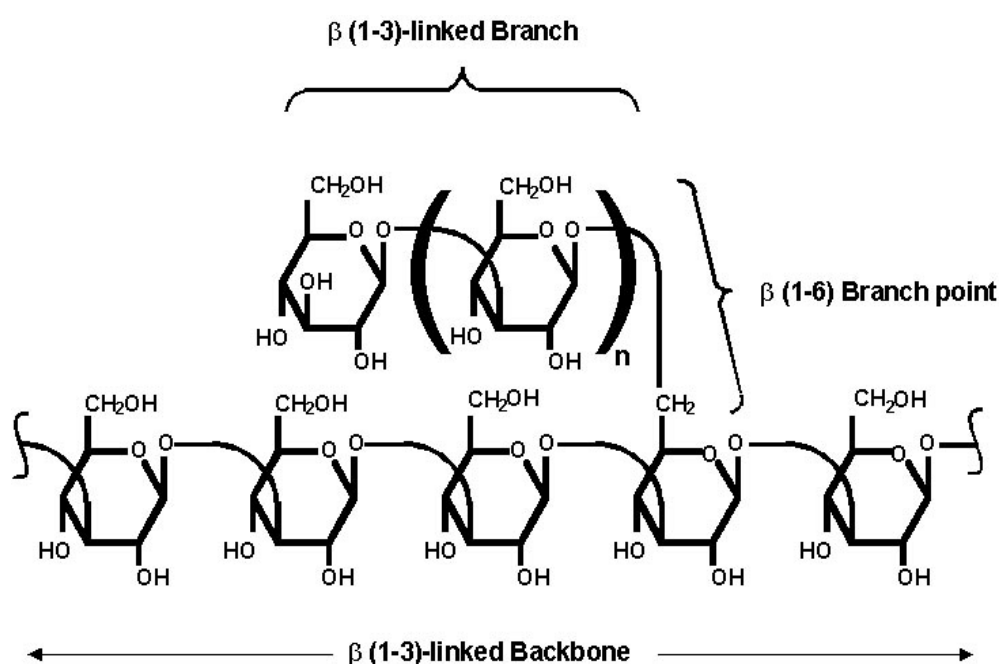
Perazzolo and Barracco (1997) พบว่า activity ของเอนไซม์ phenoloxidase ขึ้นอยู่กับการทำงานของเม็ดเลือดชนิดที่มีแกรนูโลและเอนไซม์บางส่วนในซีรัม เมื่อเกิดการติดเชื้อจะส่งผลให้แกรนูโลในเม็ดเลือดลดลง จึงทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase ลดลงด้วย

Soderhall and Hall (1984) รายงานว่า ระบบ phenoloxidase activating system สามารถกระตุ้นได้โดย lipopolysaccharide, peptidoglycan และ betaglucan ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่พบในผนังเซลล์ของแบคทีเรียและยีสต์

Supamattaya *et al.*(1994) รายงานว่า หลังจากการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวและหัวเหลืองในกิ้งกูดดำ จะทำให้ปริมาณเม็ดเลือดในระบบไหลเวียนลดลงอย่างมาก รวมทั้งค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสก็ลดลงด้วย เนื่องจากจำนวนแกรนูโลไซโตพลาสซึมของเซลล์เม็ดเลือดลดลงนั่นเอง

เบต้ากลูแคน

เบต้ากลูแคน เป็นองค์ประกอบหลักในผนังเซลล์ของยีสต์ โครงสร้างของ เบต้ากลูแคน ประกอบด้วยส่วนที่เป็นโซ่หลักมีการเรียงตัวต่อกันของกลูโคสที่ตำแหน่ง beta 1-3 และระหว่าง โมเลกุลจะเชื่อมกันที่ตำแหน่ง beta 1-6 (Bacon *et al.*, 1969)



ภาพที่ 1 สูตรโครงสร้างของเบต้ากลูแคน

ที่มา : Immunity Information Network (n.d.)

เบต้ากลูแคน สามารถสกัดได้จาก จุลินทรีย์หลายชนิด เช่น รา แบคทีเรีย และ ยีสต์ โดยมาก นิยมสกัดจากยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ผนังเซลล์ของยีสต์ประกอบด้วยกลูแคน 30-35 เปอร์เซ็นต์ แมนแนน 30 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นสารประเภทโพลีแซคคาไรด์ที่ละลายน้ำได้ เป็น

ไขมัน 10 เปอร์เซ็นต์ และ เป็นโคติน 1-2 เปอร์เซ็นต์ และสารอินทรีย์อื่นๆ อีกเล็กน้อย (กำเนิด, 2534) มลฤดี และคณะ (2543) ได้ทำการสกัดสารเบต้ากลูแคนจากผนังเซลล์ของยีสต์ ด้วยวิธีการสกัด 2 วิธี วิธีแรกสกัดผนังเซลล์ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 5.0 โมลาร์ พีเอช 8 อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส และวิธีที่ 2 สกัดผนังเซลล์กับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.75 โมลาร์ อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส พบว่าวิธีแรกให้สาร เบต้ากลูแคน 20 เปอร์เซ็นต์ วิธีที่ 2 ให้สาร เบต้ากลูแคน 30 เปอร์เซ็นต์ของผนังเซลล์

บทบาทของเบต้ากลูแคนต่อระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำ

กิจการ และคณะ (2543ก) ศึกษาผลของเบต้ากลูแคน ต่อการเจริญเติบโต ภูมิคุ้มกันและความต้านทานโรคในกึ่งกุลาคำ โดยทดลองในกึ่งน้ำหนักเฉลี่ย 0.6, 1.5 และ 6.5 กรัม ให้อาหารผสมเบต้ากลูแคนต่างกัน 4 ระดับคือ 0, 0.25, 0.5 และ 1 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม และทดสอบความสามารถในการต้านทานโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ของกึ่งที่ได้รับอาหารผสมเบต้ากลูแคน เป็นเวลา 6 สัปดาห์ในกึ่งกุลาคำขนาดเล็กและ 5 สัปดาห์ในกึ่งกุลาคำขนาดใหญ่ พบว่ากึ่งกุลาคำมีอัตราการรอดสูงขึ้นเมื่อได้รับอาหารผสมเบต้ากลูแคนในปริมาณที่สูงขึ้น โดยกึ่งกุลาคำขนาดเล็กที่ได้รับอาหารผสมเบต้ากลูแคน 0, 0.25, 0.50 และ 1 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีอัตราการรอด 50, 68, 69 และ 81 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนกึ่งขนาดใหญ่มีอัตราการรอด 33, 33, 60 และ 73 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ปริมาณเม็ดเลือดรวมและการผลิตซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออนของเม็ดเลือดกึ่งที่ได้รับอาหารผสมเบต้ากลูแคนในระดับต่างๆ พบว่าค่าสูงสุดได้จากชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมเบต้ากลูแคน 1 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

มลฤดี และคณะ (2543) ได้ทำการสกัดสารเบต้ากลูแคนจากยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ในแต่ละวิธีซึ่งให้ปริมาณสารเบต้ากลูแคนแตกต่างกัน และนำเบต้ากลูแคนที่ได้ไปเลี้ยงกึ่งกุลาคำที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 15 กรัม โดยมีอาหาร 4 สูตร ดังนี้ คือ อาหารชุดควบคุม อาหารที่ผสมผนังเซลล์ยีสต์ 8.4 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม อาหารที่ผสมสารเบต้ากลูแคน ก่อนการทำให้บริสุทธิ์ 1.7 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม และอาหารที่ผสมสารเบต้ากลูแคนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ 1.0 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม พบว่ากึ่งกุลาคำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมเบต้ากลูแคน ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ให้ผลการทดลองดีที่สุด โดยให้ค่าปริมาณเม็ดเลือดรวมสูงที่สุด และมีความต้านทานต่อเชื้อ *Vibrio harveyi* โดยคิดเป็นอัตราการตายเท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์

Knaap (1993) รายงานว่าสารพอกเปปติโดกลัยแคน โลโปโพลีแซคคาไรด์ และ เบต้ากลูแคน จะมีผลในการกระตุ้นให้เกิดการเชื่อมต่อของ beta -1,3 glucan และ beta -1,3 glucan binding protein ให้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนแล้วไปกระตุ้นที่ membrane receptor ของ semigranulocyte ให้เกิดการหลั่งของสารต่าง ๆ ออกมาเช่น เอนไซม์ phenoloxidase ซึ่งทำให้เกิด การออกซิไดซ์สารฟีนอล ให้เป็นควิโนน แล้วเปลี่ยนเป็นเมลานินที่ทำหน้าที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ โรคที่เข้าสู่ร่างกาย

Devaraja *et al.* (1998) รายงานว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมเบต้ากลูแคน ระดับ 0.1 เปอร์เซ็นต์ เพียงวันเดียวสามารถชักนำให้เม็ดเลือดกำจัดไวรัสได้สูงขึ้น

Vargas-Albores *et al.* (1998) พบว่าสารประกอบจากผนังเซลล์ของแบคทีเรีย และฟังไจ คือ โลโปโพลีแซคคาไรด์ และเบต้า-กลูแคน มีผลให้ระบบภูมิคุ้มกันแบบเซลล์ (cellular immunity) เช่น phagocytosis melanization และ encapsulation สูงขึ้น

Campa-Cordova *et al.* (2002) ศึกษาเกี่ยวกับการทำงานของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) ของกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) โดยนำกุ้งขาว แช่ในสารละลายเบต้ากลูแคน ที่ผสมกับ สารละลาย Sulfate polysaccharide ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 1 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร ตามลำดับ เป็นเวลา 6 ชม. ตรวจวัดระดับการทำงานของ SOD ในเม็ดเลือด และที่ 24 ชม. สามารถตรวจวัดระดับการทำงานของ SOD ใน กล้ามเนื้อของกุ้งที่แช่ในสารละลายทั้ง 2 ชนิด มีค่า เพิ่มขึ้นในระดับ 1.5 และ 1.4 เท่าของกลุ่มที่ไม่ได้แช่สารละลายตามลำดับ และเมื่อทดสอบโดยการ ฉีดสารละลายทั้ง 2 ชนิดแก่กุ้ง พบว่าค่าปริมาณเม็ดเลือดรวมลดลงหลังจากฉีดสารละลายแล้ว 24 ชม. แต่พบว่าที่ 48-120 ชม. ค่าปริมาณเม็ดเลือดรวมและโปรตีนในเม็ดเลือดจะเพิ่มสูงขึ้น ซึ่ง สามารถสรุปว่าการให้ เบต้ากลูแคน ที่ผสมกับสารละลาย sulfate polysaccharide ตามความเข้มข้น ดังกล่าว สามารถกระตุ้นให้กุ้งมีการสร้าง SOD ได้สูงขึ้น โดยเอนไซม์ชนิดนี้จะมีหน้าที่สำคัญใน การเป็น antioxidant และป้องกันการเกิด oxidative stress ซึ่งจะช่วยให้เนื้อเยื่อไม่ถูกทำลายจากพวก อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกาย

Suphantharika (2003) ทำการสกัดสารเบต้ากลูแคน จากยีสต์ที่ใช้แล้วจากอุตสาหกรรมผลิตเบียร์ โดยสกัดด้วย NaOH ที่ความเข้มข้น 1 N ที่ 90 ± 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ได้สารเบต้ากลูแคนที่มีความบริสุทธิ์ประมาณ 51 เปอร์เซ็นต์ และนำมาทดลองใช้เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกิ้งกูดดำ โดยให้กิ้งกูดดำได้รับอาหารที่ไม่ผสมเบต้ากลูแคน อาหารผสมเบต้ากลูแคนที่มีความบริสุทธิ์ 51 เปอร์เซ็นต์ และอาหารผสมผนังเซลล์ของยีสต์ เป็นเวลาติดต่อกัน 3 วัน แล้วทำการวัดกิจกรรมเอนไซม์ phenoloxidase พบว่า เลือดของกิ้งกูดดำที่ได้รับเบต้ากลูแคนบริสุทธิ์ 50 เปอร์เซ็นต์ มีกิจกรรม phenoloxidase สูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับสารกระตุ้นใด ๆ เลย และกลุ่มที่ได้รับสารผสมเซลล์ยีสต์อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 95 เปอร์เซ็นต์

