ผลของสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อการเติบโต การรอดตาย และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei*

นางสาว ขวัญดาว จันทโชติ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2551
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECTS OF IMMUNOSTIMULANTS ON GROWTH, SURVIVAL, AND IMMUNE RESPONSE IN THE WHITE SHRIMP *Litopenaeus vannamei*

Miss Khwandaw Chantachote

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Science Program in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2008

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อการเติบโต การรอดตาย และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei*
โดย	นางสาว ขวัญดาว จันทโชติ
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.เจริญ นิติธรรมยง)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ ดร.สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ดร.ณรงค์ศักดิ์ พ่วงลาภ)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขวัญดาว จันทโชติ : ผลของสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อการเติบโต การรอดตาย และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei* (EFFECTS OF IMMUNOSTIMULANTS ON GROWTH, SURVIVAL, AND IMMUNE RESPONSE IN THE WHITE SHRIMP *Litopenaeus vannamei*) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ. ดร. สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล, 81 หน้า.

ศึกษาผลของอาหารเม็ดสำเร็จรูปเสริมบีตากลูแคนและนิวคลีโอไทด์ เปรียบเทียบกับอาหารชุดควบคุมในกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) โดยเลี้ยงกุ้งด้วยอาหารเสริม 0.01%บีตากลูแคน 2%นิวคลีโอไทด์ และอาหารชุดควบคุม ที่ความเค็ม 20 ส่วนในพันส่วน แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ส่วน คือ การทดลองที่ 1 การศึกษาผลของบีตากลูแคนและนิวคลีโอไทด์ต่อการเติบโตและการรอดตายในกุ้งขาวแวนนาไม โดยเริ่มเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม ขนาดน้ำหนักเริ่มต้นประมาณ 0.1 กรัม เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า การเติบโตของกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริม 0.01 %บีตากลูแคนและ 2%นิวคลีโอไทด์สูงกว่าการเลี้ยงด้วยอาหารชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) การรอดและผลผลิตรวมของกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริม0.01 %บีตากลูแคน มีค่าสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารทดลองสูตรอื่น ๆ และการทดลองที่ 2 การศึกษาผลของบีตากลูแคนและนิวคลีไทด์ต่อการเติบโต การรอด และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในกุ้งขาวแวนนาไม โดยเริ่มเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมขนาดน้ำหนัก 11-15 กรัม เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า การเติบโต การรอด และผลผลิตรวมของกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริม 0.01 %บีตากลูแคน มีค่าสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารทดลองสูตรอื่น ๆ การตอบสนองภูมิคุ้มกันในกุ้งขาวแวนนาไมก่อนการชักนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 1526 พบว่า อาหารเสริม 0.01 %บีตากลูแคน มีค่าปริมาณเม็ดเลือดรวมและแอคทิวิตีของฟีนอลออกซิเดสมีค่าสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารทดลองสูตรอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) การตอบสนองภูมิคุ้มกันในกุ้งขาวแวนนาไมหลังการชักนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 1526 เป็นเวลา 4 วัน พบว่า อาหารเสริม 0.01 %บีตากลูแคน มีค่าปริมาณเม็ดเลือดรวมและแอคทิวิตีของฟีนอลออกซิเดสมีค่าสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารทดลองสูตรอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และเปอร์เซ็นต์การตายสะสมของกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริม 0.01 %บีตากลูแคนมีเปอร์เซ็นต์การตายสะสมที่น้อยที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารทดลองเสริม 2%นิวคลีโอไทด์และอาหารทดลองชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ..... ลายมือชื่อนิสิต ขวัญดาว จันทโชติ

ปีการศึกษา 2551 ..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

4972235023 : MAJOR BIOTECHNOLAGY

KEYWORDS : *Litopenaeus vannamei* / BETA-GLUCAN / NUCLEOTIDE / IMMUNOSTIMULANTS / GROWTH / SURVIVAL

KHWANDAW CHANTACHOTE : EFFECTS OF IMMUNOSTIMULANTS ON GROWTH, SURVIVAL, AND IMMUNE RESPONSE IN THE WHITE SHRIMP *Litopenaeus vannamei* THESIS ADVISOR : ASSOC.PROF.SOMKIAT PIYATIRATITIVORAKUL, Ph.D., 81 pp.

The present study was designed to determine the effect of beta-glucan (BG) and nucleotide on white shrimp *Litopenaeus vannamei* . Shrimp were fed diets supplemented 0.01% beta-glucan , 2% nucleotide and non of them (control) at salinity 20 ppt. The experiment was separated into two parts. The first part was to study the effects of beta-glucan and nucleotide on growth and survival in white shrimp *Litopenaeus vannamei* . Shrimp with average weight of 0.1g were fed diets for 12 weeks. The result showed that growth of white shrimp fed 0.01% beta-glucan and 2% nucleotide diets were significantly ($P<0.05$) higher than that of control diet. Survival and production of white shrimp fed 0.01% beta-glucan diet were significantly ($P<0.05$) higher than those of the other treatments. And the second part was to study the effects of beta-glucan and nucleotide on growth survival and immune response of white shrimp. Shrimp with weight of 11-15g were fed those diets for 4 weeks. The result showed that growth, survival and production of white shrimp fed 0.01% beta-glucan were significantly ($P<0.05$) higher than those of other treatments. Immune response before challenging the white shrimp with *Vibrio harveyi* strain 1526 showed that total hemocyte count and phenoloxidase activity of the white shrimp fed 0.01% beta-glucan were significantly ($P<0.05$) higher than those of other treatments. Cumulative mortality of white shrimp fed 0.01% beta- glucan (12.5%±0.0%) was significantly ($P<0.05$) lower than the groups fed 2% nucleotide (31.25%±8.84%) and control (62.5%±0.0%).

Field of Study : Biotechnology Student's Signature : .....

Academic Year : 2008 Advisor's Signature : .....

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล ที่ให้ความกรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และให้ความช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนลุล่วงไปได้ด้วยดี ตลอดจนตรวจแก้ไขข้อผิดพลาดที่เกิดขึ้นจากการเขียนวิทยานิพนธ์และให้การดูแลด้วยดีตลอดมา

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.เจริญ นิติธรรมยง ที่กรุณาเป็นประธานในการสอบวิทยานิพนธ์ และ รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ และ ดร.ณรงค์ศักดิ์ พ่วงลาภ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ช่วยตรวจแก้ไขข้อผิดพลาดในการทำวิทยานิพนธ์นี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่และเครื่องมือในการทำวิจัย และ คุณเสรี ดอนเหนือ รวมทั้งเพื่อนๆในภาควิชาทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจให้แก่ข้าพเจ้าในการทำวิจัยตลอดมา

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา คุณ ชัชพิสิฐ สว่างพงศ์ และ คุณธัชนนนท์ พุ่มโภคัย และสมาชิกทุกคนในครอบครัว ที่ทำทุกสิ่งอย่างอันเต็มเปี่ยมด้วยความรักและความเมตตาแก่ข้าพเจ้าตลอดมารวมถึงผู้ที่คอยเป็นกำลังใจทุกท่านที่ทำให้งานวิจัยชิ้นนี้ฝ่าฟันอุปสรรคจนกระทั่งสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย ……...	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ……	จ
กิตติกรรมประกาศ……..	ฉ
สารบัญ…….....	ช
สารบัญตาราง……	ฌ
สารบัญภาพ……	ญ
บทที่	
1 บทนำ……...	1
1.1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย…….....	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ……..…….....	2
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1ชีววิทยาของกุ้งขาวแวนนาไม……..	3
2.2 ลักษณะที่ใช้จำแนก……	3
2.3 การสืบพันธุ์…….....	5
2.4วงจรชีวิต…….	6
2.5 การแพร่กระจาย …….	7
2.6 การกินอาหาร.....	7
2.7 คุณภาพน้ำในการเลี้ยง.....	7
2.8 โรคของกุ้งขาวแวนนาไม.....	11
2.9 ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม.....	15
2.10 สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน.....	20
3 วิธีดำเนินงานวิจัย…….	24
3.1 อุปกรณ์ที่สำคัญ……...	24
3.2 สารเคมีที่สำคัญ……...	24
3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ…….	25
3.4 การวางแผนการทดลอง……...	25
3.5 สถานที่ทดลอง…….....	25

3.6 อาหารทดลอง…….. 25
3.7 การเตรียมและผลิตอาหาร……... 28
3.8 การเตรียมการทดลอง…….. 28
3.9 การวิเคราะห์คุณภาพอาหารโดยวิเคราะห์หาค่า Proximate composition 32
3.10 การประเมินผล การเลี้ยง และการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกัน..... 33
3.11 วิเคราะห์คุณภาพน้ำ..... 34
3.12 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ..... 34
4 ผลการทดลอง…….. 35
4.1 คุณภาพอาหารทดลอง…… 35
4.2 การเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมเพื่อศึกษาการเติบโตและการรอด…….. 35
4.3 การเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมเพื่อศึกษาการเติบโต การรอด และระบบภูมิคุ้มกันก่อนและหลังการชักนำให้เกิดโรคด้วยเชื้อ *Vibrio harveyi* ... 42
5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง..... 51
6 ข้อเสนอแนะ..... 55
รายการอ้างอิง..... 56
ภาคผนวก..... 64
ภาคผนวก ก…….. 65
ภาคผนวก ข..... 73
ภาคผนวก ค..... 74
ภาคผนวก ง..... 75
ภาคผนวก จ..... 76
ภาคผนวก ฉ..... 77
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์…….. 81

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
3-1	คุณภาพวัตถุดิบที่ใช้ผลิตอาหารทดลอง……..……..	26
3-2	ส่วนประกอบของอาหารทดลอง……...	27
4-1	คุณภาพของอาหารทดลอง 3 สูตร…….	35
4-2	น้ำหนักตัวเฉลี่ย (กรัม/ตัว) ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสูตรต่างๆ……	36
4-3	น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (กรัมต่อตัว) ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสูตรต่าง ๆ …….	36
4-4	อัตราการเติบโตสัมพัทธ์ต่อวันของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสูตรต่าง ๆ …….	37
4-5	อัตราการเติบโตสัมพัทธ์ต่อวันของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสูตรต่าง ๆ (ตลอดการทดลอง 12 สัปดาห์).....	37
4-6	อัตราการบริโภคอาหาร (%) ต่อวันของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสูตรต่าง ๆ.....	38
4-7	อัตราการบริโภคอาหารเฉลี่ย (%) ต่อวันของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสูตรต่าง ๆ (ตลอดการทดลอง 12 สัปดาห์) ……...	38
4-8	ประสิทธิภาพการใช้อาหารของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสูตรต่าง ๆ …….	39
4-9	ประสิทธิภาพการใช้อาหารของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสูตรต่าง ๆ (ตลอดการทดลอง 12 สัปดาห์)……	39
4-10	ผลผลิตรวมของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสูตรต่าง ๆ (ตลอดการทดลอง 12 สัปดาห์)……	39
4-11	อัตราการแลกเนื้อของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสูตรต่าง ๆ.....	40
4-12	อัตราการแลกเนื้อของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสูตรต่าง ๆ (ตลอดการทดลอง 12 สัปดาห์)……...	40
4-13	การรอด (%) ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสูตรต่าง ๆ.....	41
4-14	คุณภาพน้ำระหว่างการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมด้วยอาหารทดลอง 3 สูตร……	42
4-15	น้ำหนักตัวเฉลี่ยของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสูตรต่าง ๆ.....	42
4-16	Weight gain (g/aquarium) ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสูตรต่าง ๆ…….....	43
4-17	อัตราการเติบโตสัมพัทธ์ต่อวันของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสูตรต่าง ๆ……....	43
4-18	อัตราการบริโภคอาหาร (%) ต่อวันของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสูตรต่าง ๆ...	44
4-19	ประสิทธิภาพการใช้อาหารของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสูตรต่าง ๆ……	44

4-20 ผลผลิตของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสูตรต่าง ๆ…… 45
4-21 อัตราการแลกเนื้อของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสูตรต่าง ๆ……... 45
4-22 อัตราการรอดของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสูตรต่าง ๆ…….. 46
4-23 คุณภาพน้ำระหว่างการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมด้วยอาหารทดลอง 3 สูตร..... 46
4-24 ปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสูตรต่าง ๆ…….. 47
4-25 แอคทิวิตีของฟีนอลออกซิเดส (unit/min/mg protein) ในกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับ
อาหารสูตรต่าง ๆ…… 48
4-26 ปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสูตรต่าง ๆ……. 48
4-27 แอคทิวิตีของฟีนอลออกซิเดส (unit/min/mg protein)ในกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับ
อาหารสูตรต่าง ๆ……... 49
4-28 เปอร์เซ็นต์จำนวนกุ้งขาวแวนนาไมที่ตายสะสมหลังการชักนำให้เกิดโรคด้วย
V. harveyi สายพันธุ์ 1526 ในระยะเวลา 96 ชั่วโมง..... 50