Chang *et al.* (2003) ได้ศึกษาผลของเบต้ากลูแคนต่อระบบภูมิคุ้มกันของกิ้งกูดดำ โดยศึกษาในกิ้งที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 6.5 ± 0.4 กรัม ให้อาหารผสมเบต้ากลูแคนที่ระดับ 0, 1, 2, 10 และ 20 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 20 วัน หลังจากนั้นฉีดเชื้อ WSSV แล้วทำการตรวจวัด total hemocyte count, phenoloxidase, superoxide anion ในวันที่ 0, 1, 3, 6, 9, 12 และ 24 หลังจากฉีดเชื้อ พบว่า กลุ่มที่ได้รับ เบต้ากลูแคน 2, 10, 20 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีอัตราการรอด 55, 65 และ 65 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ total hemocyte count, phenoloxidase และ superoxide anion ลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากได้รับเชื้อและหลังจากนั้นก็กลับสู่สภาวะปกติ ระดับเบต้ากลูแคนที่เหมาะสมในการเสริมภูมิคุ้มกันและเพิ่มอัตราการรอดหลังจากได้รับเชื้อคือ 10 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์และสารเคมี

1. กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei* Boone) น้ำหนักประมาณ 10 -15 กรัม จากฟาร์มเอกชน
2. สารเบต้ากลูแคนที่มีสารออกฤทธิ์ 100 เปอร์เซ็นต์
3. อาหารกุ้งสำเร็จรูป
4. ถังไฟเบอร์กลาส ขนาดความจุ 1 ลูกบาศก์เมตร
5. ตู้กระจกขนาด 100 ลิตร
6. บ่อซีเมนต์ขนาดความจุ 1.5 ลูกบาศก์เมตร
7. เครื่องให้อากาศพร้อมอุปกรณ์
8. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง
9. salino-refractometer
10. กระบอกนิตยขนาด 3 มิลลิลิตร
11. เข็มนิตยขนาด 26 G ×1.0 นิ้ว
12. microcentrifuge tube
13. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge)
14. ตู้บ่มเชื้อ (incubator)
15. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)
16. สารเคมีในการเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือด
 - KCl
 - NaHCO_3
 - อาหารเลี้ยงเซลล์ Medium-199
 - $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
 - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
 - $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
 - NaCl

- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- L-glutamine
- Hepes

17. สารเคมีในการเตรียมสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด

- tri-Sodium Citate Dihydrate ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

18. อุปกรณ์ในการนับ total hemocyte count

- hemacytometer
- กล้องจุลทรรศน์

19. อุปกรณ์และสารเคมีในการวิเคราะห์ phenoloxidase specific activity

- เครื่อง spectrophotometer
- สารละลาย cacodylate buffer pH 7.4
- L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA)
- Trypsin

20. อุปกรณ์ในการทดสอบความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* และการวิเคราะห์ bactericidal activity

- แบคทีเรีย *Vibrio harveyi* AQVH001 จากห้องปฏิบัติการสุขภาพสัตว์น้ำ
- เครื่องผสมสาร (vortex mixer)
- ตะเกียงแอลกอฮอล์
- แอลกอฮอล์
- เครื่องแช่ชนิดควบคุมอุณหภูมิ (psychrotherm controlled)
- จานเลี้ยงเชื้อ (petri dish)
- ไมโครปิเปตขนาด 1000 ไมโครลิตรและ tip
- แท่งแก้วสามเหลี่ยม
- สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 1.5 % และ 2.6 % ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
- อาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulfate citrate bile sucrose agar (TCBS agar)
- อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB)

21. สารเคมีในการวิเคราะห์โปรตีน

- Na_2CO_3
- 0.1 M NaOH
- CuSO_4

- Dipotassium tatrte
- Folin
- Albumin

วิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1 ศึกษาระดับที่เหมาะสมของเบต้ากลูแคนต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวและความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi*

1. การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) โดยมี 4 ชุดการทดลอง (treatment) ในแต่ละชุดการทดลองมี 4 ซ้ำ (replication) ชุดการทดลองที่ 1 คือ อาหารสำเร็จรูปปกติเป็นกลุ่มควบคุม (control) ชุดการทดลองที่ 2-4 คืออาหารสำเร็จรูปปกติผสมเบต้ากลูแคน

ในระดับที่แตกต่างกัน โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 ใช้สำหรับการศึกษาผลของเบต้ากลูแคนที่มีต่อระบบภูมิคุ้มกัน และส่วนที่ 2 ใช้สำหรับการศึกษาความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi*

2. การเตรียมสัตว์ทดลอง

นำกุ้งขาวที่มีน้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 10-15 กรัม มาเลี้ยงในถังไฟเบอร์กลาสขนาดความจุ 1 ลูกบาศก์เมตร เพื่อปรับสภาพก่อนเริ่มการทดลอง ในน้ำเค็ม 20 ppt ด้วยอาหารสำเร็จรูปปกติ โดยให้อาหาร 4 ครั้งต่อวัน ในเวลาประมาณ 07.00 น. 11.00 น. 15.00 น. และ 20.00 น. ให้อากาศอย่างเพียงพอ เปลี่ยนถ่ายน้ำและดูดตะกอนทุก 2 วัน เมื่อครบ 1 สัปดาห์ นำกุ้งขาวมาใส่ตู้ทดลองขนาด 100 ลิตรที่บรรจุน้ำเค็ม 20 ppt ตู้ละ 10 ตัว เตรียมสัตว์ทดลอง 2 กลุ่ม กลุ่มละ 16 ตัว เพื่อใช้ในการศึกษาผลที่มีต่อระบบภูมิคุ้มกัน และใช้สำหรับการศึกษาผลที่มีต่อความต้านทานโรค ใช้พลาสติกดำคลุมตู้เพื่อลดปริมาณแสง ให้อากาศอย่างเพียงพอตลอดการทดลอง เปลี่ยนถ่ายน้ำและดูดตะกอนทุกวัน

3. อาหารและการให้อาหาร

ใช้อาหารสำเร็จรูปปกติเป็นกลุ่มควบคุมและใช้อาหารสำเร็จรูปปกติผสมเบต้ากลูแคนที่ระดับต่างกัน 3 ระดับ ดังนี้

- ชุดการทดลองที่ 1 อาหารสำเร็จรูปไม่ผสมเบต้ากลูแคน (control)
- ชุดการทดลองที่ 2 ผสมเบต้ากลูแคน 1 กรัมต่อ อาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม
- ชุดการทดลองที่ 3 ผสมเบต้ากลูแคน 3 กรัมต่อ อาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม
- ชุดการทดลองที่ 4 ผสมเบต้ากลูแคน 5 กรัมต่อ อาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม

ในการเตรียมอาหารทดลอง ผสมเบต้ากลูแคนตามอัตราส่วนที่กำหนด และเคลือบด้วยน้ำมันปลาหมึก แล้วผึ่งให้แห้ง ส่วนอาหารชุดควบคุมให้เคลือบด้วยน้ำมันปลาหมึกเท่านั้น อาหารทดลองให้ 4 ครั้งต่อวัน ในเวลาประมาณ 07.00 น. 11.00 น. 15.00 น. และ 20.00 น. ในอัตรา 5 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวกึ่งต่อวัน

4. การศึกษาระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว

หลังจากให้อาหารผสมเบต้ากลูแคนเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ทำการสุ่มกุ้งในแต่ละซ้ำ ซ้ำละ 5 ตัว เจาะเลือดจาก ventral sinus ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ด้วยเข็มฉีดยา ซึ่งภายในบรรจุสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดปริมาณ 1 มิลลิลิตร (อัตราส่วนเลือดต่อสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดเท่ากับ 1:2) นำเลือดที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณเม็ดเลือดรวม (total hemocytes count), กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase specific activity), กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้งขาว (bactericidal activity) ตามขั้นตอน ดังนี้

4.1 การตรวจนับปริมาณเม็ดเลือดกุ้งขาว (total hemocytes count)

นำเลือดที่เจาะได้มาตรวจนับเม็ดเลือดโดยใช้ hemacytometer และคำนวณปริมาณเม็ดเลือดเป็นจำนวนเซลล์/ลบ.มม. ดังรายละเอียดในภาคผนวก

4.2 การแยกเซลล์เม็ดเลือด และเตรียม HLS

นำเลือดที่เจาะได้มาแยกเซลล์เม็ดเลือด โดยนำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,500 rpm เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใสไปวิเคราะห์กิจกรรมการทำลาย

แบคทีเรีย (bactericidal activity) ของน้ำเลือดตามวิธีข้อ 4.5 ส่วนตะกอนที่ได้ นำมาล้าง ใน K-199 และละลายในสารละลาย cacodylate buffer pH 7.4 ทำให้เซลล์เม็ดเลือดแตกและตกตะกอนโดยหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 rpm นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นแยกส่วนไซซึ่งเป็น hemocyte lysate (HLS) ไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ตามวิธีดัดแปลงจากรายงานของ Soderhall and Hall (1984)

4.3 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase specific activity)

4.3.1 นำ HLS มา 500 ไมโครลิตร มาผสมกับสารละลายทริปซิน (0.1 % ทริปซิน ใน cacodylate buffer) 500 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยา 30 นาที

4.3.2 เติมสารละลาย L – dihydroxyphenylalanine (L- DOPA) 500 ไมโครลิตร ปลอ่ยให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง

4.3.3 นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร 2 นาที โดย เปรียบเทียบกับสารละลายควบคุม (blank) สารละลายควบคุม ใช้ทริปซินผสมกับ L- DOPA และ cacodylate buffer แทน HLS

4.3.4 นำค่าที่ได้มาคำนวณหน่วย (Unit) ของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ดังรายละเอียดในภาคผนวก

4.4 การวิเคราะห์โปรตีนใน HLS ตามวิธีของ Lowry *et al.* (1951)

นำ HLS มา 0.01 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 0.09 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

4.4.2 เติม reagent c 1 มิลลิลิตร (รายละเอียดการเตรียมอยู่ในภาคผนวก) เขย่าแล้วทิ้งไว้ 10 นาที

4.4.3 เติม reagent d 0.1 มิลลิลิตร (รายละเอียดการเตรียมอยู่ในภาคผนวก) เขย่าแล้วทิ้งไว้ 10 นาที

4.4.4 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เทียบกับสารละลายมาตรฐานของ albumin โดย blank จะใช้ สารละลายบัฟเฟอร์ 0.01 มิลลิลิตร ผสมในน้ำกลั่น 0.09 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติม reagent c และ d ตามปริมาณที่กำหนดข้างต้น

4.5 การศึกษากิจกรรมการทำลายแบคทีเรีย (bactericidal activity) ของน้ำเลือดกุ้ง

ขาว

4.5.1 นำซีรัมที่แยกได้จากการทดลองข้างต้น มาเจือจางด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 2.6 % ในระดับ 1:4 1:8 1:16 1:32 และ 1:64 โดยปรับปริมาตรการเจือจางให้ได้หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร

4.5.2 นำเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ปริสุทธิที่เลี้ยงในอาหาร TSB ผสมโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm นาน 15 นาที 3 ครั้ง นำเชื้อที่ได้มาละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ปลอดเชื้อ และนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร ให้ได้ค่า OD ประมาณ 0.1-0.15 นำเชื้อไปเติมในแต่ละหลอดที่เจือจางซีรัมไว้แล้วในปริมาตรที่เท่ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

4.5.3 นำส่วนผสมแต่ละหลอดมานับปริมาณเชื้อแบคทีเรีย โดยวิธี spread plate ใน TCBS agar

4.5.4 บันทึกค่าของการเจือจางซีรัมที่สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียลงได้ 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ในระยะเวลา 3 ชั่วโมง

5. การศึกษาความต้านทานต่อแบคทีเรียชนิด *Vibrio harveyi*

หลังจากให้อาหารผสมเบต้ากลูแคนในระดับต่าง ๆ จนครบ 2 สัปดาห์ ฉีดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ในปริมาณที่ทำให้กุ้งตายประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ (ทำการทดสอบก่อนว่าควรใช้เชื้อปริมาณเท่าไร) โดยฉีดเข้าทางกล้ามเนื้อลำตัว ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตรต่อตัว ระหว่างทำการทดลองความต้านทานต่อเชื้อให้อาหารสำเร็จรูปไม่ผสมเบต้ากลูแคนทุกชุดการทดลองเช่นเดียวกับชุดควบคุม ตรวจสอบผลการทดสอบโดยพิจารณาจากจำนวนกุ้งที่ตายในระยะเวลา 7 วัน และแยกเชื้อจาก hepatopancreas ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulfate citrate bile sucrose agar เพื่อเป็นการยืนยันว่ากุ้งตายโดยแบคทีเรียชนิดนี้

6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแตกต่างของชุดการทดลองของข้อมูล ปริมาณเมล็ดเลือดรวม กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส และอัตราการตายของกุ้งขาว โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) (อนันต์ชัย, 2542)

การทดลองที่ 2 ศึกษาระยะเวลาการให้เบต้ากลูแคนที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว

1. การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) โดยมี 4 ชุดการทดลอง (treatment) ในแต่ละชุดการทดลองมี 4 ซ้ำ (replication) โดยแต่ละชุดการทดลองให้อาหารผสมเบต้ากลูแคนในระยะเวลาที่แตกต่างกัน ชุดการทดลองที่ 1 คือ อาหารสำเร็จรูปปกติ เป็นกลุ่มควบคุม (control) ชุดการทดลองที่ 2-4 คืออาหารสำเร็จรูปปกติผสมเบต้ากลูแคนในระดับที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 1 ในระยะเวลาที่แตกต่างกัน

2. การเตรียมสัตว์ทดลอง

นำกุ้งขาวที่มีน้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 10-15 กรัม มาเลี้ยงในถังไฟเบอร์กลาสขนาดความจุ 1 ลูกบาศก์เมตร เพื่อปรับสภาพก่อนเริ่มการทดลอง ในน้ำเค็ม 20 ppt ด้วยอาหารสำเร็จรูปปกติ โดยให้อาหาร 4 ครั้งต่อวัน ในเวลาประมาณ 07.00 น. 11.00 น. 15.00 น. และ 20.00 น. ให้อากาศอย่างเพียงพอ เปลี่ยนถ่ายน้ำและดูดตะกอนทุก 2 วัน เมื่อครบ 1 สัปดาห์ นำกุ้งขาวมาเลี้ยงในบ่อซีเมนต์ขนาดความจุ 1.5 ลูกบาศก์เมตร ที่บรรจุน้ำเค็ม 20 ppt บ่อละ 30 ตัว ใช้พลาสติกดำคลุมบ่อเพื่อลดปริมาณแสง ให้อากาศอย่างเพียงพอตลอดการทดลอง เปลี่ยนถ่ายน้ำและดูดตะกอนทุกวัน

3. อาหารและการให้อาหาร

ใช้อาหารสำเร็จรูปผสมเบต้ากลูแคน โดยเลือกกระดับต่ำสุดที่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวได้ดีจากการทดลองที่ 1 และให้อาหารที่ผสมเบต้ากลูแคน ในระยะเวลาที่แตกต่างกัน ดังนี้

- ชุดการทดลองที่ 1 ให้อาหารสำเร็จรูป ไม่ผสมเบต้ากลูแคน (control)
- ชุดการทดลองที่ 2 ให้อาหารสำเร็จรูปผสมเบต้ากลูแคน 2 สัปดาห์
- ชุดการทดลองที่ 3 ให้อาหารสำเร็จรูปผสมเบต้ากลูแคน 3 สัปดาห์
- ชุดการทดลองที่ 4 ให้อาหารสำเร็จรูปผสมเบต้ากลูแคน 4 สัปดาห์

ในการเตรียมอาหารทดลอง ผสมเบต้ากลูแคนตามอัตราส่วนที่กำหนด และเคลือบด้วยน้ำมันปลาหมึก แล้วฝังให้แห้ง อาหารชุดควบคุมให้เคลือบด้วยน้ำมันปลาหมึกเท่านั้น อาหารทดลองให้ 4 ครั้งต่อวัน ในเวลาประมาณ 07.00 น. 11.00 น. 15.00 น. และ 20.00 น. ในอัตรา 5 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวกุ้งต่อวัน โดยให้ 2, 3 และ 4 สัปดาห์สุดท้ายของเดือน

4. การศึกษาระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว

หลังจากให้อาหารผสมเบต้ากลูแคนครบตามระยะเวลาดังกล่าวข้างต้น ทำการสุ่มกุ้งแต่ละซ้ำ ซ้ำละ 3 ตัว เจาะเลือดจาก ventral sinus ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ด้วยเข็มฉีดยา ซึ่งภายในบรรจุสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดปริมาณ 1 มิลลิลิตร (อัตราส่วนเลือดต่อสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดเท่ากับ 1:2) นำเลือดที่ได้ไปวิเคราะห์ ปริมาณเม็ดเลือดรวม, กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส, กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้งขาว ตามขั้นตอนในการทดลองที่ 1 หลังจากนั้นให้อาหารสำเร็จรูปปกติเช่นเดียวกับกลุ่มควบคุมทุกชุดการทดลองและตรวจวัดระดับภูมิคุ้มกันทุกสัปดาห์ จนกระทั่งภูมิคุ้มกันทุกชุดการทดลองลดลงใกล้เคียงกลุ่มควบคุม จึงให้อาหารผสมเบต้ากลูแคนอีกครั้งเป็นเวลา 2 สัปดาห์ แล้วตรวจวัดระดับภูมิคุ้มกันของแต่ละชุดการทดลองทุกสัปดาห์ เพื่อประเมินการเพิ่มของระดับภูมิคุ้มกัน

5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแตกต่างของชุดการทดลองของข้อมูล ปริมาณเมล็ดเลื้อยรวม และกิจกรรม เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) ตามแผน การทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) และเปรียบเทียบความแตกต่าง ของค่าเฉลี่ย โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) (อนันต์ชัย, 2542)

สถานที่และระยะเวลาทำการวิจัย

สถานที่ทำการวิจัย

ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ระยะเวลาทำการวิจัย

ดำเนินการทดลองระหว่างเดือนมิถุนายน 2547 – พฤษภาคม 2548

แหล่งทุนสนับสนุน

ได้รับทุนอุดหนุนและส่งเสริมวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท-เอก จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 ศึกษาระดับที่เหมาะสมของเบต้ากลูแคนต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวและความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi*

1. การศึกษาระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว

เมื่อกุ้งขาวที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 11.17 ± 1.76 กรัม ได้รับอาหารสำเร็จรูปผสมเบต้ากลูแคนที่ระดับ 0, 1, 3, และ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ เมื่อนำเลือดกุ้งมาวิเคราะห์เพื่อประเมินระดับภูมิคุ้มกัน ได้ผลการทดลองดังนี้

1.1 ปริมาณเม็ดเลือดรวม (total hemocytes)

พบว่าปริมาณเม็ดเลือดในกุ้งกลุ่มที่ได้รับเบต้ากลูแคนปริมาณ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัมเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ มีค่าสูงสุดคือ $15.92 \pm 6.02 \times 10^6$ เซลล์/มล. ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) จากกลุ่มที่ได้รับเบต้ากลูแคนปริมาณ 1 และ 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ซึ่งมีปริมาณเม็ดเลือดเฉลี่ย 11.94 ± 6.51 เซลล์/มล. และ $14.36 \pm 5.49 \times 10^6$ เซลล์/มล. ตามลำดับ แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับกลุ่มควบคุม ซึ่งมีปริมาณเม็ดเลือดเฉลี่ย $9.03 \pm 2.87 \times 10^6$ เซลล์/มล. (ตารางที่ 1 และ ภาพที่ 2)

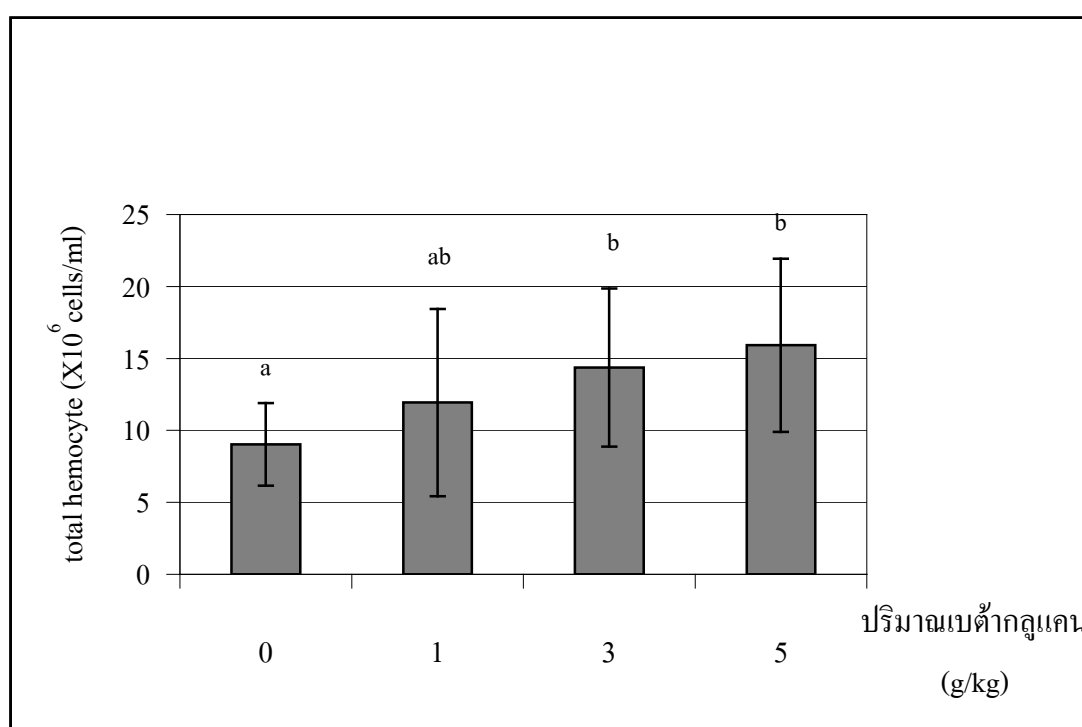
1.2 Phenoloxidase specific activity

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase พบว่า กิจกรรมเอนไซม์ phenoloxidase ของกุ้งขาวกลุ่มที่ได้รับเบต้ากลูแคน 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม และ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีค่า 354.35 ± 208.67 unit/min/mg protein และ 356.28 ± 142.44 unit/min/mg protein ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับกลุ่มควบคุมซึ่งมีค่า 129.43 ± 32.22 unit/min/mg protein (ตารางที่ 2 และ ภาพที่ 3)

ตารางที่ 1 ปริมาณเม็ดเลือดรวม ($\times 10^6$ เซลล์/มล.) ของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปผสมเบต้ากลูแคนระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 2 สัปดาห์

ปริมาณเบต้ากลูแคน (g/kg)	ปริมาณเม็ดเลือดรวม ($\times 10^6$ cells/ml)
0	9.03 ± 2.87^a
1	11.94 ± 6.51^{ab}
3	14.36 ± 5.49^b
5	15.92 ± 6.02^b

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรแตกต่างกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