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2-1	ลักษณะทั่วไปของกุ้งขาวแวนนาไม	4
2-2	วงจรชีวิตของกุ้งขาวแวนนาไม	6
2-3	ขั้นตอนของปฏิกิริยาการสลายตัวของสารประกอบไนโตรเจน	9
2-4	โครงสร้างของบีตากลูแคนในเซลล์ยีสต์	21
2-5	โครงสร้างโดยทั่วไปของนิวคลีโอไทด์	22
3-1	ตู้กระจกขนาด 32x52x30 (กว้างxยาวxสูง) เซนติเมตร ระบบน้ำหมุนเวียนแบบปิด	29
4-1	การตายสะสม (cumulative mortality) ของกุ้งขาวแวนนาไม ระหว่างการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 เป็นเวลา 4 วัน (24, 48, 72, 9ชั่วโมง)	50

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญ

กุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei* Boone,1931) เป็นกุ้งพื้นเมืองในทวีปอเมริกา ในธรรมชาติพบได้ตั้งแต่ชายฝั่งทะเลของประเทศเม็กซิโกจนถึงชายฝั่งทะเลของประเทศเปรู ซึ่งเป็นเขตที่มีอุณหภูมิของน้ำประมาณ 26-28 องศาเซลเซียส และมีความเค็มประมาณ 35 พีพีที ซึ่งมีการเลี้ยงกันมากในประเทศเอกวาดอร์ เม็กซิโก เปรู ปานามา ฮอนดูรัส โคลัมเบีย บราซิล ฯลฯ (Rosenberry, 1993; FAO,1994)

ประเทศไทยได้มีการนำเข้ากุ้งขาวแวนนาไมซึ่งเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งจะเรียกว่ากุ้งขาว เข้ามาทดลองในปี พ.ศ. 2541 แต่การทดลองครั้งนั้นไม่ค่อยประสบความสำเร็จและไม่ได้รับความสนใจเท่าที่ควร ประกอบกับการจัดหาพันธุ์ขณะนั้นมีความยากลำบากและมีราคาแพง จนกระทั่งเดือนมีนาคม พ.ศ. 2545 กรมประมงได้อนุญาตให้นำพ่อแม่พันธุ์ที่ปลอดเชื้อ (specific pathogen free, SPF) จากต่างประเทศเข้ามาทดลอง จนถึงสิ้นเดือนกุมภาพันธ์ 2546 ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่การเลี้ยงกุ้งกุลาดำในประเทศไทยกำลังประสบปัญหา โรคระบาด ขาดแคลนพ่อแม่พันธุ์ที่มีคุณภาพดี และปัญหาที่สำคัญ คือ กุ้งโตช้า แคระแกรนเลี้ยงไม่โต ซึ่งเป็นปัญหาที่เกิดขึ้นในกุ้งกุลาดำมาหลายปีแล้ว (Limsuwan, 1999) ทำให้เกษตรกรจำนวนมากหันมาทดลองเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมมากขึ้น ระบบการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมเป็นเช่นเดียวกับการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ เป็นการเลี้ยงแบบพัฒนา มีการปล่อยกุ้งในอัตราหนาแน่นสูงทำให้มีของเสียจากการขับถ่ายในบ่อเลี้ยงเป็นปริมาณมากทำให้คุณภาพน้ำเปลี่ยนแปลงเป็น สาเหตุทำให้กุ้งเกิดความเครียด และมีภูมิคุ้มกันลดลง ทำให้เชื้อโรคเข้าทำอันตรายกุ้งได้ นอกจากนั้นการที่มีอาหารเหลือตกค้างในบ่อ มีการสะสมของสารอินทรีย์ที่พื้นก้นบ่อ และมีเชื้อโรคเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว เป็นปัจจัยเสริมที่ทำให้กุ้งเป็นโรคได้ง่ายขึ้น เมื่อเกิดโรคระบาดก็ได้มีการใช้สารปฏิชีวนะเพื่อทำการรักษาโรคเหล่านี้เป็นเวลานาน และมีการใช้อย่างพร่ำเพรื่อไม่มีการควบคุม ปริมาณและชนิดของยาให้เหมาะสมกับการรักษาโรค ส่งผลต่อสัตว์โดยทางตรง คือการที่สัตว์ได้รับสารปฏิชีวนะเป็นเวลานาน ส่งผลให้จุลินทรีย์เกิดการดื้อยา ทำให้การใช้สารปฏิชีวนะในปริมาณเท่าเดิมไม่ได้ผลเท่าที่ควร นอกจากนี้การให้สารปฏิชีวนะเป็นเวลานานโดยไม่มีระยะงดให้อาจก่อให้เกิดสารตกค้างในเนื้อสัตว์ได้ ผู้บริโภคสัตว์เหล่านี้เข้าไป จะมีการสะสมสารปฏิชีวนะเหล่านี้ในระยะยาว อันตรายจะขึ้นกับชนิดของสาร ซึ่งสารบางชนิดเมื่อเข้าไปสู่ร่างกายแล้วอาจถูกเปลี่ยนไปเป็นสารที่มีความเป็นพิษสูงกว่าสารตั้งต้น หรืออาจเป็นสารก่อมะเร็ง (วลัยพร, 2544) ดังนั้นการป้องกันโรคจึงเป็นขั้นตอนสำคัญที่จะลดความสูญเสียจากปัญหา

การเกิดโรคติดเชื้อได้ โดยรวมไปถึงการกระตุ้นภูมิคุ้มกันซึ่งความสูญเสียจากปัญหาการเกิดโรคติดเชื้อได้ โดยรวมไปถึงการกระตุ้นภูมิคุ้มกันซึ่งจะช่วยเพิ่มความต้านทานให้เซลล์เจ้าบ้านและช่วยลดความสูญเสียจากการเกิดโรคติดเชื้อขึ้นได้ (Ratcliffe,1985)

สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน คือ สารที่สัตว์ได้รับในปริมาณน้อยและมีผลในการทำให้เกิดความแข็งแรง มีภูมิคุ้มกันโรคสูงขึ้น เมื่อเชื้อโรคเข้าสู่ร่างกายก็จะสามารถป้องกันตัวเองได้ จึงลดปัญหาการเกิดโรคระบาดและการใช้ยาในเวลาเดียวกัน โดยในปัจจุบันมีการใช้สารเสริมสุขภาพซึ่งเป็นแนวทางหนึ่งที่จะช่วยให้กุ้งมีความแข็งแรงในสภาพการเลี้ยงแบบพัฒนา ปัจจุบันได้มีการศึกษากลุ่มของสารที่เกี่ยวข้องในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดยพบว่า บีตากลูแคน และ นิวคลีโอไทด์สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงของกุ้งได้ บีตากลูแคนที่ใช้มีชื่อทางการค้าว่า ProVale™ ซึ่งเป็นบีตากลูแคนที่มีความบริสุทธิ์สูง เป็นน้ำตาลพวกโมโนแซคคาไรด์ ที่มีโครงสร้างโมเลกุลขนาดเล็ก เช่น กลูโคส ซึ่งจะง่ายต่อการดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดของกุ้ง ผลิตจากผนังเซลล์ของยีสต์ *Saccharomyces cereviceae* และนิวคลีโอไทด์ที่ใช้มีชื่อทางการค้าว่า NuPro ® เป็นสารพวกโปรตีนที่อยู่ในรูปนิวคลีโอไทด์ มีโครงสร้างเป็นเปปไทด์สายสั้น ทำให้กุ้งสามารถย่อยและดูดซึมไปใช้ได้ง่าย ผลิตจากยีสต์ *Saccharomyces cereviceae* ที่สกัดเอาผนังเซลล์ออก

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการใช้สารบีตากลูแคนและนิวคลีโอไทด์ ซึ่งมีความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดยศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของสารสองชนิดนี้ เพื่อประโยชน์ในการเลือกใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่มีประสิทธิภาพที่ดีในการเลี้ยงกุ้ง

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

ศึกษาผลของการใช้สารบีตากลูแคน และนิวคลีโอไทด์ เสริมในอาหารต่อการเติบโต การรอดตาย และการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งขาว *L. vannamei*

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ข้อมูลที่ได้สามารถนำมาใช้ในการปรับปรุงพัฒนาสูตรอาหารให้ถูกต้องมากขึ้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1ชีววิทยาของกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei* Boone)

กุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei* Boone) เป็นสายพันธุ์หลักของทวีปอเมริกา ในธรรมชาติพบได้ตั้งแต่ชายฝั่งทะเลของประเทศเม็กซิโกจนถึงชายฝั่งทะเลของประเทศเปรู ซึ่งเป็นเขตที่มีอุณหภูมิของน้ำประมาณ 26-28 องศาเซลเซียส และมีความเค็มประมาณ 35 พีพีที (ธนพงศ์, 2546) Farfante and Kenley (1997) ได้จำแนกอันดับของกุ้งขาวแวนนาไม ไว้ดังนี้

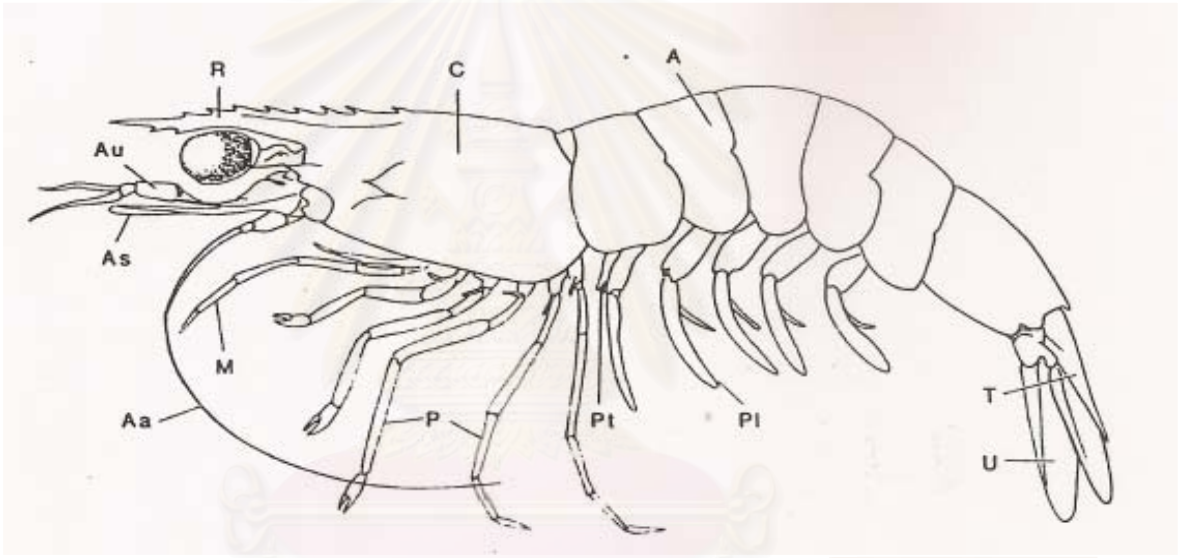
Phylum Arthropoda
Class Crustacea
Subclass Malacostraca
Order Decapoda
Suborder Natantia
Family Penaeidae
Genus *Litopenaeus*
Species *L.vannamei*

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Litopenaeus vannamei* Boone, 1931

2.2 ลักษณะที่ใช้จำแนก

Farfante and Kensley (1997) รายงานลักษณะทั่วไปของกุ้งขาวแวนนาไม (รูปที่ 2-1) คือ ผิวเรียบเกลี้ยงเป็นมัน กรี (rostrum) มีความยาวพอประมาณ มีฟันกรี (Ventral teeth) 2-4 อัน ในวัยอ่อนกรีจะยาวกว่าก้านหนวด (antennular peduncle) และเมื่อโตขึ้น จะมีขนาดสั้นลง บางครั้งอาจมีความยาวเพียงครึ่งหนึ่งของปล้องที่ 2 ของหนวดคู่ที่ 1 (antennule) บริเวณเปลือกคลุมหัวกับอก (carapace) มีหนวดคู่ที่ 2 (antenna) และ หนามบริเวณตับ (hepatic spine) ชัดเจน ไม่พบหนามที่อยู่บริเวณตา (orbital spine) และหนามที่อยู่มุมด้านล่างของส่วนหน้าของเปลือกคลุมหัว (pterygostomian spine) ไม่มีร่องหลังตา (postocular sulcus) ขนาดของสันหลังกรี (postrostral carina) มีความยาวหลายขนาด บางครั้งอาจพบว่ายาวถึงขอบด้านหลังของเปลือกคลุมหัวกับอก

(carapace) ร่องข้างกรี (adrostral sulcus) และสันข้างกรี (adrostral carina) สั้น หรืออาจยาวถึงบริเวณฟันที่อยู่เหนือกระเพาะอาหาร (epigastric tooth) ไม่พบสันที่อยู่หน้ากระเพาะอาหาร (gastrofrontal carina) สันที่อยู่ระหว่างกับตา(gastro-orbital cariva) ค่อนข้างสั้นซึ่งโดยทั่วไปจะยาวประมาณ 2 ถึง 3 ของระยะห่างระหว่างหนามบริเวณตับ และส่วนบริเวณตา (orbital margin) ร่องที่อยู่ระหว่างตากับหนวดคู่ที่ 1 (orbital antennal sulcus) เห็นได้ชัดเจน สันคอ (cervical carina) และสันตับ (hepatic carina) คมด้านข้างและเป็นร่องลึกไม่พบสันที่อยู่ระหว่างเหงือกกับหัวใจ (branchiocardiac carina) ไม่มีร่องตามยาว และร่องตามขวาง (longitudinal and transverse sutures) ส่วนลำตัวปล้องที่ 6 จะมีสันเรียงตัวกัน (cicatrices) 3 อัน ร่องที่อยู่ในแนวยาวด้านข้างของลำตัวด้านบน (antennular flagella) สั้นกว่าเปลือกคลุมหัวกับอกแผ่นรยางค์ของขากรรไกร (maxilla) คู่ที่ 1 ยาว ประกอบด้วยปล้อง 3-4 ปล้องตรงบริเวณปลายใกล้หางและยูโรพอด (uropod)



A. Abdomen	Aa. Antenna	As. Antennal scale	Au. Antennule
C. Carapace	M. Third maxilliped	P. Pereiopod	Pl. Pleopod
Pt. Petasma	R. Rostrum	T. Telson	U. Uropod

ภาพที่ 2-1 ลักษณะทั่วไปของกุ้งขาวแวนนาไม

ที่มา: Grey *et al*. (1983)

กุ้งขาวแวนนาไมมีลักษณะเด่น คือ สีของลำตัวเป็นสีขาวโปร่ง บางครั้งอาจเป็นสีฟ้า ขึ้นอยู่กับรงควัตถุสีฟ้าที่อยู่บริเวณหางและยูโรพอด (Eldred and Hutton, 1960) กรีด้านบนจะหยักและถี่ปลาย โดยที่มีฟันกรีด้านล่าง 2 อัน และด้านบน 8 อัน ความยาวของกรีจะยาวกว่าลูกตาไม่มาก และเห็นลำไส้ชัดเจนกว่ากุ้งขาวอื่นๆ (ภิญโญ, 2545) กุ้งชนิดนี้มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลง

สภาพของน้ำ ตื่นตกใจง่าย ลักษณะที่พิเศษของกุ้งสายพันธุ์นี้ คือ สามารถปรับตัวเข้ากับสภาวะแวดล้อมภายใต้ระบบเพาะเลี้ยงได้ โดยทำการเพาะเลี้ยงได้ทั้งในน้ำที่มีระดับความเค็ม 0-35 ppt แต่ระดับความเค็มที่เจริญเติบโตได้ดี คือ 12-22 ppt อุณหภูมิของน้ำในระดับที่เหมาะสมคือ 26-29 องศาเซลเซียส ซึ่งอาจเพาะเลี้ยงได้ทั้งในบริเวณชายฝั่งหรือบริเวณพื้นที่ในแผ่นดินที่เป็นเขตพื้นที่ความเค็มต่ำ (ปิยะบุตร, 2546ก)

2.3 การสืบพันธุ์

กุ้งขาวแวนนาไมมีเปลือกคลุมหัวและอกโปร่งใส ดังนั้นจึงสามารถมองเห็นรังไข่ (Ovary) ของเพศเมียได้อย่างชัดเจน ในระยะแรกรังไข่จะมีสีขาวใส เมื่อใกล้วางไข่จะเห็นเป็นสีน้ำตาลทอง หรือ เขียวอมน้ำตาล (Brown and Patlan, 1974) เพศผู้จะปล่อยน้ำเชื้อมาเก็บไว้ที่เปลือกแข็ง (hard-shell) ของเพศเมียซึ่งจะทำให้กุ้งวางไข่ภายในไม่กี่ชั่วโมงต่อมา การเกี้ยวพาราสีและการจับคู่ผสมพันธุ์ของกุ้งชนิดนี้จะเกิดขึ้นในช่วงบ่ายซึ่งจะสัมพันธ์กับความเข้มของแสง การผสมพันธุ์ของกุ้งชนิดนี้สามารถเกิดขึ้นได้โดยไม่ต้องรอการลอกคราบ (สามารถผสมพันธุ์ได้เมื่ออยู่ในระยะ intermolt ได้)

การพัฒนาของรังไข่จะเริ่มอย่างช้า ๆ จนกระทั่งวางไข่ ซึ่งสังเกตได้จากสีของรังไข่ Liao and Chen (1983) ได้กล่าวว่า สีของรังไข่สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ระยะ ได้แก่

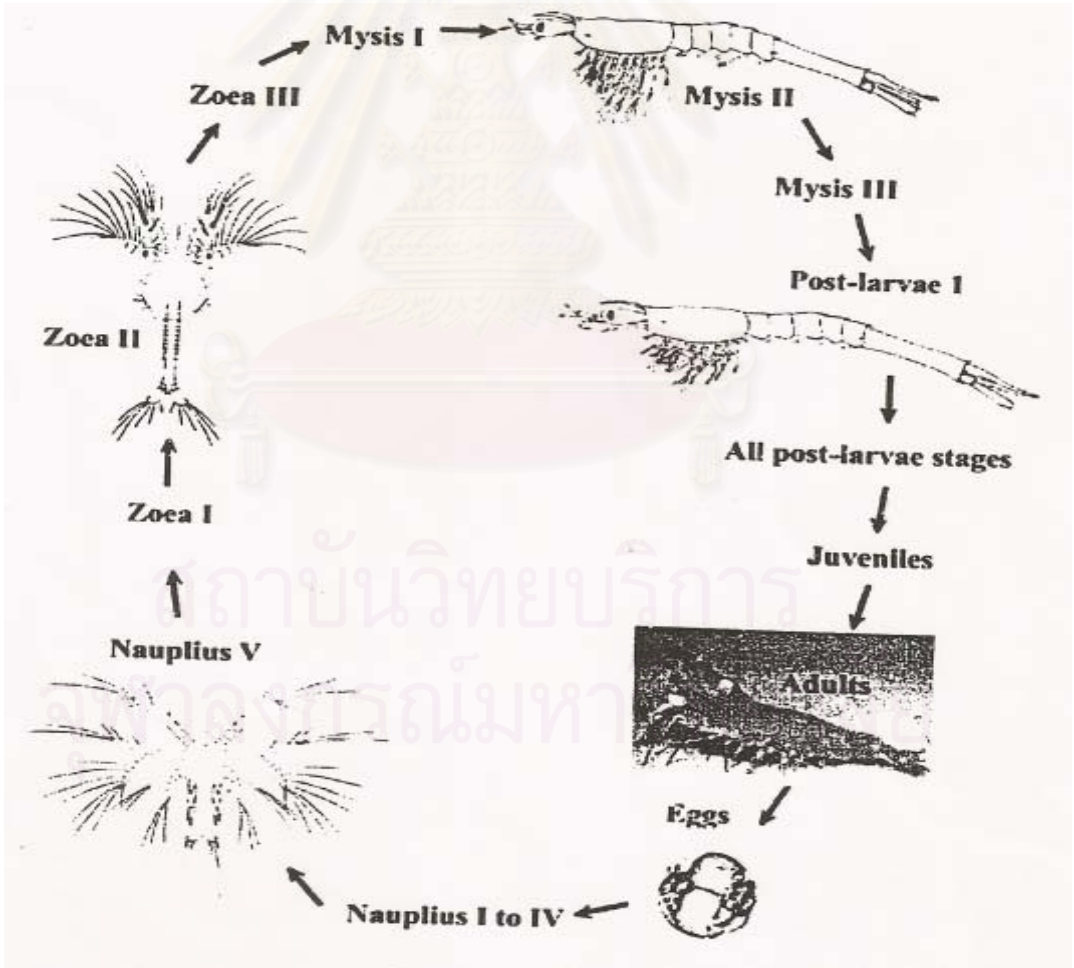
ระยะที่ 1 undeveloped stage เป็นระยะที่ยังไม่มีการพัฒนาของรังไข่ ในช่วงนี้รังไข่จะมีสีขาวใส
ระยะที่ 2 developing stage ในระยะนี้รังไข่มีการพัฒนา รังไข่จะมีสีเหลืองหรือแดง
ระยะที่ 3 early ripe stage เป็นระยะที่ไข่ใกล้จะสุก รังไข่จะมีสีน้ำตาลทอง
ระยะที่ 4 ripe stage เป็นระยะที่ไข่ใกล้จะสุกเต็มที่ รังไข่จะมีสีน้ำตาลอมเขียว

กระบวนการวางไข่เกิดขึ้นโดยกุ้งตัวเมีย ว่ายน้ำไปมาอย่างรวดเร็วหรืออาจมีการกระโดดร่วมด้วย ตัวผู้จะเข้าหาตัวเมียทางด้านหลัง และลงไปอยู่ทางด้านล่างของตัวเมีย จากนั้นก็จะว่ายคู่กันไปตลอด ในระหว่างนั้นก็ปล่อยฟีโรโมนที่เกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์ออกมา เมื่อตัวเมียพร้อมที่วางไข่แล้วตัวผู้ก็จะหงายท้องขึ้นประกบกับตัวเมียที่ว่ายน้ำอยู่ ใช้ขาว่ายน้ำรัดตัวเมียไว้และปล่อย sperm เข้าสู่อวัยวะสืบพันธุ์ของเพศเมีย สำหรับการผสมพันธุ์ในลักษณะเช่นนี้ จะเกิดขึ้นกับตัวเมียที่มีไข่แก่เต็มที่เท่านั้น (Ogle, 1992) อายุที่สามารถสืบพันธุ์ได้ครั้งแรกประมาณ 6-12 เดือน (Ceballos-Vazquez *et al*., 2003) ขนาดที่เหมาะสมสำหรับการสืบพันธุ์ พบว่า เพศผู้มีขนาด 30-40 กรัม และเพศเมีย 35-45 กรัม (Lee and Wickins, 1992) การฟักตัวของไข่เพื่อเข้าสู่ระยะ nauplius จะเริ่มขึ้นหลังจากวางไข่ 14 ชั่วโมง (Aquacop, 1979) ในระยะพัฒนาตัวอ่อนและวงจรชีวิตของกุ้งขาวแวนนาไม Kitani (1986) กล่าวว่า ระยะนอเพลียส (nauplius) มี 5 ระยะ (N1-N5) ระยะ

โปรโตซูเอี้ย (protozoea) หรือเรียกสั้น ๆ ว่าระยะซูเอี้ย (zoea) มี 3 ระยะ (Z1-Z3) และระยะ ไมซิส (mysis) มี 3 ระยะ (M1-M3) หลังจากนั้นก็จะเข้าสู่ระยะโพสลาวา (post-larvae) ต่อไป

2.4 วงจรชีวิต (รูปที่2-2)