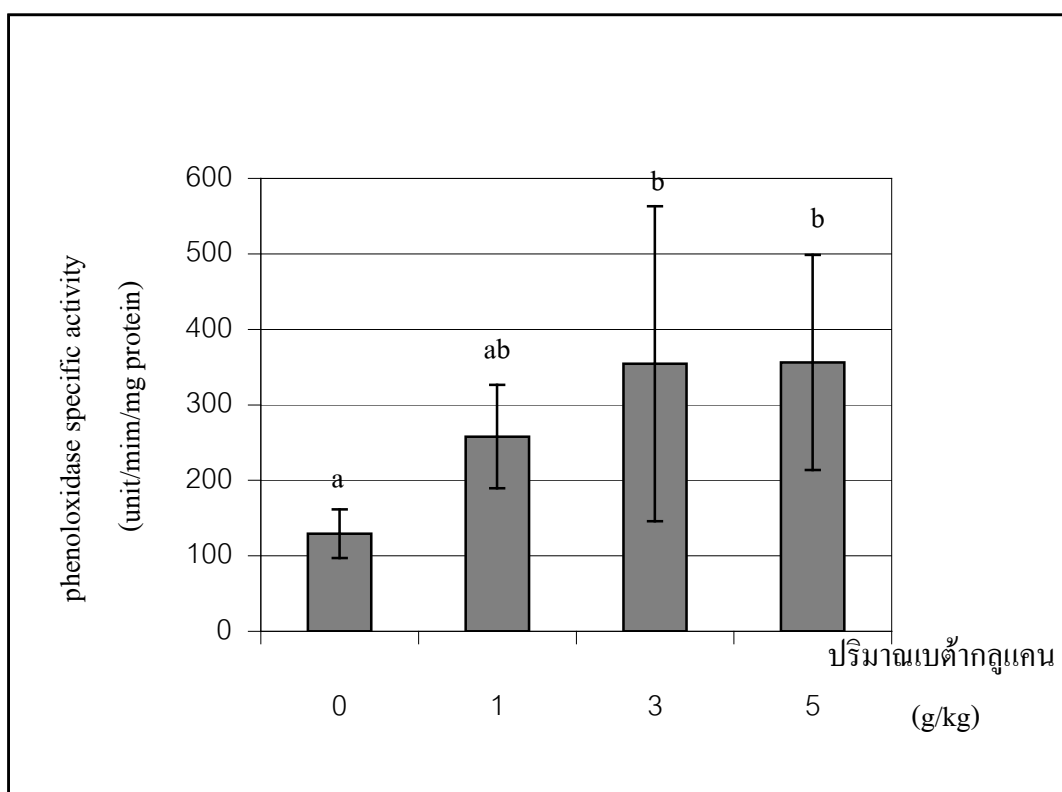


ภาพที่ 2 ปริมาณเม็ดเลือด ($\times 10^6$ เซลล์/มล.) ของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปผสมเบต้ากลูแคนระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 2 สัปดาห์

ตารางที่ 2 กิจกรรมเอนไซม์ phenoloxidase (unit/min/mg protein) ของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปผสมเบต้ากลูแคนระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 2 สัปดาห์

ปริมาณเบต้ากลูแคน (g/kg)	phenoloxidase specific activity (unit/min/mg protein)
0	129.43 $\pm$ 32.22 ^a
1	257.96 $\pm$ 68.59 ^{ab}
3	354.35 $\pm$ 208.67 ^b
5	356.28 $\pm$ 142.44 ^b

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรแตกต่างกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



ภาพที่ 3 กิจกรรมเอนไซม์ phenoloxidase (unit/min/mg protein) ของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปผสมเบต้ากลูแคนระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 2 สัปดาห์

1.3 Bactericidal activity

เมื่อกุ้งขาวได้รับเบต้ากลูแคนที่ระดับ 0, 1, 3, และ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 2 สัปดาห์ นำซีรัมมาเจือจางด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 2.6 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 และ 1:128 โดยปรับปริมาตรการเจือจางให้ได้หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร และใส่เชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ที่เลี้ยงใน TSB ผสมโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร เท่ากับ 0.107 ซึ่งมีเชื้อ *Vibrio harveyi* ประมาณ 1×10^6 cfu/ml โดยใส่เชื้อในแต่หลอดที่เจือจางซีรัมไว้แล้วหลอดละ 0.1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมานับปริมาณเชื้อแบคทีเรียโดยวิธีการ spread plate บน TCBS agar เพื่อหาอัตราส่วนการเจือจางของซีรัมที่สามารถทำให้ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ลดลงได้ 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับ control (สารละลาย โซเดียมคลอไรด์ 2.6 เปอร์เซ็นต์ 0.5 มิลลิลิตรกับเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* 0.1 มิลลิลิตร) พบว่า bactericidal activity ของกุ้งขาวกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมเบต้ากลูแคน 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัมและ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีค่าเท่ากันคือ 1:64 แต่แตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมเบต้ากลูแคน 1 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัมและกลุ่มควบคุมซึ่งมีค่า bactericidal activity 1:32 และ 1:8 ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 อัตราส่วนการเจือจางมากที่สุดของซีรัมที่สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียลง 50

เปอร์เซ็นต์ (bactericidal activity) ของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมเบต้ากลูแคนระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 2 สัปดาห์

ปริมาณเบต้ากลูแคน (g/kg)	Bactericidal activity
0	1:8
1	1:32
3	1:64
5	1:64

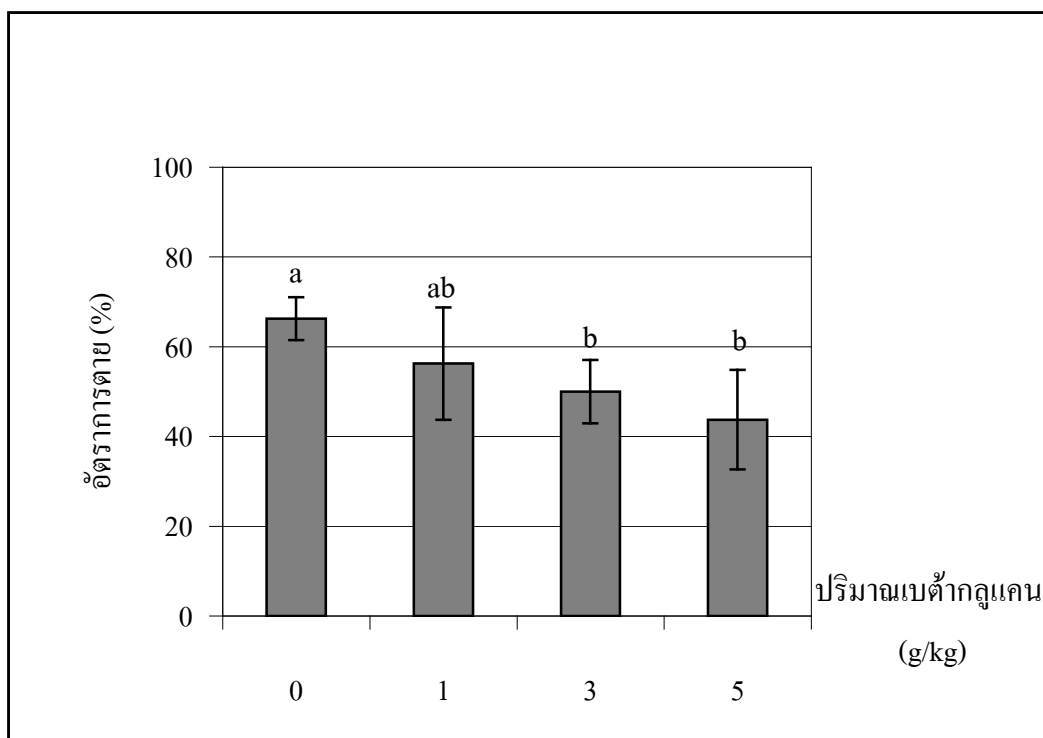
2. การทดสอบความต้านทานต่อเชื้อ *Vibrio harveyi*

หลังจากกุ้งได้รับอาหารผสมเบต้ากลูแคนเป็นเวลา 2 สัปดาห์ และฉีดด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ที่เลี้ยงในอาหาร TSB ผสมเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร เท่ากับ 0.107 ซึ่งมีเชื้อ *Vibrio harveyi* ประมาณ 1×10^6 cfu/ml ฉีดเข้ากล้ามเนื้อกุ้งตัวละ 0.1 มิลลิลิตรในแต่ละชุดการทดลอง บันทึกอัตราการตาย (%) หลังจากฉีดเชื้อเข้าไปเป็นเวลา 7 วัน พบว่า อัตราการตายของกุ้งขาวกลุ่มที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปผสมเบต้ากลูแคน 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) จากกลุ่มที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปผสมเบต้ากลูแคน 1 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม และ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม โดยมีอัตราการตาย ที่ 7 วันเท่ากับ 50.00 ± 7.07 , 55.25 ± 12.50 , และ 43.75 ± 11.09 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) จากกลุ่มควบคุมซึ่งมีอัตราการตายที่ 7 วันเท่ากับ 66.25 ± 4.79 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4 และภาพที่ 4)

ตารางที่ 4 อัตราการตาย (%) ของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปผสมเบต้ากลูแคนระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 2 สัปดาห์ หลังจากฉีดเชื้อ *Vibrio harveyi* เป็นเวลา 7 วัน

ปริมาณเบต้ากลูแคน (g/kg)	อัตราการตาย (%)
0	66.25 ± 4.79^a
1	55.25 ± 12.50^{ab}
3	50.00 ± 7.07^b
5	43.75 ± 11.09^b

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรแตกต่างกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



ภาพที่ 4 อัตราการตาย (%) ของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปผสมเบต้ากลูแคนระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 2 สัปดาห์ หลังจากฉีดเชื้อ *Vibrio harveyi* เป็นเวลา 7 วัน

การทดลองที่ 2 ศึกษาระยะเวลาการให้เบต้ากลูแคนที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของ กุ้งขาว

จากผลการทดลองข้างต้น ซึ่งได้ประเมินระดับภูมิคุ้มกันและความต้านทานต่อเชื้อ *Vibrio harveyi* ของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมเบต้ากลูแคนในระดับต่าง ๆ พบว่าเบต้ากลูแคนที่ระดับ 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เป็นระดับต่ำสุดที่มีผลในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวได้ดี ซึ่งจะนำผลการทดลองส่วนนี้มาศึกษาระยะเวลาการให้เบต้ากลูแคนที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว ในการทดลองที่ 2 โดยให้กุ้งขาวได้รับอาหารสำเร็จรูปผสมเบต้ากลูแคน 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัมที่ระยะเวลาแตกต่างกัน โดยให้กุ้งได้รับเบต้ากลูแคน 0, 2, 3 และ 4 สัปดาห์สุดท้ายของเดือน เมื่อครบระยะเวลาแล้วประเมินระดับภูมิคุ้มกัน หลังจากนั้นให้อาหารสำเร็จรูปปกติ 4 สัปดาห์และให้กินอาหารผสมเบต้ากลูแคนระดับเท่าเดิมอีกเป็นเวลา 2 สัปดาห์ วิเคราะห์องค์ประกอบต่าง ๆ ทางด้านภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวทุกสัปดาห์ได้ผลดังนี้

1. ปริมาณเม็ดเลือดรวม (total hemocytes)

กุ้งขาวกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมเบต้ากลูแคน 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัมเป็นเวลานาน 4 สัปดาห์ใน 1 เดือน มีปริมาณเม็ดเลือดรวมเฉลี่ยสูงสุด คือ $21.55 \pm 2.54 \times 10^6$ เซลล์/มล. ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) จากกลุ่มที่ได้รับเบต้ากลูแคนในระยะเวลาที่น้อยกว่าคือ กลุ่มที่ได้รับเบต้ากลูแคนเป็นเวลา 2, 3 สัปดาห์และกลุ่มควบคุม ซึ่งมีปริมาณเม็ดเลือดเฉลี่ย $15.30 \pm 3.44 \times 10^6$ เซลล์/มล. , $17.43 \pm 2.30 \times 10^6$ เซลล์/มล. และ $13.89 \pm 2.33 \times 10^6$ เซลล์/มล. ตามลำดับ และพบว่ากลุ่มที่ได้รับเบต้ากลูแคนนาน 3 สัปดาห์มีปริมาณเม็ดเลือดรวมแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกลุ่มควบคุมเช่นกัน ส่วนกลุ่มที่ได้รับเบต้ากลูแคนนาน 2 สัปดาห์ ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) จากกลุ่มควบคุม หลังจากหยุดให้เบต้ากลูแคนพบว่าปริมาณเม็ดเลือดรวมกลุ่มที่ได้รับเบต้ากลูแคนนาน 4 สัปดาห์ ยังคงมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเป็นเวลานาน 2 สัปดาห์ และเมื่อให้อาหารผสมเบต้ากลูแคนอีกครั้ง ในสัปดาห์ที่ 5 และ 6 ปริมาณเม็ดเลือดรวมเฉลี่ยของกุ้งขาวมีค่าเพิ่มขึ้น และแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในสัปดาห์ที่ 6 (ให้เบต้ากลูแคนครั้งที่ 2 ครบ 2 สัปดาห์) (ตารางที่ 5 และ ภาพที่ 5)