กุ้งขาวแวนนาไมเป็นสัตว์ 2 ระดับน้ำ คือ ระยะโตเต็มวัยอยู่ในทะล แต่ช่วงที่ยังไม่สมบูรณ์เพศจะอยู่บริเวณชายฝั่ง พ่อ- แม่พันธุ์จะอยู่ในทะเลลึกประมาณ 70 เมตร ห่างจากชายฝั่งทวีปอเมริกา ซึ่งมีอุณหภูมิของน้ำ 26-28 องศาเซลเซียส ความเค็มประมาณ 35 พีพีที ไข่กุ้งจะฟักเป็นตัวและพัฒนาระยะตัวอ่อนในทะเล โดยระยะนี้ลูกกุ้งจะอยู่ในลักษณะของแพลงก์ตอนสัตว์ เมื่อเข้าสู่ระยะโพสลาวาจะอพยพเข้ามาอาศัยอยู่บริเวณน้ำตื้นชายฝั่งใกล้ปากแม่น้ำหรือป่าชายเลน ซึ่งเป็นบริเวณที่มีอาหารอุดมสมบูรณ์และหลบภัยจากศัตรูได้ดี คุณภาพน้ำ ความเค็ม และอุณหภูมิน้ำเปลี่ยนแปลงมากกว่าในทะเลหลังจากเจริญเติบโตอยู่บริเวณชายฝั่งประมาณ 2-3 เดือน กุ้งที่โตเต็มวัยจะอพยพกลับสู่ทะเลเพื่อพัฒนาความสมบูรณ์เพศไปเป็นพ่อ – แม่พันธุ์ต่อไป (ธนพงศ์, 2546)



ภาพที่ 2-2 วงจรชีวิตของกุ้งขาวแวนนาไม

ที่มา: Munoz *et al*. (2003)

2.5 การแพร่กระจาย

กุ้งขาวแวนนาไมเป็นกุ้งพื้นเมืองของชายฝั่งมหาสมุทรแปซิฟิกบริเวณอเมริกาใต้และกลาง (Rosenberry, 1993) พบได้ทางตอนเหนือของเม็กซิโกไปจนกระทั่งถึงทางตอนเหนือของเปรูที่มีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 20 องศาเซลเซียส (Holthuis, 1980) ได้แก่ บาจาแคลิฟอร์เนียของ เม็กซิโก กัวเตมาลา เอลซัลวาดอร์ นิการากัว คอสตาริกา ปานามา โคลัมเบีย เอกวาดอร์ และเปรู (Tseng, 1987) สามารถพบกุ้งชนิดนี้ตั้งแต่ บริเวณแนวปะการังจนถึงบริเวณพื้นท้องน้ำ ในระยะตัวอ่อนจะอาศัยอยู่บริเวณชายฝั่ง ทะเลสาบ หรือป่าชายเลน เมื่อโตเต็มวัยจะอาศัยอยู่ในทะเล Boddeke (1983) กล่าวว่า กุ้งชนิดนี้เป็น non-grooved species groups ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีการเคลื่อนไหวตลอดเวลา โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงเวลากลางคืน Dore and Frimodt (1987) กล่าวว่า กุ้งชนิดนี้เป็นกุ้งทะเลที่ชอบอยู่บริเวณพื้นท้องน้ำที่มีลักษณะเป็นพื้นโคลนหรือโคลนปนทรายตามชายฝั่งที่ระดับความลึกประมาณ 72 เมตร (235 ฟุต)

2.6 การกินอาหาร

กุ้งสกุล *Penaeus* เป็นพวกที่กินซากพืชและซากสัตว์ สิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก ที่อยู่ในโคลนเลน (นิพนธ์, 2522) นอกจากนี้ยังสามารถกินได้ทั้งสิ่งมีชีวิตที่อยู่บริเวณหน้าดินและซากของสิ่งมีชีวิตเหล่านั้นอีกด้วย (Wassenberg and Hill, 1987)

2.7 คุณภาพน้ำในการเลี้ยง

คุณภาพน้ำ หมายถึง คุณสมบัติทางชีวะ เคมี และกายภาพของน้ำ เช่น ความเค็ม อุณหภูมิ ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ สีของน้ำ ความเป็นกรดเป็นด่าง ความโปร่งแสง ปริมาณแอมโมเนีย และไฮโดรเจนซัลไฟด์ เป็นต้น (วรวิทย์, 2531) ซึ่งคุณภาพน้ำที่ดีย่อมส่งผลต่อการเจริญเติบโตของกุ้งที่เลี้ยง โดยค่าที่บ่งชี้คุณภาพน้ำ ได้แก่

2.7.1 อุณหภูมิ (temperature) อุณหภูมิน้ำเป็นปัจจัยหนึ่งที่ควบคุมการเจริญเติบโต และการแพร่พันธุ์ของพืชและสัตว์ซึ่งอุณหภูมิน้ำมีความสัมพันธ์โดยตรงกับแสง ถ้าปริมาณความเข้มแสงมากก็จะทำให้อุณหภูมิที่ผิวน้ำสูงขึ้น (เปี่ยมศักดิ์, 2525) อุณหภูมิมีผลต่อการกินอาหารและการเจริญเติบโตของกุ้ง โดยทั่วไปกุ้งสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิระหว่าง 25-30 องศาเซลเซียส แต่ที่อุณหภูมิ 35 เซลเซียส หรือสูงกว่ากุ้งจะตาย (Boyd and Fast, 1992) รวมทั้งค่าการนำไฟฟ้า (electrical conductivity, EC) ถ้าอุณหภูมิสูงจะทำให้ค่าการนำไฟฟ้าสูงขึ้น เพราะอุณหภูมิของน้ำสูงทำให้การแตกตัวเป็นอิออน ของเกลือมากขึ้น (สุธี, 2543) นอกจากนี้อุณหภูมิของน้ำตามธรรมชาติจะผันแปรตามอุณหภูมิอากาศขึ้นอยู่กับฤดูกาล ระดับความสูง กระแสลม ความลึก ความเร็วของกระแสน้ำและสภาพแวดล้อมทั่วไปของแหล่งน้ำ นอกจากนี้ยังเป็นปัจจัยที่ควบคุม

ปฏิกิริยาเคมีในน้ำ รวมทั้งควบคุมอัตราการสังเคราะห์แสง อัตราการหายใจ อัตราการย่อยสลาย และมีอิทธิพลโดยตรงต่อปริมาณออกซิเจน ที่ละลายน้ำ (ศิริเพ็ญ, 2543)

2.7.2 ความเค็ม (salinity) ความเค็มของน้ำ หมายถึง ความเข้มข้นทั้งหมดของไอออนที่ละลายอยู่ในน้ำ ประกอบด้วย โซเดียม โพแทสเซียม แคลเซียม แมกนีเซียม คลอไรด์ ซัลเฟต และไบคาร์บอเนต ในน้ำแต่ละประเภทจะมีไอออนเหล่านี้เป็นส่วนประกอบที่แตกต่างกัน ซึ่งแร่งธาตุทั้งหมดเหล่านี้มีผลกับความเค็มเพียงเล็กน้อย (Boyd, 1982) ชลอ และ พรเลิศ (2547) ระบุถึงความเค็มของน้ำในแหล่งน้ำจืดจะมีค่าระหว่าง 0.05-1 พีพีที ส่วนความเค็มของน้ำทะเลปกติมีค่าระหว่าง 30-35 พีพีที และค่า ความเค็มที่เหมาะสมต่อการเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไมอยู่ระหว่าง 5-35 ส่วนในพันส่วน (พีพีที) ความเค็มมีผลต่อการดำรงชีวิตของสัตว์น้ำ โดยเฉพาะการควบคุมปริมาณน้ำภายในร่างกาย (ไมตรี และ จารุวรรณ,2528; Conte, 1969) นอกจากนี้ความเค็มยังมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อโรคต่าง ๆ ที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคกุ้ง เช่น แบคทีเรีย *Vibrio* ส่วนใหญ่จะเจริญเติบโตได้ดีที่ความเค็มตั้งแต่ 20 พีพีที ขึ้นไป (Buchanan and Gobbons, 1974)

2.7.3 ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ (dissolved oxygen; DO) Boyd (1982) กล่าวว่า ออกซิเจนเป็นปัจจัยสำคัญมากที่สุดของสิ่งมีชีวิต เนื่องจากสิ่งมีชีวิตทุกชนิดจำเป็นต้องใช้ออกซิเจนในกระบวนการต่าง ๆ ภายในร่างกาย เพื่อการเจริญเติบโต ชะลอ และ พรเลิศ (2547) กล่าวว่า ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำมีผลต่อการกินอาหาร การเจริญเติบโต และสุขภาพกุ้ง ถ้าปริมาณออกซิเจนต่ำเกินไปอาจทำให้กุ้งตายได้ ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำควรมากกว่า 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (Brock and Main, 1994)

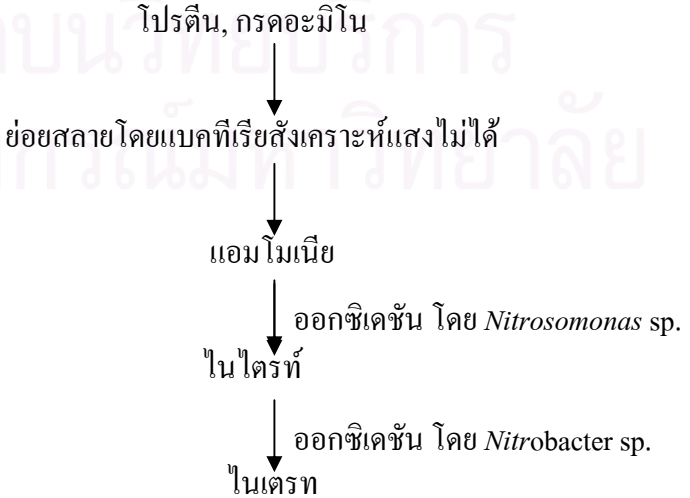
2.7.4 ความเป็นกรดเป็นด่างของน้ำ (พีเอช) พีเอชที่เหมาะสมในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมมีค่าประมาณ 7-9 (Brock and Main, 1994) การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชถูกควบคุมด้วยปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) และปริมาณอิออนที่มีในน้ำ (Boyd, 1982) โดยปกติพีเอชจะไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก แต่พีเอชจะเปลี่ยนแปลงได้ เมื่อเกิดการเน่าสลายของอาหารที่ตกค้างหรือมีการเกิดของแพลงค์ตอนพืชมาก ความเป็นกรด-ด่างจะมีการเปลี่ยนแปลงมากในช่วงวัน มีผลต่อการเจริญเติบโต และการลอกคราบของกุ้ง (วัลลภ, 2534)

2.7.5 ความเป็นด่าง (alkalinity) ความเป็นด่าง หมายถึง ความสามารถของน้ำที่รับ H^+ เพื่อทำให้กรดเป็นกลาง (ชะลอ และ พรเลิศ, 2547) ความเป็นด่างของน้ำประกอบด้วย คาร์บอเนต (CO_3^{2-}) ไบคาร์บอเนต (HCO_3^-) และไฮดรอกไซด์ (OH^-) เป็นส่วนใหญ่ ความเป็นด่างของน้ำที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงสัตว์น้ำควรอยู่ในช่วง 100-120 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนกุ้งขาวแวนนาไมค่าความเป็นด่างที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 50-150 มิลลิกรัมต่อลิตร (Brock and Main,1994)

2.7.6 แอมโมเนีย (ammonia) (NH_3) แอมโมเนียเป็นสารประกอบไนโตรเจนซึ่งเป็นองค์ประกอบ ที่สำคัญของสิ่งมีชีวิต (ยนต์, 2531) แอมโมเนียในบ่อกุ้ง เกิดจากการขับถ่ายของเสียจากสัตว์ และการเน่าสลายของเศษอาหารที่ตกค้างในบ่อ (วัลลภ, 2534) ไนโตรเจนในน้ำสามารถพบได้ในรูปของก๊าซไนโตรเจน (N_2) ไนเตรท (NO_3^-) ไนไตรท์ (NO_2^-) แอมโมเนียอิสระ (NH_3) อิออนแอมโมเนีย (NH_4^+) และสารอินทรีย์ไนโตรเจนต่างๆแอมโมเนียในน้ำจะแตกตัวในรูปของแอมโมเนียไอออน(ionizeammonia) (NH_4^+) และ ก๊าซแอมโมเนีย (un-ionize ammonia) (NH_3) ซึ่งแอมโมเนียในรูปของก๊าซแอมโมเนีย (un-ionize) จะเป็นพิษต่อสัตว์น้ำ ซึ่งผลรวม un-ionize ammonia และ ionize ammonia เรียกว่า Total Ammonia Nitrogen (TA-N) (Boyd, 1989) เมื่อพีเอชของน้ำสูง ความเป็นพิษของแอมโมเนียจะสูงตามไปด้วย ปริมาณของแอมโมเนียในบ่อกุ้งไม่ควรสูงกว่า 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำที่มีปริมาณแอมโมเนียจะแสดงถึงความไม่สมดุลในน้ำ และขาดระบบกรองที่ดี หรือการให้อาหารแก่สัตว์น้ำมากเกินไป หรือการปล่อยสัตว์น้ำในอัตราหนาแน่น ทำให้กระบวนการกำจัดสารอินทรีย์ และแอมโมเนียเป็นไปได้ยาก ทำให้เป็นอันตรายต่อสัตว์น้ำ (วัลลภ, 2534)

2.7.7 ไนไตรท์ (NO_2^-) โดยปกติพบไนไตรท์ในปริมาณที่ค่อนข้างต่ำในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำ เพราะส่วนมากถูกเปลี่ยนเป็นไนเตรท แต่ในบ่อที่น้ำมีพีเอชค่อนข้างสูงจะทำให้การเติบโตของแบคทีเรียที่เปลี่ยนไนไตรท์เป็นไนเตรทหยุดชะงัก ทำให้เกิดการสะสมของไนไตรท์ในบ่อ (Wickins, 1985) โดยปริมาณไนไตรท์ที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมควรต่ำกว่า 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของไนไตรท์ที่ปลอดภัยต่อสัตว์น้ำ ควรมีค่าเท่ากับ 0.3599 มิลลิกรัมต่อลิตร (Spraque, 1971)

2.7.8 ไนเตรท (NO_3^-) เป็นสารที่ได้จากการสลายสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ที่เป็สารประกอบไนโตรเจนโดยใช้ออกซิเจน



ภาพที่ 2-3 ขั้นตอนของปฏิกิริยาการสลายตัวของสารประกอบไนโตรเจน

ในสภาพปกติของปฏิกิริยานี้ แอมโมเนียและไนไตรท์จะมีปริมาณน้อยกว่า 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่จะมีปริมาณไนเตรทสะสมอยู่ กระบวนการที่ทำให้ไนเตรทเพิ่มขึ้น คือ มีการสลายของสารอินทรีย์ สารอนินทรีย์เพิ่มขึ้น มีการให้อาการมากเกินไป มีการใส่ปุ๋ยที่มีไนโตรเจน ไนเตรทจะไม่เกิดอันตรายกับสัตว์น้ำมากเมื่อเทียบกับแอมโมเนีย และไนไตรท์ แต่ไนเตรทจะทำให้สุขภาพสัตว์น้ำไม่ดี

ปริมาณไนเตรทที่เหมาะสมกับคุณภาพน้ำ (วัลลภ, 2534)

ระดับไนเตรท (มิลลิกรัมต่อลิตร)	คุณภาพน้ำ
0-12.5	ดีมาก
12.5-2.5	ปานกลาง ควรเปลี่ยนน้ำบ้าง
2.5- 5.0	ไม่ดี เริ่มมีมลภาวะต้องเปลี่ยนน้ำ
มากกว่า 50	จำเป็นต้องเปลี่ยนน้ำ

2.7.9 ความกระด้าง (Hardness) เกิดจากตะกอนของแคลเซียมอิออน (Ca^{2+}) และแมกนีเซียมอิออน (Ma^{2+}) เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งจะวัดออกมาเป็นปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) ที่มีอยู่เป็นเกณฑ์ สามารถแบ่งความกระด้างของน้ำได้ดังนี้

น้ำอ่อน	0-75 mg/l as $CaCO_3$
น้ำค่อนข้างกระด้าง	75-150 mg/l as $CaCO_3$
น้ำกระด้าง	150-300 mg/l as $CaCO_3$
น้ำกระด้างมาก	> 300 mg/l as $CaCO_3$

ความกระด้างของน้ำโดยตัวมันเองไม่ถือว่าเป็นปัจจัยที่สำคัญที่ทำให้เกิดอันตรายต่อสัตว์น้ำ (ไมตรี และ จารุวรรณ, 2528) แต่มีความสำพันธ์กับค่าความเป็นด่างและพีเอช นอกจากนี้ความกระด้างของน้ำยังช่วยลดความเป็นพิษหลายชนิดโดยฉพาะพวกโลหะหนัก ดังนั้นน้ำกระด้างปานกลางหรือสูงจึงมีความเหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของสัตว์น้ำ น้ำอ่อนโดยเฉพาะน้ำฝนไม่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (ไมตรี และ จารุวรรณ, 2528)

2.7.10 ค่าการนำไฟฟ้า (Conductivity) สิริ (2528) กล่าวว่า การนำไฟฟ้า คือ ความสามารถในการนำไฟฟ้าของน้ำหรือของเหลวอื่น ๆ ประสิทธิภาพการนำไฟฟ้าขึ้นอยู่กับปริมาณ และความเข้มข้นไอออน การเคลื่อนที่ ประจุ อุณหภูมิและคุณสมบัติของน้ำหรือของเหลวอื่น ๆ ซึ่งของเหลวที่เป็นกรด ด่าง และเกลือของอนินทรียสารจะเป็นตัวนำไฟฟ้าที่ดี ถ้าค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายและปริมาณของแข็งที่ละลาย(dissolved solids) มีปริมาณมาก แสดงว่าอนินทรียสารละลายน้ำสูง และค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายลดลง แสดงว่าปริมาณสารอนินทรียสารที่ละลายน้ำลดลง (APHA *et al*., 1989 และ สุธี, 2543) นอกจากนี้เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจะทำให้ค่าการนำไฟฟ้าสูงขึ้น

เพราะอุณหภูมิของน้ำสูงขึ้น จะทำให้การแยกตัวเป็นไอออนของเกลือมากยิ่งขึ้น และค่าพีเอชที่มากกว่า 9 หรือน้อยกว่า 5 จะมีผลทำให้ค่าการนำไฟฟ้าสูงขึ้น เพราะน้ำหรือของเหลวที่เป็นกรดและด่างแก่ มีปริมาณ H^+ และ OH^- มาก ซึ่งมีผลทำให้ค่าการเคลื่อนที่ของปริมาณอิออนสูง (สุธี, 2543)

2.8 โรคของกุ้งขาวแวนนาไม (รวมความรู้การเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม, 2549)

ในการเลี้ยงกุ้งทะเลนั้นโรคนับเป็นอุปสรรคที่สำคัญอย่างยิ่ง เนื่องจากสามารถก่อให้เกิดความเสียหายได้ทุกขณะโดยมีผลกระทบโดยตรงต่ออัตรารอด และปริมาณผลผลิตกุ้งโดยทำให้กุ้งมีอัตราการเจริญเติบโตต่ำ กินอาหารน้อยลง พิการ ป่วยและตายในที่สุด

2.8.1 สาเหตุการเกิดโรค

กุ้งจะเป็นโรคได้นั้นเกิดจากองค์ประกอบร่วม 3 ประการพร้อมกัน คือ

2.8.1 กุ้ง (host) คือตัวกุ้งเอง ซึ่งอยู่ในสภาพที่อ่อนแอ ซึ่งอาจเกิดได้จากพันธุ์ที่ไม่ดี ได้รับเชื้อโรคถ่ายทอดมาจากพ่อแม่ หรือเกิดจากตัวกุ้งเองที่อยู่ในสภาพความเครียด ร่างกายจึงอ่อนแอ มีภาวะภูมิคุ้มกันต่ำ

2.8.2 เชื้อโรค (pathogen) คือ มีชนิดเชื้อโรคที่ก่อให้เกิดโรคนั้นๆ รวมถึงเชื้อโรคนั้นมีปริมาณมากพอที่สามารถก่อให้เกิดโรคได้

2.8.3 สภาพแวดล้อม (environment) คือ สภาพแวดล้อมที่กุ้งอาศัยอยู่ไม่เหมาะสม ก่อให้เกิดความเครียด มักเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้กุ้งเป็นโรคได้ง่าย ได้แก่ การเตรียมบ่อไม่ดี มีความเป็นกรดสูง คุณภาพดินและน้ำไม่เหมาะสม มีของเสียสะสมในบ่อมากเกินไป ได้รับอาหารที่มีคุณภาพต่ำ ขาด แร่ธาตุ มีสารพิษปะปน มีปริมาณแพลงก์ตอนพืชสูงเกินไป รวมถึงการจัดการฟาร์มด้านอื่นๆ เช่น สุขอนามัยของฟาร์มไม่ดี เป็นต้น

2.8.2 การแบ่งชนิดของโรค

สามารถแบ่งชนิดของโรคออกได้เป็น 2 ชนิด ได้แก่ โรคติดเชื้อและโรคไม่ติดเชื้อ

2.8.2.1 โรคติดเชื้อ เกิดจากเชื้อโรคชนิดที่รุนแรงและสามารถแพร่ระบาดต่อไปยังบ่อและฟาร์มอื่นๆ ได้อีกด้วย ได้แก่ เชื้อไวรัส เชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา เชื้อโปรโตซัว เป็นต้น

2.8.2.1.1 โรคไวรัส เป็นสิ่งมีชีวิตที่มีขนาดเล็กๆไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า เชื้อไวรัสประกอบด้วยสารพันธุกรรม (กรดนิวคลีอิค) ที่เป็น DNA หรือ RNA อย่างใดอย่างหนึ่งอยู่ภายในและมีปลอกโปรตีน (capsid) หุ้มอยู่ ซึ่งทำให้มีอนุภาคใหญ่ขึ้น และบางครั้งอาจมีเยื่อหุ้ม

(envelope) บาง ๆ มาหุ้มปลอกโปรตีนอีกชั้น ไวรัสมักมีขนาด 10-300 นาโนเมตร ไวรัสมีการสืบพันธุ์โดยเพิ่มจำนวนในเซลล์สิ่งมีชีวิตเท่านั้น ไม่สามารถที่จะดำรงชีวิตอยู่นอกเซลล์สิ่งมีชีวิต โดยเริ่มแรกไวรัสจะเข้าไปจับกับพื้นผิวเซลล์ที่เฉพาะเรียก receptor แล้วแทรกตัวเข้าไปในผนังเซลล์ (endocytosis) และปล่อยสารพันธุกรรมของมันเข้าไปขัดขวางการทำงานของสารพันธุกรรมของเซลล์ ทำให้เซลล์ทำงานผิดปกติ และสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสจะบังคับให้สารพันธุกรรมของเซลล์สัตว์สร้างสารพันธุกรรมที่เหมือนของไวรัสเพื่อเพิ่มจำนวนไวรัสตัวใหม่ เมื่อมีจำนวนมากขึ้น ก็จะย่อยเซลนั้นออกมา เมื่อทำให้เซลล์ตายแล้วก็จะขยายเข้าทำลายเซลล์ข้างเคียง เมื่อเซลล์ตายปีนจำนวนมากขึ้น การทำงานของเนื้อเยื่อและอวัยวะต่างๆ ก็จะเสียไป และสัตว์ก็จะตายในที่สุด

โรคไวรัสกุ้งขาวที่สำคัญ มีดังนี้

1.โรคไวรัสตัวแดงดวงขาว (White spot syndrome virus; WSSV)

สาเหตุเกิดจากไวรัสชนิดดีเอ็นเอ (DNA) รูปร่างเป็นแท่ง ขนาดความยาว 250-280 นาโนเมตร มีผนังหุ้ม มักพบในกุ้งสกุล Penaeid ทุกชนิด ได้แก่กุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) กุ้งขาว (*L. vannamei*) กุ้งญี่ปุ่น (*P. japonicus*) และอื่นๆ ลักษณะอาการที่พบ คือ ลำตัวกุ้งมีสีแดง มีดวงขาวบริเวณผิวใต้เปลือกขนาด 1-2 มิลลิเมตร บริเวณส่วนหัวและลำตัวกุ้ง มีอัตราการตายสูงมาก 40-100% ภายใน 5-10 วัน

การติดต่อ: ถ่ายทอดทางพ่อแม่พันธุ์มายังลูกกุ้งได้ กุ้ง ปู ทุกชนิดเป็นพาหนะ ติดต่อทางน้ำได้

2.โรคไวรัสทอร่า (Taura Syndrome Virus; TSV)

สาเหตุเกิดจากเชื้อไวรัสชนิดอาร์เอ็นเอ (RNA) มีขนาด เส้นผ่าศูนย์กลาง 31-32 นาโนเมตร อยู่ในกลุ่ม Picornaviridae มักพบในกุ้งขาวโดยเฉพาะ *L. vannamei* ลักษณะอาการของกุ้งป่วยพบว่าบริเวณหางมีสีแดงชัดเจน ถ้าเป็นมากลำตัวมีสีแดง เปลือกนิ่ม เซื่องซึม กุ้งจะตายมากในช่วงลอกคราบ โดยมีอัตราการตาย 40-90% ถ้ากุ้งรอดตายจากการติดเชื้อจะปรากฏรอยแผลสีดำที่เปลือก โรคนี้มักพบในกุ้งขาววัยอ่อนและกุ้งวัยรุ่นในกุ้งที่มีอายุ 14-40 วัน หลังจากปล่อยเลี้ยง