ตารางที่ 5 ปริมาณเม็ดเลือดรวม ($\times 10^6$ เซลล์/มล.) ของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปผสม เบต้ากลูแคน 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัมเป็นเวลา 0, 2, 3 และ 4 สัปดาห์ ให้อาหาร ปกติ 4 สัปดาห์ และให้อาหารผสมเบต้ากลูแคนอีกครั้ง

ชุดการทดลอง สัปดาห์ที่	ปริมาณเม็ดเลือดรวม ($\times 10^6$ เซลล์/มล.)			
	0 สัปดาห์	2 สัปดาห์	3 สัปดาห์	4 สัปดาห์
0	13.89 ± 2.33^a	15.30 ± 3.44^{ab}	17.43 ± 2.30^b	21.55 ± 2.54^c
1	16.18 ± 2.84^a	20.10 ± 3.67^{ab}	21.03 ± 5.12^{ab}	22.89 ± 5.00^b
2	14.95 ± 2.63^a	15.95 ± 3.01^a	17.55 ± 2.09^{ab}	25.97 ± 6.76^b
3	15.73 ± 7.60^a	16.53 ± 9.76^a	15.65 ± 3.20^a	18.43 ± 7.19^a
4	16.80 ± 4.66^a	16.35 ± 4.32^a	15.40 ± 3.59^a	16.05 ± 4.86^a
5	14.83 ± 3.60^a	16.83 ± 2.72^a	16.45 ± 5.91^a	19.49 ± 1.94^a
6	14.80 ± 5.76^a	16.05 ± 6.27^{ab}	20.08 ± 4.74^{ab}	21.82 ± 3.59^b

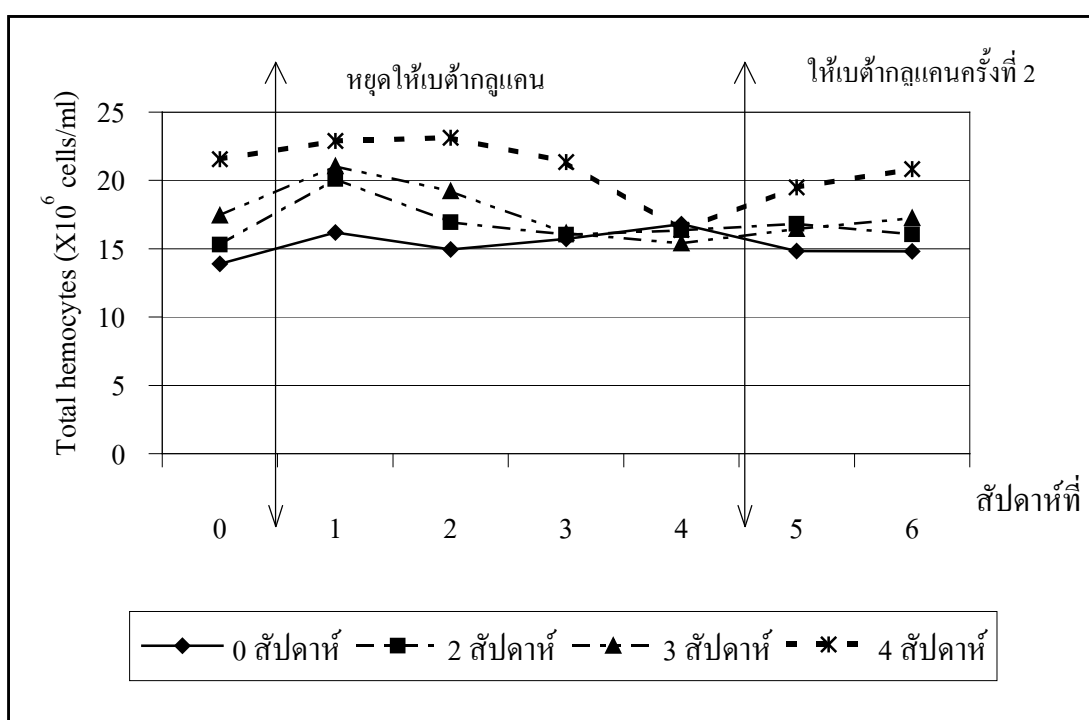
หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรแตกต่างกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

หมายเหตุ สัปดาห์ที่ 0 คือ ให้อาหารผสมเบต้ากลูแคนครบตามระยะเวลาใน 1 เดือนและหลังจากประเมินระดับภูมิคุ้มกันสัปดาห์ที่ 4 แล้วจะเริ่มให้เบต้ากลูแคนครั้งที่ 2

2. Phenoloxidase specific activity

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase พบว่า กิจกรรมเอนไซม์ phenoloxidase ของกุ้งขาวกลุ่มที่ได้รับเบต้ากลูแคน 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 4 สัปดาห์ มีค่า 336.20 ± 223.49 unit/min/mg protein . ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) จากกุ้งกลุ่มที่ได้รับเบต้ากลูแคนเป็นเวลา 2, 3 สัปดาห์ และกลุ่มควบคุมซึ่งมีค่า 184.48 ± 53.43 , 292.72 ± 131.64 และ 167.56 ± 90.06 unit/min/mg protein ตามลำดับ และหลังจากหยุดให้อาหารผสมเบต้ากลูแคนพบว่ากิจกรรมเอนไซม์ phenoloxidase มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในช่วงสัปดาห์แรก เท่านั้น(1 สัปดาห์หลังจากหยุดให้) และมีค่าลดลงจนถึงสัปดาห์ที่ 4

ได้ให้อาหารผสมเบต้ากลูแคนอีกครั้ง ทำการประเมินระดับภูมิคุ้มกันในสัปดาห์ที่ 5 และ 6 พบว่า กิจกรรมเอนไซม์ phenoloxidase มีค่าเพิ่มขึ้น ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุมใน สัปดาห์ที่ 6 (ตารางที่ 6 และ ภาพที่ 6)

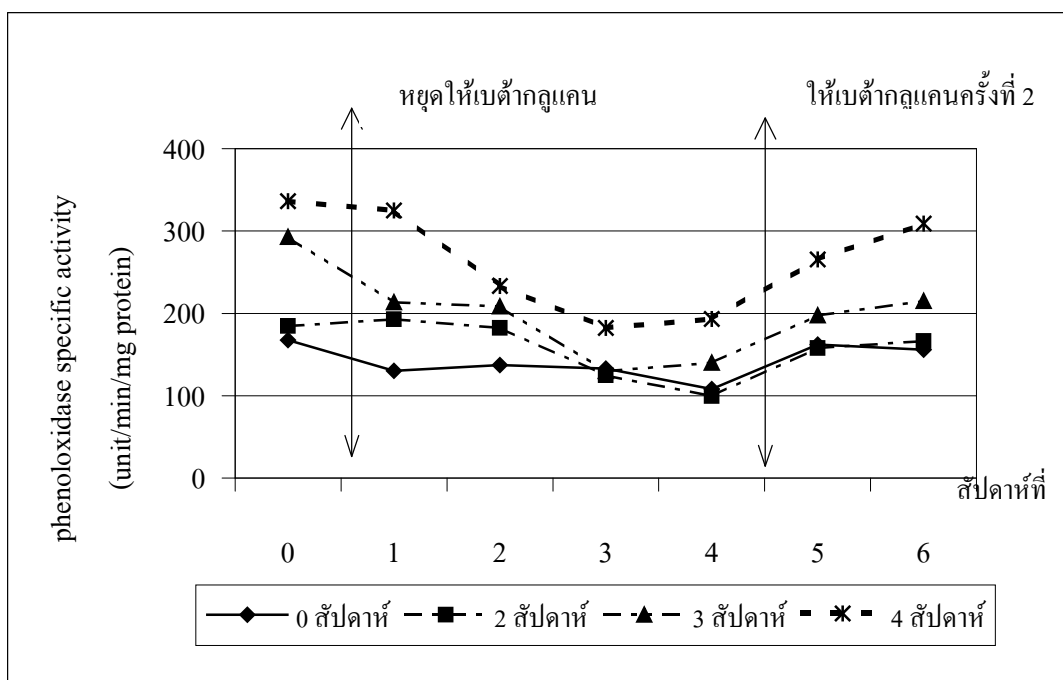


ภาพที่ 5 ปริมาณเม็ดเลือดรวม ($\times 10^6$ เซลล์/มล.) ของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปผสม เบต้ากลูแคน 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัมเป็นเวลา 0, 2, 3 และ 4 สัปดาห์ ให้อาหารปกติ 4 สัปดาห์และให้อาหารผสมเบต้ากลูแคนอีกครั้ง

ตารางที่ 6 กิจกรรมเอนไซม์ phenoloxidase (unit/min/mg protein) ของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปผสมเบต้ากลูแคน 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัมเป็นเวลา 0, 2, 3 และ 4 สัปดาห์ ให้อาหารปกติ 4 สัปดาห์และให้อาหารผสมเบต้ากลูแคนอีกครั้ง

ชุดการทดลอง สัปดาห์ที่	Phenoloxidase specific activity (unit/min/mg protein)			
	0 สัปดาห์	2 สัปดาห์	3 สัปดาห์	4 สัปดาห์
0	167.56 ± 90.06 ^a	184.48 ± 53.43 ^{ab}	292.72 ± 131.6 ^{bc}	336.20 ± 223.49 ^c
1	130.15 ± 24.74 ^a	193.00 ± 52.27 ^{ab}	213.49 ± 57.11 ^{ab}	324.99 ± 106.5 ^b
2	137.22 ± 94.7 ^a	182.12 ± 49.27 ^a	208.55 ± 115.69 ^a	233.32 ± 137.93 ^a
3	133.00 ± 70.08 ^a	124.73 ± 51.31 ^a	129.86 ± 73.61 ^a	182.48 ± 77.55 ^a
4	108.12 ± 57.07 ^a	99.6 ± 23.61 ^a	140.08 ± 75.38 ^a	193.14 ± 93.84 ^a
5	162.23 ± 144.55 ^a	157.75 ± 102.66 ^a	197.56 ± 158.50 ^a	265.61 ± 227.05 ^a
6	155.81 ± 129.46 ^a	166.31 ± 82.39 ^a	214.82 ± 111.1 ^{ab}	309.03 ± 58.01 ^b

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรแตกต่างกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



ภาพที่ 6 กิจกรรมเอนไซม์ phenoloxidase (unit/min/mg protein) ของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปผสมเบต้ากลูแคน 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัมเป็นเวลา 0, 2, 3 และ 4 สัปดาห์ ให้อาหารปกติ 4 สัปดาห์และให้อาหารผสมเบต้ากลูแคนอีกครั้ง

3. Bactericidal activity

หลังจากกุ้งขาวได้รับอาหารผสมเบต้ากลูแคน 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัมเป็นเวลา 0, 2, 3 และ 4 สัปดาห์ ทำการคัดเลือกกุ้งของแต่ละชุดการทดลอง นำซีรัมมาเจือจางด้วยสารละลายไโซเดียมคลอไรด์ 2.6 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 และ 1:128 โดยปรับปริมาตรการเจือจางให้ได้หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร และใส่เชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ที่เลี้ยงใน TSB ผสมไโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร ได้ค่า OD เท่ากับ 0.107 ซึ่งมีเชื้อ *Vibrio harveyi* ประมาณ 1×10^6 cfu/ml โดยใส่เชื้อในแต่ละหลอดที่เจือจางซีรัมไว้แล้วหลอดละ 0.1 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมานับปริมาณเชื้อแบคทีเรียโดยวิธีการ spread plate บน TCBS agar เพื่อหาอัตราส่วนการเจือจางของซีรัมที่สามารถทำให้ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ลดลงได้ 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับ control (สารละลายไโซเดียมคลอไรด์ 2.6 เปอร์เซ็นต์ 0.5 มิลลิลิตรกับเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* 0.1 มิลลิลิตร) พบว่า bactericidal activity ของกุ้งขาวทุกกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมเบต้ากลูแคน 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม แตกต่างจาก