การติดต่อ: ถ่ายทอดทางพ่อแม่พันธุ์มายังลูกกุ้งได้ กุ้ง ปู ทุกชนิดเป็นพาหนะ ติดต่อทางน้ำได้เป็นอย่างดี

3.โรคหัวเหลือง (Yellow Head Virus; YHV)

สาเหตุของโรคเกิดจากเชื้อไวรัสชนิดอาร์เอ็นเอ (SS RNA) รูปร่างเป็นแท่งมีผนังหุ้ม เพิ่มจำนวนอนุภาคใน cytoplasm ขนาด 44±6×173±13 นาโนเมตร, จีโนมประมาณ 22 kb พบในกุ้งสกุล Penaeid หลายชนิด เช่น กุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) กุ้งขาว(*L. vannamei*), *P. japonicus*, *P. setiferus*,

P. aztecus, *P. duorarum* และ *P. stylirostris* เป็นต้น ลักษณะอาการที่พบ คือ กุ้งลำตัวซีด เหงือกและบริเวณตับและตับอ่อนมีสีเหลืองเห็นชัดเจน กุ้งกินอาหารเพิ่มมากผิดปกติ จากนั้นจะเริ่มกินลดลง กุ้งเริ่มแสดงอาการหัวเหลือง ตายเร็วมากภายใน 3-5 วัน

การติดต่อ: ผ่านทางน้ำ อาหาร สัมผัสโดยตรงกับเชื้อไวรัส และพาหะนำเชื้อ เช่น กุ้ง ปู นก

4.โรคไวรัสไอเอชเอชเอ็นวี (Infectious Hepatopancratic Hemopoietic Necrosis Virus; IHHNV)

สาเหตุเกิดจากเชื้อไวรัสชนิดอาร์เอ็นเอ (RNA) มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 22 นาโนเมตรอยู่ในกลุ่ม Parvoviridae พบในกุ้งกลุ่ม Penaeid หลายชนิดเช่นกุ้งขาว (*L. vannamei*), *P. stylirorostris, P. monodon* และ *P. japonicus* เป็นต้น ลักษณะอาการ ในกุ้งขาวเป็นแบบเรื้อรัง (chronic infection) เรียกว่า “runt deformity syndrome” (RDS), กุ้งแคระแกรนหรือกุ้งพิการ จะโตช้า มีกรีดงอ ส่วนหัวกุ้งจะสั้นกว่าปกติมักพบกุ้งที่มีปัญหาดังกล่าวในบ่อประมาณ 30-90 % ของกุ้งที่เลี้ยง

5.โรคกล้ามเนื้อขุ่นขาว หรือ โรคไอเอ็มเอ็นวี (Infectious Myonecrosis Virus; IMNV)

สาเหตุเกิดจากเชื้อไวรัสในกลุ่ม Totiviridae ชนิด unenveloped dsRNA มีขนาด 40 nm. พบในกุ้งขาว *L. vannamei* ลักษณะอาการ คือ พบกล้ามเนื้ออักเสบเป็นสีขาวขุ่นบริเวณปลายหาง แพนหาง และลำตัวตอนท้าย กุ้งจะอ่อนแอมีการดีดตัวน้อยลง พบกุ้งว่ายขึ้นผิวน้ำหรือเกาะที่ขอบบ่อ แต่มีการกินอาหารปกติ จนเมื่ออาการมากขึ้นจะพบกุ้งว่ายขึ้นผิวน้ำหรือเกาะที่ขอบบ่อมากขึ้น เริ่มมีกล้ามเนื้อบริเวณลำตัวขุ่นขาวร่วมด้วย แต่ไม่มีลักษณะขุ่นขาวแบบต่อเนื่องจากส่วนหาง ก่อให้เกิดการตายได้ในช่วงกุ้งระยะวัยรุ่นถึงระยะก่อนโตเต็มวัย ได้ถึงประมาณ 60-85 % และพบว่าเป็นการตายช้าๆ เป็นแบบสะสมมากกว่า

การติดต่อ: ติดต่อผ่านทางน้ำ และพาหนะนำเชื้อได้แก่ กุ้งสกุลกลุ่ม Penaeid

2.8.2.1.2 โรคแบคทีเรีย เชื้อแบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่มีโครงสร้างแบบง่ายๆ เป็นเซลล์ที่มีลักษณะแบบ Procaryotic cell มีลักษณะโครงสร้างและสมบัติต่างๆคล้ายกับพืช เชื้อแบคทีเรียที่มีบทบาทมากในโรคกุ้งจะเป็นเชื้อวิบริโอ (*vibiro* sp.) ซึ่งมักจะเป็นแบคทีเรียเคลื่อนไหวได้ รูปร่างทรงกระบอกหรือท่อนโค้ง มักย้อมติดแกรมลบ เชื้อแบคทีเรียเหล่านี้จะมีบทบาทเข้าทำลายเม็ดเลือด และการกระจายตัวไปตามระบบทางเดินโลหิต เคลื่อนตัวเข้าสู่ระบบของต่อมสร้างน้ำย่อย หรือตับอ่อน เมื่อเนื้อเยื่อเหล่านี้ถูกทำลาย การทำงานของต่อมสร้างน้ำย่อยก็จะเสียไป ทำให้กุ้งไม่กินอาหาร และตายในที่สุด

โรคที่เกิดจากแบคทีเรียในกุ้งขาวที่มักจะพบและรุนแรง ได้แก่

1.โรควิบริโอซีส (Vibriosis)

สาเหตุเกิดจากแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอ (*Vibrio* sp.) ได้แก่ *V.parahemolyticus* และ *V.vulnificus* เป็นต้น ลักษณะอาการ คือ กุ้งกินอาหารลดลง ตัวกรอบแกรบ เปลือกนิ่ม ขึ้นข้างหรือว่ายวนขอบบ่อ อาจมีดวงขาวที่เปลือกทั้งส่วนหัวและลำตัว ตัวกุ้งอาจมีสีแดงกล้ามเนื้อตายมักมีสีขาวขุ่น กุ้งมีอัตราการตายสูงโดยเฉพาะในกุ้งมีอายุ 1-2 เดือน

การติดต่อ: ติดต่อผ่านทางน้ำเป็นหลัก

2.โรคแบคทีเรียเรืองแสง

สาเหตุเกิดจากเชื้อแบคทีเรียเรืองแสง (*Vibrio harveyi*) พบอัตราการตายสูงในกุ้งระยะวัยอ่อนถึงวัยรุ่นอาการที่พบ คือ กุ้งลอยหัว มีแสงเรืองในเวลากลางคืน หรือในที่มืด ในกุ้งวัยรุ่นจะว่ายขึ้นผิวน้ำ ขอบบ่อ กุ้งกินอาหารลดหรือไม่กินอาหาร มักพบเชื้อแบคทีเรียในกระแสเลือด และกล้ามเนื้อ

การติดต่อ: ติดต่อผ่านทางน้ำเป็นหลัก

โดยส่วนใหญ่การเข้าทำลายกุ้งของเชื้อแบคทีเรีย มักมีสาเหตุหลักมาก่อน เมื่อกุ้งอ่อนแอในบ่อเลี้ยงมีเชื้อแบคทีเรียชนิดนั้นๆอยู่ ก็จะสามารถติดเชื้อแบคทีเรียต่อไปได้ (secondary infection) สาเหตุหลักมักเกิดจากที่ไม่สามารถควบคุมสภาพแวดล้อมในบ่อได้

การทำลายเชื้อแบคทีเรียสามารถทำได้ทั้งกายภาพและเคมี oxidizing agent เป็นสารเคมีที่มีประสิทธิภาพในการทำลายจุลินทรีย์ต่างๆได้ดี ที่นิยมใช้มากได้แก่ คลอรีน ไอโอดีน และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์(H_2O_2) นอกจากนี้กุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรียยังสามารถรักษาได้ด้วยยาปฏิชีวนะที่เหมาะสมได้อีกด้วย

2.8.2.1.3 เชื้อโปรโตซัว เป็นสิ่งมีชีวิตที่มีเซลล์เดียวขนาดเล็กที่ต้องมองด้วยกล้องจุลทรรศน์ มีทั้งพวกที่เข้าทำลายเนื้อเยื่อกุ้งหรือเข้าทำลายภายใน กับพวกที่เกาะอยู่ตามระยางค์ หรือทำลายภายนอกตัวกุ้ง พวกที่เกาะอยู่ภายนอกตัวกุ้งที่รู้จักกันดี คือซูโอแทนเนียม อีพิสไตลิส มักพบในบ่อกุ้งที่อุดมไปด้วยสารอินทรีย์ จะไปเกาะตามระยางค์และเหงือกไปขัดขวางการทำงานของระบบหายใจ ทำให้กุ้งอ่อนแอ และไม่ค่อยเคลื่อนที่ และอาจขาดออกซิเจนได้ง่าย สัตว์เซลล์เดียวอีกกลุ่มหนึ่งที่พบว่าเข้าทำลายเนื้อเยื่อของกุ้งได้คือ พวกเชื้อไมโครสปอริเดียน (โรคกล้ามเนื้อหลังขาว) ซึ่งเป็นการทำลายเฉพาะที่ โดยจะทำลายกล้ามเนื้อจนมีสีขาวคล้ายน้ำนม พบมากในกุ้งที่เลี้ยงอย่างหนาแน่น และบางครั้งอาจพบเข้าทำลายเนื้อเยื่ออวัยวะภายในได้ โรคนี้แม้อัตราการตายไม่สูง แต่ทำให้กุ้งไม่สามารถขายได้

2.8.2.1 โรคไม่ติดเชื้อ เป็นโรคที่ไม่ได้มีสาเหตุมาจากเชื้อโรค ไม่มีการแพร่ระบาด มักเกิดขึ้นจากการขาดสารอาหาร ได้รับสารพิษ และเกิดจากสิ่งแวดล้อมนั้นๆเอง ได้แก่ โรคขาดวิตามินซี โรคขาดสารอาหาร เกลือแร่ ซึ่งจะเป็นให้กุ้งเติบโตผิดปกติ โตช้า อ่อนแอ หรือเป็นโรคที่ปนเปื้อนมากับอาหาร เช่น เชื้อรา ก่อให้เกิดอาหารเป็นพิษกับกุ้ง หรือได้รับสารพิษจากสาหร่ายที่ผลิตสารพิษได้ เช่น สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน โรคเหงือกดำเป็นโรคที่เกิดจากสีน้ำในบ่อเข้มจัด มีปริมาณหนาแน่นเกินไป หรือได้รับสารพิษจากยาฆ่าหญ้า ยาฆ่าแมลง โลหะหนัก ก๊าซพิษต่างๆ เช่น ก๊าซแอมโมเนีย ก๊าซไข่เน่า เป็นต้น โรคที่เกิดจากสาเหตุเหล่านี้ หากได้รับในปริมาณมาก กุ้งอาจตายได้อย่างเฉียบพลัน หากได้รับในปริมาณน้อยๆ ก็จะมีผลทำให้อวัยวะต่างๆโดยเฉพาะตับและตับอ่อน จะค่อยๆเสื่อมลง จนทำให้ตับวาย ตับฝ่อ และตายได้ในที่สุด โรคไม่ติดเชื้อสามารถแก้ไขได้โดยการจัดการที่ดี เช่น ปล่อยกุ้งในอัตราความหนาแน่นพอดี ให้อาหารในปริมาณพอดี ปรับคุณภาพน้ำให้เหมาะสม

2.9 ระบบภูมิคุ้มกันระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม

2.9.1 ภูมิคุ้มกัน (immunity)

ภูมิคุ้มกัน (immunity) หมายถึง กลไกตามธรรมชาติที่ทำให้ร่างกายสามารถจดจำสิ่งแปลกปลอมได้และพยายามกำจัดสิ่งแปลกปลอมทิ้งไป ซึ่งอาจเป็นอันตรายหรือไม่เป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อของตนเองด้วยวิธีการต่าง ๆ (สุทธิพันธ์ และคณะ, 2542)