กลุ่มควบคุม โดยกลุ่มที่ได้รับเบต้ากลูแคนนาน 4 สัปดาห์ มีค่า 1 : 128 ซึ่งสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับเป็นเวลา 2 และ 3 สัปดาห์ ซึ่งมีค่าเท่ากันคือ 1 : 64 เมื่อหยุดให้เบต้ากลูแคนพบว่าทุกกลุ่มยังมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมจนถึงสัปดาห์ที่ 4 ทุกกลุ่มมีค่าลดลงจนใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม และหลังจากให้อาหารผสมเบต้ากลูแคนอีกครั้ง ทำการประเมินระดับภูมิคุ้มกันในสัปดาห์ที่ 5 และ 6 พบว่า bactericidal activity มีค่าเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 อัตราส่วนการเจือจางมากที่สุดของซีรัมที่สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียลง 50 เปอร์เซ็นต์ (bactericidal activity) ของกึ่งขาวที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปผสมเบต้ากลูแคน 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัมเป็นเวลา 0, 2, 3 และ 4 สัปดาห์

สัปดาห์ที่ ชุดการทดลอง	Bactericidal activity			
	0 สัปดาห์	2 สัปดาห์	3 สัปดาห์	4 สัปดาห์
0	1 : 16	1 : 64	1 : 64	1 : 128
1	1 : 32	1 : 64	1 : 128	1 : 128
2	1 : 16	1 : 64	1 : 64	1 : 64
3	1 : 16	1 : 32	1 : 32	1 : 64
4	1 : 16	1 : 16	1 : 16	1:16 – 1 : 32
5	1 : 16	1 : 32	1 : 64	1 : 64
6	1 : 16	1 : 32	1 : 64	1 : 64

วิจารณ์ผลการทดลอง

ปัจจุบันมีการนำสารเบต้ากลูแคนที่สามารถสกัดได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น รา แบคทีเรียและยีสต์ มาใช้กับสัตว์น้ำ เบต้ากลูแคนไม่สามารถกำจัดเชื้อที่ก่อโรคต่อกุ้งได้เหมือนกับ ยาและสารเคมี แต่เบต้ากลูแคนที่กุ้งได้รับเข้าไปจะส่งผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งโดยเสริมระบบ ภูมิคุ้มกันให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น มีรายงานผลของเบต้ากลูแคนต่อระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งหลายชนิด เช่น กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) (Scholz *et al.*, 1999; Lopez *et al.*, 2003) กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) (Chang *et al.*, 2003) โดยเบต้ากลูแคนจะทำหน้าที่ในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวน ของเม็ดเลือด กระตุ้นการทำงานของระบบ prophenoloxidase activating system (Knaap, 1993) phagocytosis และ encapsulation (Vargas-Albores *et al.*, 1998) Devaraja *et al.* (1998) พบว่ากุ้ง กุลาดำที่ได้รับอาหารผสมเบต้ากลูแคน 0.1 เปอร์เซ็นต์เป็นระยะเวลา 1 วัน สามารถชักนำให้เม็ด เลือดและน้ำเลือดฆ่าเชื้อไวรัสได้สูงขึ้น พรเลิศและคณะ (2541) ให้อาหารผสมเบต้ากลูแคนที่ ระดับ 5 และ 10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ในกุ้งกุลาดำขนาดประมาณ 15-20 กรัม เป็นเวลา 3 วัน ติดต่อกัน พบว่าที่ระดับ 10 กรัม มีผลช่วยเสริมให้เอนไซม์ phenoloxidase มีกิจกรรมมากขึ้นรวมถึง การทำงานของ bactericidal activity ของน้ำเลือด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม ควบคุม กิจการ และคณะ (2543 ก) ได้ทดลองเลี้ยงกุ้งกุลาดำด้วยอาหารผสมเบต้ากลูแคนซึ่งสกัด ได้จากยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่ระดับแตกต่างกัน 4 ระดับ คือ 0, 0.25, 0.5, และ 1 กรัม/ อาหาร 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่าค่า total hemocyte count สูงสุดของกุ้งกุลาดำได้จาก ชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมเบต้ากลูแคน 1 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม Yano *et al.* (1991) รายงานว่า ปลาตะเพียน (*Cyprinus carpio*) ที่ได้รับอาหารผสมเบต้ากลูแคน มีความต้านทานต่อเชื้อ *Edwardsiella tarda* และ *Aeromonas hydrophila*

การทดลองนี้ได้ศึกษาการใช้เบต้ากลูแคนเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งขาว โดยศึกษา ระดับที่เหมาะสมในการใช้สารเบต้ากลูแคนเพื่อเพิ่มระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวโดยประเมินจากองค์ ประกอบต่าง ๆ ทางด้านภูมิคุ้มกัน ได้แก่ total hemocyte count, phenoloxidase specific activity, bactericidal activity และความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* พบว่าการเพิ่มของระดับ ภูมิคุ้มกันมีความสัมพันธ์กับระดับของเบต้ากลูแคนที่เพิ่มขึ้น กล่าวคือ กุ้งขาวที่ได้รับอาหารสำเร็จ รูปผสมเบต้ากลูแคน 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม นาน 2 สัปดาห์ มีผลทำให้ค่า total hemocyte count, phenoloxidase specific activity และความต้านทานต่อเชื้อ *Vibrio harveyi* สูงที่สุด ซึ่งแตกต่าง จากกลุ่มที่ไม่ได้รับเบต้ากลูแคนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และ bactericidal activity มีค่าสูงกว่า

กลุ่มที่ไม่ได้รับสารเบต้ากลูแคนเช่นกัน แต่ทุกค่าขององค์ประกอบทางด้านภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว กลุ่มที่ได้รับสารเบต้ากลูแคนในระดับดังกล่าวไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกุ้งขาวกลุ่มที่ได้รับ อาหารสำเร็จรูปผสมเบต้ากลูแคน 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ดังนั้นเบต้ากลูแคน 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เป็นระดับต่ำที่สุด ที่มีผลในการเสริมระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวได้ดี โดยสารเบต้ากลูแคนที่นำมาใช้ในการทดลองนี้เป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จที่สกัดจากยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* และผ่านการทำให้บริสุทธิ์ 100 เปอร์เซ็นต์ ประกอบไปด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ซึ่งเป็นโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคส (Manners et al., 1973) ง่ายต่อการดูดซึมเข้าสู่ระบบเลือดของกุ้ง มากกว่าเบต้ากลูแคนที่ยังไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์หรือการใช้ยีสต์ทั้งเซลล์ ดังนั้นการดูดซึมไปใช้ประโยชน์จึงเป็นไปได้ช้ากว่า Supphantharika et al. (2003) ศึกษาประสิทธิภาพของสารเบต้ากลูแคน โดยให้กุ้งกุลาดำได้รับสารเบต้ากลูแคนที่มีความบริสุทธิ์ 50 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ในอาหาร เป็นระยะเวลา 3 วัน พบว่ากิจกรรมเอนไซม์ phenoloxidase ของกุ้งกุลาดำที่ได้รับเบต้ากลูแคนบริสุทธิ์ 50 เปอร์เซ็นต์ที่สกัดจากยีสต์ มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารกระตุ้นใด ๆ และกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมเซลล์ยีสต์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

การศึกษาความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* พบว่าเบต้ากลูแคนที่ผสมในอาหารสำเร็จรูปให้กุ้งขาวกินในระยะเวลา 2 สัปดาห์ มีผลต่อความต้านทานต่อเชื้อ *Vibrio harveyi* ของกุ้งขาว กุ้งขาวทุกกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมเบต้ากลูแคนมีอัตราการตายต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับเบต้ากลูแคนและ กุ้งขาวมีอัตราการรอดสูงขึ้น เมื่อได้รับอาหารผสมเบต้ากลูแคนในปริมาณที่สูงขึ้น ในการทดลองนี้พบว่ากุ้งตายในช่วง 1-3 วันแรกหลังจากได้รับเชื้อแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียที่เข้าสู่ตัวกุ้งจะถูกกำจัดอย่างรวดเร็ว และกุ้งที่รอดตายนี้อยู่ในสภาวะที่มีเม็ดเลือดต่ำ ยังคงสามารถกำจัดเชื้อแบคทีเรียได้อย่างต่อเนื่อง ถ้ากุ้งไม่ได้รับ แบคทีเรียเข้าไปอีก โดยจากการศึกษาของ Lee et al. (1995) พบว่า แบคทีเรีย *Vibrio harveyi* สามารถผลิตสารย่อยสลายเม็ดเลือด (hemolysin) ทำให้ปริมาณเม็ดเลือดลดลง และอาจเป็นไปได้ว่าเมื่อกุ้งได้รับสิ่งแปลกปลอมเข้าไปเซลล์เม็ดเลือดจะเข้ามาล้อมจับสิ่งแปลกปลอม ทำให้เซลล์เม็ดเลือดในระบบไหลเวียนลดลง ดังการทดลองของกิจการและคณะ (2543) ทดลองฉีดเซลล์ยีสต์เข้าไปในตัวกุ้งเพื่อศึกษาการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ตัวกุ้ง พบว่าหลังจากฉีดยีสต์ กุ้งมีปริมาณเม็ดเลือดลดลงใน 1-3 ชั่วโมงแรก และอยู่ในระดับต่ำคงที่ จากนั้นจะค่อย ๆ มีปริมาณมากขึ้นภายใน 24 ชั่วโมงหลังจากฉีดยีสต์ ชัยชาญ (2545) พบว่าในชั่วโมงที่ 3 และ 6 หลังจากฉีดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* เข้ากล้ามเนื้อของกุ้งกุลาดำ มีปริมาณเม็ดเลือดต่ำกว่ากุ้งที่ไม่ได้ฉีดเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 เป็นต้นไปจำนวนเซลล์เม็ดเลือดมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นและมีจำนวนไม่แตกต่างจากกุ้งปกติ

Chang *et al.* (2003) ศึกษาผลของเบต้ากลูแคนต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ โดยให้อาหารผสมเบต้ากลูแคนที่ระดับ 0, 1, 2, 10 และ 20 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 20 วัน หลังจากนั้นฉีดเชื้อ WSSV พบว่า total hemocyte, phenoloxidase specific activity ลดลงหลังจากได้รับเชื้อ และอัตราการรอดของกุ้งที่ได้รับเบต้ากลูแคน 2, 10, และ 20 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีอัตราการรอด 55, 65 และ 65 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ Itami *et al.* (1994) รายงานว่ากิจกรรมของเม็ดเลือดในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมของกุ้ง *Penaeus japonicus* ที่ได้รับอาหารผสมเบต้ากลูแคน 0.01 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 3 วัน หรือระดับ 0.005 เปอร์เซ็นต์นาน 10 วัน มีค่าสูงขึ้น และมีความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อโรคได้สูงกว่ากุ้งในกลุ่มควบคุมด้วย

จากการทดลองนี้กุ้งขาวที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปผสมเบต้ากลูแคน 1 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เป็นเวลานาน 2 สัปดาห์ มีระดับภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้นแต่ไม่แตกต่างจากกุ้งกลุ่มที่ไม่ได้รับเบต้ากลูแคน ($P>0.05$) ในการทดลองของมฤดี และคณะ (2543) พบว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปผสมเบต้ากลูแคนบริสุทธิ์เข้มข้น 1 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม นาน 45 วัน มีผลให้ total hemocyte count สูงกว่ากุ้งกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) จะเห็นได้ว่าการที่กุ้งได้รับเบต้ากลูแคนที่ระดับเดียวกัน ในระยะเวลาต่างกันส่งผลให้ระดับภูมิคุ้มกันมีความแตกต่างกันด้วย ดังนั้นการใช้เบต้ากลูแคนนอกจากจะขึ้นอยู่กับความบริสุทธิ์ของเบต้ากลูแคน และระดับที่เหมาะสมแล้ว ระยะเวลาของการใช้มีผลต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย

การศึกษาระยะเวลาการให้เบต้ากลูแคนที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว โดยเลือกระดับต่ำสุดที่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวได้ดีจากการทดลองแรก มาศึกษาระยะเวลาการให้ โดยให้เบต้ากลูแคน 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ในระยะเวลาแตกต่างกันภายใน 1 เดือน กุ้งกลุ่มที่ได้รับเบต้ากลูแคนนาน 4 สัปดาห์ เมื่อประเมินระดับภูมิคุ้มกันพบว่า มีระดับภูมิคุ้มกันสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับเบต้ากลูแคน 2, 3 สัปดาห์และกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และยังคงสูงกว่ากลุ่มควบคุมต่อไปอีกในช่วงที่หยุดให้เบต้ากลูแคน 3-4 สัปดาห์ (แตกต่างทางสถิติเฉพาะสัปดาห์แรก) กิจกรรมเอนไซม์ phenoloxidase หลังจากหยุดให้อาหารผสมเบต้ากลูแคน ยังคงมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุม 3-4 สัปดาห์เช่นเดียวกับค่า total hemocyte ดังนั้นปริมาณเม็ดเลือดที่เปลี่ยนแปลงจึงมีผลต่อกิจกรรมเอนไซม์ phenoloxidase เนื่องจาก prophenoloxidase ของกุ้งขาวส่วนใหญ่จะอยู่ในเม็ดเลือดชนิด granular hemocyte (Perazzolo and Barracco, 1997) กุ้งขาวกลุ่มที่ได้รับเบต้ากลูแคน 2 และ 3 สัปดาห์