ฤทัย (2539) กล่าวว่าระบบภูมิคุ้มกัน (immune system) หมายถึง การตอบสนองของร่างกายที่จำเพาะต่อแอนติเจนของสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายโดยสามารถจำแนกสิ่งที่เป็นตัวเรา (Self antigen) ออกจากสิ่งที่ไม่เป็นตัวเรา (non-self antigen)

2.9.1.1 ระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง

Lackie (1986) ได้กล่าวถึงลักษณะสำคัญของระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังไว้ 4 ลักษณะ คือ

1. ไม่มีการสร้างสารอิมมูโนโกลบูลิน (Immunnoglobulin; Ig)
2. มีความสามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างสิ่งที่เป็นของตัวเองกับสิ่งแปลกปลอม
3. สัตว์ในกลุ่มไม่มีกระดูกสันหลังเป็นสัตว์ที่มีระบบเลือดแบบเปิด จึงจำเป็นต้องมีกลไกในการป้องกันตัวทันทีที่สิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกาย โดยอาศัยการทำงานของเซลล์เม็ดเลือด ทำให้เกิดกระบวนการ phagocytosis, encapsulation และ coagulation เพื่อป้องกันการสูญเสียเลือดขณะเกิดบาดแผล
4. มีโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในน้ำเลือดมีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย

2.9.1.2 ระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ในกลุ่มครัสเตเซียน

ระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ในกลุ่มครัสเตเซียน เป็นระบบภูมิคุ้มกันตามธรรมชาติ ซึ่งเป็นระบบที่ไม่สามารถแยกความแตกต่างของสิ่งแปลกปลอมหรือจุลินทรีย์ต่าง ๆได้อย่างจำเพาะเจาะจง และไม่มีการปรับเปลี่ยนการตอบสนองโดยการสร้างแอนติบอดีถึงแม้ว่าจะสัมผัสกับสิ่งที่มาคุกคามหลาย ๆ ครั้งก็ตาม (Lackie, 1980; Smith and Chisholm, 1992) ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งแบ่งเป็น 2 ระบบ (Ratcliffe *et al*, 1985) คือระบบภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์ (cellular defenses) และระบบภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยสารน้ำ (humoral defenses) ซึ่งการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันทั้ง 2 แบบนี้จะต้องทำงานร่วมกัน

1.ระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์ (cellular immunity) เซลล์ที่มีบทบาทสำคัญคือ เซลล์เม็ดเลือด 3 ชนิด คือ ไฮยาลีนเซลล์ (hyaline cell) เซมิกรานูลาร์ (semi-granular) ลาร์จกรานูลาร์ (large granular) และเซลล์จับกินที่อยู่กับที่ (fix phagocyte) กระจายอยู่ตามเนื้อเยื่อ ต่อมน้ำเหลือง กล้ามเนื้อหัวใจ และอวัยวะอื่น ๆ (วัชริยา, 2547)

โดยทั่วไปเซลล์เม็ดเลือด (heamocytes) ของครัสเตเซียนแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ เซลล์ไฮยาลีน (hyaline cell) และเซลล์ที่มีกรานูล (granular haemocyte) ซึ่งการแยกชนิดเซลล์เม็ดเลือดขึ้นอยู่กับลักษณะการมีหรือไม่มีกรานูลของเซลล์เม็ดเลือดเป็นหลัก (Bauchau, 1981)

เม็ดเลือดกุ้งแบ่งออกเป็น 3 ชนิด คือ

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

2. Semi-granular cell หรือ intermediate granulocyte เป็นเซลล์เม็ดเลือดชนิดที่มีกรานูลอยู่ในไซโตพลาสซึ่ม ขนาดเล็ก มีนิวเคลียสรูปกลมหรือรูปไข่อยู่กลางเซลล์ โดยเซลล์เม็ดเลือดชนิดนี้จะแตกได้ง่ายเมื่ออยู่ในหลอดทดลอง ทำให้เกิดการ degranulation ดังนั้น ต้องใช้ความระมัดระวังสูงในการศึกษา (Bauchau, 1981 และ Soderhall and Cerenius, 1992)

3. granular cell (granulocyte) เซลล์ชนิดนี้มีขนาดใหญ่ที่สุด รูปร่างเป็นรูปไข่ นิวเคลียสมีขนาดเล็กรูปร่างโค้งคล้ายไต เส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์ 8-10 ไมครอน กว้าง 7.2-7.8 ไมครอน ยาว 12.2-14.6 ไมครอน (กิจการ และคณะ, 2543ข) ภายในไซโตพลาสซึมมีกรานูลขนาดใหญ่ เมื่อเทียบกับ semi-granular (Baucha, 1981)

โครงสร้างของเซลล์เม็ดเลือดทั้ง 3 ชนิด ของพวกครัสเตเซียน พบว่า เซลล์เม็ดเลือดชนิด hyaline cell ทำหน้าที่ในการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม ส่วนเซลล์เม็ดเลือดชนิด semi-granular cell

และ granular cell เป็นส่วนประกอบสำคัญของระบบโปรฟีนอลออกซิเดส (Smith and Soderhall, 1983)

ปริมาณเม็ดเลือดมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลา กรณีที่กุ้งเกิดการติดเชื้อโรคจะส่งผลให้ปริมาณเม็ดเลือดลดลง จากนั้นเม็ดเลือดใหม่จะถูกสร้างขึ้นมาทดแทนในปริมาณที่เหมาะสม ซึ่งโดยปกติเม็ดเลือดจะถูกสร้างขึ้นตลอดเวลาจาก haematopoietic tissue ซึ่งเนื้อเยื่อดังกล่าวสามารถใช้ในการจำแนกชนิดของครัสเตเซียนได้อีกด้วย (Mats *et al*., 2000)

2. ระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด (humoral immunity) ระบบนี้เกิดจากการทำงานของหลาย ๆ ปฏิกิริยา เช่น การแข็งตัวของเลือด (blood clotting) การเกิด Melanin (melanin formation หรือ melanization) และ opsonization ซึ่งเกี่ยวข้องกับระบบที่สำคัญที่เรียกว่า Prophenoloxidase activating system และเลคติน (Lectin) (วัชริยา, 2547) ซึ่งคอยดักจับสิ่งแปลกปลอม

2.9.1.3 ระบบภูมิคุ้มกันที่ทำงานโดยเซลล์ (Cellular immunity) ระบบภูมิคุ้มกันที่ทำงานโดยเซลล์ มักจะใช้เซลล์เม็ดเลือดเป็นหลักในการต่อสู้และกำจัดสิ่งแปลกปลอม ซึ่งมีหลายวิธี ได้แก่ phagocytosis, nodule formation และ encapsulation โดยทั่วไปสิ่งแปลกปลอมที่มีขนาดเล็กและมีจำนวนน้อยจะถูกกำจัดโดยกระบวนการ phagocytosis สำหรับ nodule formation จะเป็นการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมขนาดเล็กแต่มีจำนวนมากส่วน encapsulation จะเกิดขึ้นเมื่อมีสิ่งแปลกปลอมขนาดใหญ่เข้าสู่ร่างกาย

2.9.1.3.1 กระบวนการกลืนทำลายหรือฟาโกไซโตซีส (phagocytosis) ฟาโกไซโตซิสเป็นกลไกพื้นฐานที่สำคัญในการป้องกันโรคของครัสเตเซียนส่วนใหญ่โดยอาศัยสารน้ำในการช่วยเสริมการทำงาน (Sindermann, 1971) ฟาโกไซโตซิสนับเป็นด่านแรกในการป้องกันเมื่อมีสิ่งแปลกปลอมผ่านชั้นผิวปกคลุมเข้ามาสู่ร่างกาย ฟาโกไซท์ (phagocytes) เป็นเม็ดเลือดที่สามารถทำให้สิ่งแปลกปลอมที่เป็นเซลล์หรือสิ่งมีชีวิตเล็กๆ ซึ่งอาจเป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรคได้สลายตัวโดยกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม (วัชริยา, 2549)

2.9.1.3.2 การแข็งตัวของเลือด (clotting reaction) เป็นกระบวนการแรกที่เกิดขึ้นภายหลังได้รับบาดแผล เพื่อป้องกันการสูญเสียเลือดและป้องกันการบุกรุกของเชื้อโรคผ่านบาดแผล (Johansson และ Soderhall,1989) เป็นปริกิริยาการตกตะกอนหรือการจับกลุ่มของเม็ดเลือดและโปรตีนในเลือดเกิดการแข็งตัวตรงบริเวณบาดแผล (ระบิล,2545) การแข็งตัวของเลือดของสัตว์กลุ่มครัสเต-เซียนเป็นการทำงานของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส (transglutaminase,TGase) ที่หลั่งออกมาจากเซลล์เม็ดเลือดมากระตุ้นให้โปรตีน (clotting protein) เกิดกระบวนการโพลีเมอร์ไรเซชั่น (Polymerization) ได้ลักษณะเป็นเจลปิดบาดแผลไว้ ซึ่งกระบวนการแข็งตัวของเลือดนี้ต้องอาศัย

แคลเซียมเป็นโคเอนไซม์ นอกจากนี้ยังพบอีกว่ากระบวนการแข็งตัวของเลือดนี้จะเกิดขึ้นพร้อมกระบวนการสร้างเม็ดสีดำ (melanisation) ซึ่งเกิดขึ้นในระบบโปรฟีนอลออกซิเดส

2.9.1.3.3 การเกิดกลุ่มเซลล์ที่รวมตัวกันรอบสิ่งแปลกปลอมหรือโนดูลฟอร์เมชั่น (nodule formation) กระบวนการสร้างโนดูลเกิดขึ้นเมื่อมีสิ่งแปลกปลอมจำนวนมากเข้าสู่ร่างกาย ในขณะที่ขบวนการกลืนทำลาย (phagocytosis) ไม่สามารถจะกำจัดสิ่งแปลกปลอมนั้นได้หมด เพราะขบวนการฟาโกไซโตซิสจะทำลายเชื้อจุลินทรีย์ที่มีขนาดเล็ก โดยเซลล์เม็ดเลือดเดี่ยวๆ ส่วนการ สร้างโมดูลเกิดขึ้นโดยเซลล์เกิดการรวมตัวกันเป็นกลุ่มก้อนรอบสิ่งแปลกปลอม แล้วเข้าทำลายสิ่งแปลกปลอมไม่ให้กระจายไปทั่วร่างกาย ซึ่งมีประสิทธิภาพในการกำจัดขอบเขตของการแพร่กระจายของเชื้อโรคได้มาก (Smith and Soderhall,1986) และมักพบการสร้างโนดูลบริเวณเหงือกและตับ (hepatopancreas) (Ratcliffe *et al*,1985) พร้อมกับการสร้างเม็ดสีดำ (melanin) ในระบบโปรฟีนอลออกซิเดส (Johansson and Soderhall, 1989) โดยเมื่อเกิดกระบานการสิ่งแปลกปลอมจะติดอยู่ที่บริเวณผิวชั้นต่างๆ ของเม็ดเลือด และเมื่อกระบวนการเกิดเม็ดสีดำ (melanin) ของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในตัวกุ้ง ส่งผลให้แบคทีเรียมีการเคลื่อนที่อย่างรวดเร็วจากระบบหมุนเวียนเลือด และบริเวณที่เกิดการรวมตัวของเม็ดเลือดไปยังบริเวณเหงือก (Gill) หรือตับอ่อน (hepatopancreatic tubules) ซึ่งเป็นบริเวณที่เชื้อโรคเข้าไปอาศัยอยู่ (Smith and Ratcliffe,1980)

2.9.1.3.4 ขบวนการกักล้อม (encapsulation) ขบวนการกักล้อมเกิดขึ้นเมื่อสิ่งแปลกปลอมมีขนาดใหญ่มากกว่า 10 ไมโครเมตร (Lackie,1980) เช่น พยาธิ เชื้อรา และสัตว์เซลล์เดียวขนาดใหญ่ ซึ่งกระบวนการฟาโกไซโตซิสไม่สามารถที่จะยับยั้งได้อย่างมีประสิทธิภาพก็จะเกิดขบวนการกักล้อมขึ้นโดยมีเซลล์เม็ดเลือดหลายชนิดได้แก่ semigranular haemocyte และ large granular haemocyte นอกจากนี้กลไกการกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่ถูกห่อหุ้มจะอาศัยองค์ประกอบในระบบโปรฟีนอลออก-ซิเดส พร้อมกับมีการเกิดเม็ดสีดำ (Ratcliffe และคณะ,1985)

2.9.1.4 ระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด (humoral immunity)