มีการเพิ่มของระดับภูมิคุ้มกันแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นเดียวกับกลุ่มที่ได้รับ 4 สัปดาห์ แต่พบว่าหลังจากหยุดให้อาหารผสมเบต้ากลูแคนโดยให้อาหารปกติเช่นเดียวกับกลุ่มควบคุมนั้น ระดับภูมิคุ้มกันลดลงเร็วกว่ากลุ่มที่ได้รับ 4 สัปดาห์ และเมื่อให้อาหารผสมเบต้ากลูแคนอีกครั้งหลังจากระดับภูมิคุ้มกันลดลงใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม พบว่ากลุ่มที่ได้รับเบต้ากลูแคนนาน 4 สัปดาห์ มีระดับภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้นแตกต่างจากกลุ่มอื่นในสัปดาห์ที่ 2 ของการกระตุ้นอีกครั้ง ดังนั้นการให้กุ้งขาวได้รับเบต้ากลูแคน 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 1 เดือน หยุดให้ 1 เดือน จากนั้นจึงให้อีกครั้งที่ระดับและระยะเวลาเท่าเดิม มีผลในการเพิ่มระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวให้สูงขึ้นในช่วงระยะเวลาของการเลี้ยง ซึ่งโดยมากการเลี้ยงกุ้งขาวใช้ระยะเวลาเลี้ยงสั้นประมาณ 3 เดือนถึง 3 เดือนครึ่ง ดังนั้นการให้เบต้ากลูแคนเพื่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันอย่างมีประสิทธิภาพและไม่เป็นการเพิ่มต้นทุนมากนัก จึงควรให้กุ้งขาวได้รับอาหารสำเร็จรูปผสมเบต้ากลูแคนที่ระดับ 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ทุกวันทุกมื้อตลอดระยะเวลา 1 เดือน โดยให้กุ้งขาวได้รับเบต้ากลูแคนในเดือนที่ 2 ของการเลี้ยงก็เพียงพอต่อการเสริมระดับภูมิคุ้มกันให้สูงต่อเนื่องไปยังเดือนที่ 3 ของการเลี้ยง และกรณีที่เกิดโรคระบาดในฟาร์ม พื้นที่ใกล้เคียง หรือในช่วงที่มีการเปลี่ยนแปลงของสภาพอากาศและสภาพแวดล้อมอาจมีการให้เบต้ากลูแคนในระดับดังกล่าวอย่างต่อเนื่อง เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จะทำให้กุ้งมีระดับภูมิคุ้มกันสูงขึ้น

สรุปผลการทดลอง

การทดลองเพื่อศึกษาระดับที่เหมาะสมของเบต้ากลูแคนที่ใช้ผสมอาหารเพื่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว โดยประเมินจากองค์ประกอบต่าง ๆ ทางด้านภูมิคุ้มกัน ได้แก่ total hemocytes count, phenoloxidase specific activity, bactericidal activity และความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* พบว่า เบต้ากลูแคนที่ระดับ 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เป็นระดับต่ำสุดที่มีผลในการเพิ่มระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวได้ดีหลังจากการให้เป็นเวลา 2 สัปดาห์

การทดลองเพื่อศึกษาระยะเวลาการให้เบต้ากลูแคนที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว โดยประเมินจากองค์ประกอบต่าง ๆ ทางด้านภูมิคุ้มกัน พบว่า การให้กุ้งขาวได้รับอาหารสำเร็จรูปผสมเบต้ากลูแคน 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 4 สัปดาห์ และให้อาหารสำเร็จรูปปกติเช่นเดียวกับกลุ่มควบคุมนาน 4 สัปดาห์ ซึ่งในช่วงนี้กุ้งขาวยังคงมีระดับภูมิคุ้มกันสูงกว่ากลุ่มควบคุม และเมื่อให้เบต้ากลูแคนอีกครั้งพบว่ากุ้งขาวมีระดับภูมิคุ้มกันสูงขึ้น

ดังนั้นในการเลี้ยงในกุ้งขาวที่ใช้เวลาประมาณ 90 - 110 วัน จึงควรใช้เบต้ากลูแคนที่ 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 1 เดือนในช่วงเดือนที่ 2 ของการเลี้ยง และหยุดให้ 1 เดือน จากนั้นจึงให้อีกครั้งที่ระดับและระยะเวลาเท่าเดิม ซึ่งจะมีผลในการเพิ่มระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวให้สูงขึ้นตลอดช่วงระยะเวลาของการเลี้ยง

ข้อเสนอแนะ

ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงปัจจัยทางสภาพแวดล้อมบางประการที่มีผลต่อสุขภาพของกุ้ง โดยประเมินจากการเปลี่ยนแปลงของระดับภูมิคุ้มกัน เพื่อเป็นแนวทางในการจัดการการเลี้ยงและควบคุมปัจจัยที่ส่งผลให้ระดับภูมิคุ้มกันลดลงควบคู่ไปกับการใช้สารเบต้ากลูแคนเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ควรมีการศึกษาการใช้เบต้ากลูแคนเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งขาวที่ระดับและระยะเวลาดังกล่าวเพิ่มเติม สำหรับการเลี้ยงในบ่อดิน เนื่องจากในสภาพการเลี้ยงจริงมีปัจจัยทางสภาพแวดล้อมบางประการที่ส่งผลต่อระบบภูมิคุ้มกันที่ผู้เลี้ยงไม่สามารถควบคุมได้เหมือนในการทดลอง ซึ่งอาจเป็นประโยชน์ในการปรับวิธีการใช้เบต้ากลูแคนเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งขาวให้เกิดประโยชน์สูงสุด

ปัจจุบันสารเบต้ากลูแคนมีราคาสูง เนื่องจากนำเข้าจากต่างประเทศ ดังนั้นควรมีการพัฒนาการสกัดสารเบต้ากลูแคนใช้ในประเทศ เพื่อเป็นการลดต้นทุนในการใช้สารดังกล่าว

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กิจการ สุขมาตย์, จุอะดี พงศ์มณีรัตน์ และ ธนาวุฒิ กล่อมเกลี้ยง. 2543ก. สารกระตุ้นภูมิคุ้ม
และการใช้วัคซีนในกุ้งกุลาดำ: III ผลของบีต้ากลูแคน (MacroGard) ต่อการเจริญเติบโต
ภูมิคุ้มกัน และความต้านทานโรคในกุ้งกุลาดำ. วารสารสงขลานครินทร์. ฉบับวิทยาศาสตร์
และเทคโนโลยี 22 (ฉบับพิเศษ): 678-687.
- _____, วุฒิพร พรหมขุนทอง, ชุติมา ตันติกิตติ และ Rudolf Hoffmann. 2543. ภูมิคุ้มกันโรค
ในกุ้งกุลาดำ : II เซลล์และเนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมใน
กุ้งกุลาดำ. วารสารสงขลานครินทร์. ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22 (ฉบับพิเศษ):
581-588.
- _____, และ สิทธิ บุญยรัตพลิน. 2539. การศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อและเซลล์ในกุ้งกุลาดำที่ติด
เชื้อไวรัสหัวเหลืองและโรคตัวแดงดวงขาว. วารสารสงขลานครินทร์. ฉบับวิทยาศาสตร์และ
เทคโนโลยี 22 (ฉบับพิเศษ): 17-33.
- กำเนิด สุกันวงษ์. 2534. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. สำนักพิมพ์ โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ.
- จิรพร สิงห์พันธ์. 2547. ผลของ Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus
(IHHNV) ต่อการเจริญเติบโตและการรอดของกุ้งขาวแอฟฟิกัน (*Litopenaeus vannamei*;
Boone, 1931). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ชลอ ลิ้มสุวรรณ และ พรเลิศ จันทรัฐชฎ. 2547. อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย.
บริษัทเมจิกฟาร์มเคชั่น จำกัด, กรุงเทพฯ.
- ชัยชาญ ไตรศรีศิลป์. 2545. ฟีนอลออกซิเดสที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำโรคใน
กุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นิพนธ์ เหมะประสิทธิ์. 2522. ผลของอาหารผสมซึ่งมีระดับโปรตีนต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ, น. 86 ใน รายงานประจำปีหน่วยอาหารกุ้งและปลา. งานทดลองและวิจัยเพื่อการเพาะเลี้ยง. กองประมงน้ำกร่อย. กรมประมง, กรุงเทพฯ.

ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์. 2546ก. ศาสตร์ของกุ้งขาว ลิโทพีเนียส แวนนาไม. **สัตว์น้ำ** 14(161):109-112.

_____. 2546ข. ศาสตร์ของกุ้งขาว ลิโทพีเนียส แวนนาไม. **สัตว์น้ำ** 14(162): 119-122.

พรเลิศ จันทรรักษ์กุล, นกมล สุกระกาญจน์ และพัฒน์พงษ์ ชัยยืน. 2541. ผลของ β -1,3-glucan ต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (immune response) ของกุ้งกุลาดำ, น. 43-52. ใน รายงานการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 36. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

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

มฤดี สิริพันธ์, อรัญ หันพงศ์กิตติกุล และกิจการ สุขมาตย์. 2543. สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันและการใช้วัคซีนในกุ้งกุลาดำ: I. การสกัดสารบีต้ากลูแคนจากยีสต์และการประยุกต์ใช้ในกุ้งกุลาดำ. **วารสารสงขลานครินทร์. ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี** 22 (ฉบับพิเศษ): 653-662.

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

Bacon, J.S.D., V.C. Farmer, D. Jones and I. F. Taylor. 1969. The glucan components of the cell wall of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) considered in relation to its ultrastructure. **Biochem. J.** 114: 557 – 567.

- Bauchau, A.G. 1981. Crustacean, pp 385-420 *In* N.A. Ratcliffe, A.F. Rowley, (eds.), **Invertebrate Blood Cell**. Academic Press. London.
- Chang, C.F., M.S. Su, H.Y. Chen and I.C. Liao. 2003. Dietary β -1,3-glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. **Fish & Shellfish Immuno**. 15: 297-310.
- Campa-Córdova, A.I., N.Y. Hernández-saavedra and F. Ascencio. 2002. Superoxide dismutase as modulator of immune function in american white shrimp (*Litopenause vannamei*). **Comp. Biochem. Physiol. Part C**. 133: 557-565.
- Devaraja, T.N., S.K. Otta, G. Shubha, K. Indrani, P. Tauro and K. Iddya. 1998. Immunostimulation of Shrimp Through Oral Administration of *Vibrio* Bacterin and Yeast Glucan pp 167 – 170. *In* T.W. Flegel, eds. **Advances in shrimp Biotechnology, Proceedings to the Special Session on Shrimp Biotechnology 5th Asian Fisheries Forum 11 – 14 November 1988**, Chiangmai, Thailand.
- Dore, I and C. Frimodt. 1987. **An Illustrated Guide to Shrimp of the World**. Osprey Books.
- Fontaine, C.T. and D. V. Lightner. 1975. Cellular response to injury in penaeid shrimp. **Mar. Fish. Rev.** 37: 4-19.
- Holthuis, L.B. 1980. **FAO A species Catalogue Vol.1, Shrimp and Prawns of the World**. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 271p.
- Hose, J. E., G. E. Martin, V. A. Nguyen, J. Lucas and T. Rusentein. 1987. Cytochemical features of shrimp hemocytes. **Biol. Bull. Mar. Biol.** 173(1): 178-187.
- _____, _____ and A.A. Gerard. 1990. A decapoda hemocyte classification scheme integrating morphology cytochemistry and function. **Biol. Bull.** 178: 53-45.

Immunity Information Network. n.d. **Beta glucan and Beta(1-3) glucan**. Source: <http://www.9.onc.ne.jp/-immunet/e11.html>, 25 กุมภาพันธ์ 2549.

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 haemocytes after oral administration of β -1, 3 –glucan (Schizophyllan). 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, C.H.Tan (editors). **The Thrid Asian Fisheries Forum**. Asian Fisheries Society, Manila, Philippines.

Iversen, E. and K. Hale. 1992. **Aquaculture sourcebook. A guide to North American Species**. 1st ed. Van Nostrand Reinhold, New York. 308p.

Johansson, M.W. and K. Soderhall. 1985. Exocytosis of the prophenoloxidase activating system from crayfish hemocytes. **J. Comp. Physiol. B**. 156: 175 – 181.

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

Knaap, W. V. D. 1993. **Defense in Invertebrate in Biotol (Biotechnology by open learning)**. Butterworth-Heinemanm Ltd. Linaese House, Jordan Hill, Oxford.

Lee, K.K., F.R. Chen and P.C. Lui. 1995. A haemocytolytic assay for tiger prawn, *Penaeus monodon*. **Fish & Shellfish. Immunol.** 5(5): 385-387.

Lei, C.H., L.Y. Hsiesh and C.K. Chen. 1989. Effect of salinity on the oxygen consumption and ammonia-N excretion of young juvenile of the grass shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius. **Bull. Zool. Acad. Sinica**. 28: 245-256.

Limsuwan, C. 2003. Status and prospects of white shrimp culture in southeast asia, pp.50-59.

In DSM Nutritional Products the 9th Aquaculture Conference Asia Pacific. Bangkok, Thailand.

Lopez, N., G. Cuzon, G. Gaxiola, G. Taboada, M. Valenzuela, C. Pascual, A. Sanchez and C. Rosas. 2003. Physiological nutritional and immunological role of dietary β -1,3-glucan and ascorbic acid 2- monophosphate in *Litopenaeus vannamei* juveniles. **Aquaculture** 176: 271-283.

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

Manners, D.J., A.J. Masson and J.C. Patterson. 1973. The structure of β - (1,3)-D- glucan from yeast cell walls. **Biochem. J.** 135: 19 -30.

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

_____, D. Poole, C. Poole, J.E. Hose, M. Arias, L. Reynolds, N. Mckrell and A. Whang. 1993. Clearance of bacteria injected into the hemolymph of the Penaeid shrimp, *Sicyonia ingentis*. **J. Inver. Pathol.** 62: 308-315.

McKay, D. and C.R. Jenkin 1970. Immunity in the invertebrates. The role of serum factors in phagocytosis of erythrocytes by haemocytes of the freshwater crayfish (*Parachaeraps bicarinatus*). **Aust. J. exp. Biol. Med. Sci.** 48: 139-150.

Noga, E.J., T. A. Arroll and Z. Fan. 1996. Specificity and some physicochemical characteristics of the antibacterial activity from blue crab *Callinectes sapidus*. **Fish & Shellfish Immuno.** 6: 403-412.

- Perazzolo, L.M. and M.A. Barracco. 1997. The prophenoloxidase activating system of the shrimp *Penaeus paulensis* and associated factors. **Dev. Comp. Immunol.** 21: 385-395.
- Perez Farfante, I. and B. Kensley. 1997. **Penaeoid and Sergestoid Shrimps and Prawns of the World. Key and Diagnoses for the Families and Genera.** Memories du Museum National. Paris, France. 233p.
- Persson, M., A. ver and K. Soderhall. 1987. Encapsulation of foreign particles in vitro by separated blood cells from crayfish, *Astacus leptodactylus*. **Cell. Tiss. Res.** 247: 409-415.
- Ratcliffe, N.A., A. F. Rowley, S. W. Fitzgerald and C. P. Rhodes. 1985. Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances. **Inter. Rev. Cytology.** 97: 183-350.
- Scholz, U., G. G. Diaz, D. Ricque, L. E. CruzSuarez, F. Vargas Albores and J. Latchford. 1999. Enhancement of vibriosis resistance in juvenile *Penaeus vannamei* by supplementation of diets with different yeast products. **Aquaculture.** 176: 271-283.
- Smith, L.L., P.G. Lee, A.L. Lawrence and K. Strawn. 1985. Growth and digestibility by three size of *Penaeus vannamei* Boone: effect of dietary protein and protein source. **Aquaculture.** 46: 85-96.
- Smith, V. and K. Soderhall. 1986. Cellular immune mechanism in the crustacea. **Symposium of the Zoological Society of London.** 56: 59-79.
- Soderhall, K. and L. Cerenius. 1992. Crustacean immunity. Annu. Rev. **J. Fish. Dis.** 2: 3 – 23.
- Soderhall, K. and V.J. Smith. 1986. Prophenoloxidase-activating cascade as a recognition system in arthropods, pp. 251-258. In A. P. Gupta (ed.). **Hemolytic and Humoral Immunity in Arthropods.** John Wiley & Sons, Inc., New York.

- Sung, H., Y.L. Yung and Y.L.Song, 1996. Enhancement of microbicidal activity in the black tiger prawn *Penaeus monodon* via immunostimulation. **J. Crust. Biol.** 16(2) : 278-284.
- Supamattaya, K., J. Kasornchadra and S. Boonyaratpalin. 1994. Comparative study of simple methods for the diagnosis of yellow head baculovirus in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Songklanakarin J. Sci. Technol.** 16(1) : 37– 48.
- Suphantharika, M. , P. Khunrae, P. Thanardkit and C. Verduyn. 2003. Preparation of spent brewer's yeast glucan with a potential application as an immunostimulant for the black tiger shrimp. **Bioresource Technol.** 88: 55-60.
- Vargas-Albores, F. 1995. The defense system of brown shrimp (*Penaeus californiensis*): Humoral recognition and cellular response. **J. Mar. Biotechnol.** 3: 153-156.
- _____, P. Hinojosa – Baltazar, G. P. Clark and F. Magallon – Barajas. 1998. Influence of temperature and salinity on the yellowleg shrimp, *Penaeus californiensis* Holmes, prophenoloxidase system. **Aquacult. Res.** 29(8) : 549 - 553.
- Yano, T., H.Matsuyama and R.E.P. Mangindan. 1991. Polysaccharide induced protection of carp, *Cyprinus carpio*, against bacterial infection. **J. Fish. Dis.** 14: 577-582.

ภาคผนวก

อาหารเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือด K-199 และสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด

1. วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือด K-199

1.1 M-199

อาหารเลี้ยงเซลล์ Medium-199 1 ซอง + NaHCO_3 2.2 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น
ปรับปริมาตรครบ 500 มิลลิลิตร

1.2 salt mixture ประกอบด้วย

- KCl	0.4 กรัม
- $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	3.3 กรัม
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3.0 กรัม
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.05 กรัม

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

1.3 NaCl

ละลาย NaCl 1 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

1.4 $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$

ละลาย $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.9 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

1.5 L-glutamin

L-glutamin 0.015 กรัม ในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร แล้วกรองผ่านกระดาษกรองขนาด

0.22 μm

2. การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ K-199 จำนวน 100 มิลลิลิตร

2.1 ผสมสารละลายตามลำดับ ดังนี้

- M-199	50 มิลลิลิตร
- salt mixture	10 มิลลิลิตร
- NaCl	10 มิลลิลิตร
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10 มิลลิลิตร
- L-glutamine	1 มิลลิลิตร
- Hepes	0.238 กรัม

ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

2.2 ปรับ pH ด้วย HCl หรือ NaOH ให้อยู่ในช่วง 7.3-7.6

3. การเตรียมสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด

10% tri – Sodium Citrate Dihydrate ในอาหารเลี้ยงเซลล์ K-199

การเตรียมสารเคมีในการวิเคราะห์ Phenoloxidase specific activity

1. สารละลาย cacodylate buffer pH 7.4

ผสมสารละลาย 0.2 M Sodium cacodylate ปริมาณ 50 มิลลิลิตร สารละลาย 0.2 M HCl ปริมาณ 2.7 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 47.3 มิลลิลิตร

2. L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA)

L-dihydroxyphenylalanine 4 มิลลิกรัมในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร

3. สารละลายทริปซิน

เตรียมจาก 0.1% ทริปซินใน cacodylate buffer

การเตรียมสารเคมีในการวิเคราะห์โปรตีน

1. reagent a

เตรียมจาก 2 % weight / Volume Na_2CO_3 ละลายใน 0.1 M NaOH

2. reagent b

เตรียมจาก 0.5% CuSO_4 ละลายใน 1% Potassium tartrate

3. reagent c

เตรียมจาก reagent a 50 มิลลิลิตร รวมกับ reagent b 1 มิลลิลิตร

4. reagent d

เตรียมจาก Folin 1 ส่วน ผสมกับน้ำ 2 ส่วน

การคำนวณปริมาณเม็ดเลือด (Total hemocytes count)

ปริมาตรของ Hemacytometer = กว้าง x ยาว x สูง

= 1 mm x 1mm x 0.1mm

= 0.1 mm³

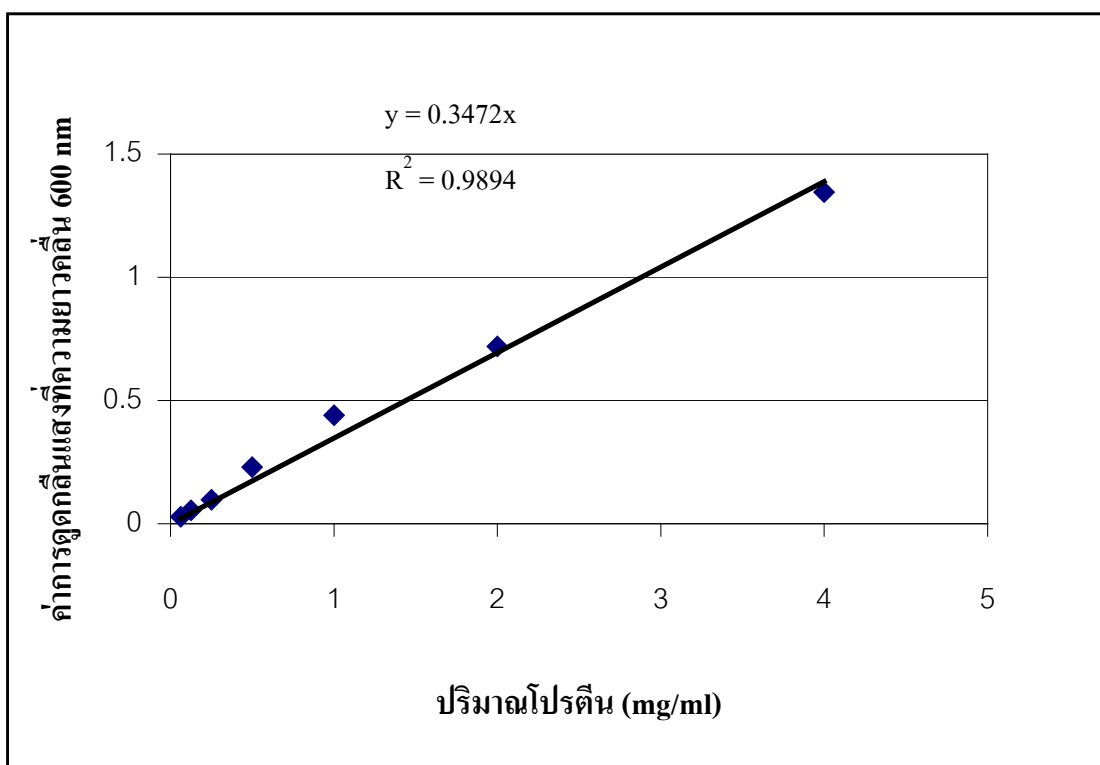
จำนวนเซลล์เม็ดเลือด /mm³ = เซลล์เม็ดเลือดที่นับได้

จำนวนเซลล์เม็ดเลือด / ml³ = เซลล์เม็ดเลือดที่นับได้ x 10⁴ x ค่า dilution

การคำนวณกิจกรรมเอนไซม์ phenoloxidase

กำหนดให้ ค่าดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลง 0.001 = 1 unit

phenoloxidase specific activity = unit/min/ mg protein



ภาพผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐาน (Bovine Serum Albumin)