2.9.1.4.1 ระบบโปรฟีนอลออกซิเดส แอคติเวทติง ซิสเตม (Prophenoloxidase activating system) เป็นระบบการทำลายเชื้อโรคและควบคุมการกระจายของเชื้อโรคภายในตัวกุ้ง ซึ่งเป็นระบบภูมิคุ้มกันที่สำคัญโดยมีเอนไซม์โปรฟีนอลออกซิเดส (prophenoloxidase; proPO) เป็นสารเริ่มต้นของระบบที่พบได้ในแกรนูลที่อยู่ในเซลล์เม็ดเลือด (Soderhall and Smith,1986) ระบบ proPO เป็นระบบที่มีความซับซ้อนขององค์ประกอบต่าง ๆ ของเอนไซม์ ซึ่งกระตุ้นให้เกิดการแข็งตัวของเลือด ช่วยในการทำลายสิ่งแปลกปลอมรวมทั้งพวกจุลชีพ โดยทำการเปลี่ยนเอนไซม์เป็นเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสที่สามารถทำปฏิกิริยากับ phenol แล้วให้สารประกอบ quinone ที่

สามารถเปลี่ยนไปเป็นเมลานิน (melanin) ได้ ซึ่งปฏิกิริยาเหล่านี้มีความเกี่ยวข้องกับระบบการป้องกันโรคของสัตว์ในกลุ่มครัสเตเซียน นอกจากนี้เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ยังมีส่วนเกี่ยวข้องกับการรับรู้ถึงสิ่งแปลกปลอมที่จะเข้าสู่ร่างกาย (Soderhall,1982) หน้าที่ของเมลานินจะช่วยในการยับยั้งและป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียโดยการยับยั้งเอนไซม์ proteinase และ chitinase ที่อยู่ภายนอกเซลล์ทำให้เชื้อแบคทีเรียนั้นไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสจะถูกกระตุ้นให้เพิ่มขึ้นได้เมื่อได้รับสาร Lipopolysaccharide หรือ β-1,3-glucan ที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา รวมทั้ง peptidoglycan ที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์จุลชีพ ระบบ proPO ส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นใน vesicle ของเซลล์เม็ดเลือดชนิด semigranular cell และ granular cell ทำให้เกิดการหลั่งสาร proPO ออกมานอกเซลล์ การควบคุมกิจกรรมของระบบ proPO ไม่ให้อยู่ในสภาวะถูกกระตุ้น โดยการมีตัวยับยั้งได้แก่ proteinase inhibitor และ trypsin inhibitor ส่วนตัวยับยั้งที่ได้มีการศึกษาแล้วได้แก่ α_2-macroglubulin สามารถยับยั้งปฏิกิริยาได้เพียงบางส่วน ลักษณะของ α_2-macroglubulin ในสัตว์ไม่มีกระดูกทั้งหมดเป็น dimer ซึ่งต่างจากพวกสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่เป็น tetramer (Smith and Chisholm,1992; Soderhall and Cerenius,1992; Bachere *et al*.,1995; Sritunyalucksana *et al*.,1999)

2.9.1.4.2 แอคกลูตินิน (agglutinin) พบในน้ำเลือดของครัสเตเซียน แอคกลูตินินเป็นสารก่อให้เกิดการจับตัวของสิ่งแปลกปลอม และ agglutinin บางชนิดยังมีหน้าที่เป็น opsonin กระตุ้นกระบวนการฟาโกไซโตซีส ในการป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์ และเลคติน (Lactin) เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่สามารถจับได้อย่างจำเพาะกับสารจำพวกคาร์โบไฮเดรต จัดเป็นแอคกลูตินินชนิดหนึ่ง มีส่วนเกี่ยวข้องกับการจับกันได้ระหว่างเซลล์เม็ดเลือดของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังกับผิวของสิ่งแปลกปลอมมีคุณสมบัติเป็น opsonin (Vargas-Albores,1995; พชรวดี,2549)

2.9.1.4.3 สารคล้ายไซโตไคน์ (Cytokine-like factors) ไซโตไคน์เป็นโปรตีนที่ไม่ใช่แอนติบอดี มีหน้าที่ช่วยรักษาความสมดุลของเลือดในระบบภูมิคุ้มกัน และช่วยในการประสานงานระหว่างระบบภูมิคุ้มกันกับระบบอื่นๆในร่างกาย สารที่แสดงสมบัติคล้ายไซโตไคน์ในกุ้ง ได้แก่ โปรตีนขนาด 76 kDa ซึ่งมีหน้าที่ช่วยกระตุ้นกระบวนการฟาโกไซโตซีส ช่วยในการยึดติดระหว่างเซลล์เม็ดเลือดกับสิ่งแปลกปลอมขณะเกิดการห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอม (smith and Chisholm, 1992) และส่งเสริมการทำงานของระบบโปรฟีนอลออกซิเดส โดยช่วยให้เซลล์เม็ดเลือดชนิด semi-granular และ granular เกิดการ degranulation มากขึ้น ทำให้เอนไซม์ในระบบโปรฟีนอลออกซิ-เดสถูกปล่อยออกมามากขึ้น (Johansson and Soderhall, 1989)

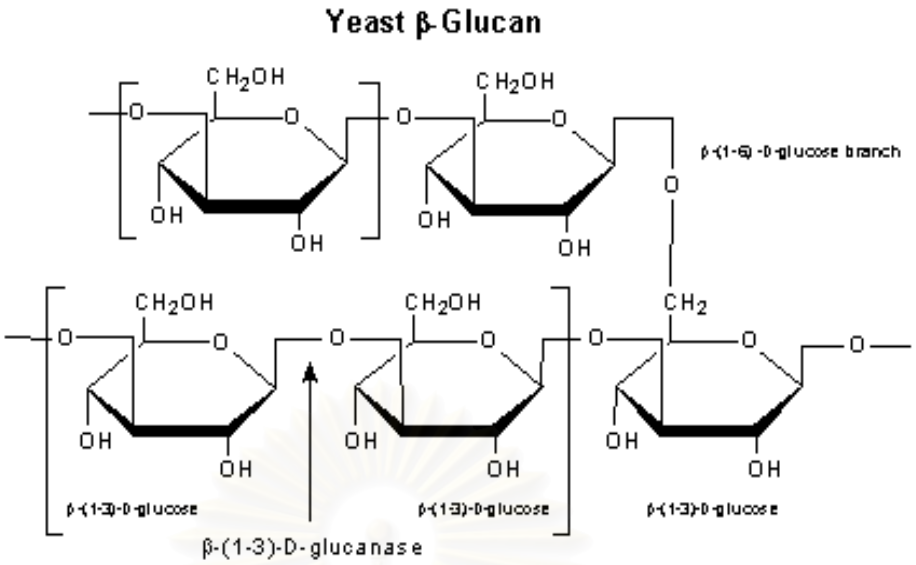
2.9.1.4.4 โมดูเลเตอร์ (modulators) ตัวควบคุมระบบภูมิคุ้มกันให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสมในครัสเตเซียน ได้แก่ ตัวยับยั้งเอนไซม์ย่อยโปรตีน (proteinase inhibitor) และอัลฟาแมคโครโกล- บุลิน (α_2- macroglobulin) มีหน้าที่ยับยั้ง serine protease ในระบบโปรฟีนอลออกซิเดสให้อยู่ในระดับที่สมดุล (Smith and Chisholm, 1992; ชัยชาญ, 2545)

2.9.1.4.5 สารที่เกี่ยวข้องกับการแข็งตัวของเลือด คือ โคแอคกลูโลเจน (coagulogen) เป็นโปรตีนในพลาสมาที่มีบทบาทในการป้องกันการสูญเสียเลือดในกรณีที่ร่างกายเกิดบาดแผล และเมื่อโปรตีนในเลือดแข็งตัว มีผลทำให้ปิดบาดแผลเพื่อป้องกันเชื้อโรคจากภายนอกเข้าสู่ร่างกาย และมิให้องค์ประกอบของเลือดไม่ว่าจะเป็นน้ำเลือด โปรตีน หรือเซลล์เม็ดเลือดต้องสูญเสียไป ซึ่ง coagulogen เทียบได้เท่ากับ fibrinogen ในเลือดของสัตว์ชั้นสูง ทั้งนี้สามารถพบ coagulogen ได้ใน vesicle ของ cytoplasm ในเม็ดเลือดกุ้ง (ระบิล, 2545; พชรวดี, 2549)

2.9.1.4.6 สารออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (bactericidin) เป็นสารต้านแบคทีเรียสามารถถูกชักนำให้สูงขึ้น เมื่อได้รับสารกระตุ้น ไม่ทนความร้อน และมีความจำเพาะต่อเชื้อบางชนิดฤทธิ์ต้านแบคทีเรียสามารถพบได้ทั้งส่วน พลาสมา ซีรั่ม และในสารละลาย HLS (haemocyte lysate supernatant) (ชัยชาญ, 2545)

2.10 สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน

2.10.1บีตากลูแคน (รูปที่2-4) เป็นสารประเภทโพลีแซคคาไรด์ที่ละลายน้ำได้ (กำเนิด, 2534) ซึ่งพบในผนังเซลล์ของรา (Rosenberger, 1976) สาหร่าย (Hamuro, *et.al*., 1981; Reid and Porter, 1981) โครงสร้างของบีตากลูแคนประกอบด้วยส่วนที่เป็นโซ่หลักมีการเรียงตัวต่อกันของกลูโคสที่ตำแหน่ง beta 1-3 และระหว่างโมเลกุลจะเชื่อมกันที่ตำแหน่ง beta 1-6 (Bacon *et al*., 1969) พบว่า บีตากลูแคนในยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* มีองค์ประกอบหลักประมาณ 85 เปอร์เซ็นต์ เป็นกิ่งก้านของบีตากลูแคน ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลสูงมากประมาณ 240,000 และมีส่วนของ bata-(1,6)-glucosidic interchain linkages อยู่ประมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ ส่วนองค์ประกอบรอง คือ กิ่งก้านของ beta-(1,6)-glucan (Kery, *et al*., 1991) Provale™ ซึ่งเป็นบีตากลูแคนที่มีความบริสุทธิ์สูง (มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์) ผลิตจากผนังเซลล์ของยีสต์ *S. cerevisiae* ความเข้มข้นที่เหมาะสมในการใช้ คือ 0.01 เปอร์เซ็นต์

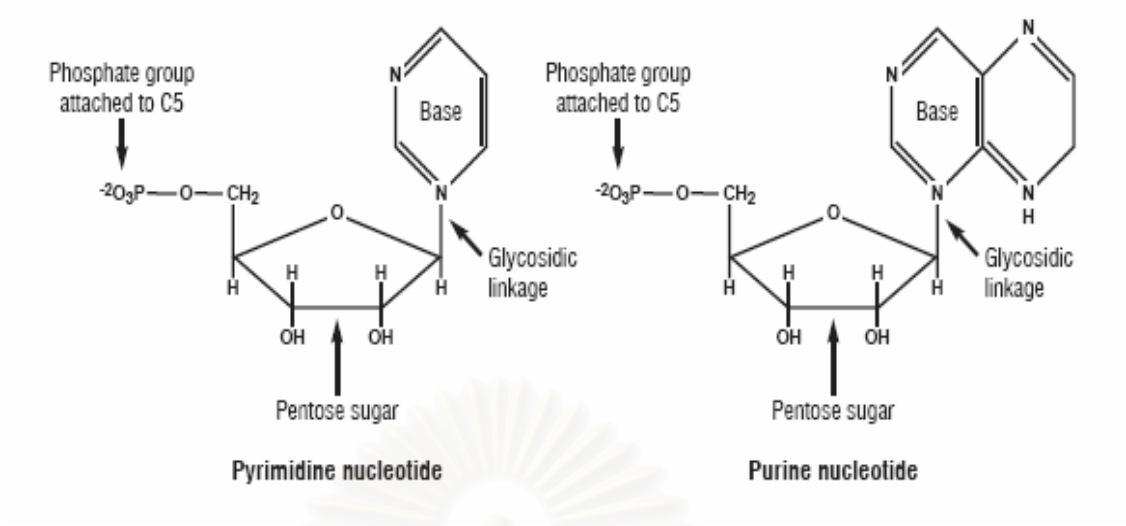


ภาพที่ 2-4 โครงสร้างของบีตากลูแคนในเซลล์ยีสต์

ที่มา www.nutribemmexico.com

2.10.2 นิวคลีโอไทด์ (รูปที่ 2-5) เป็นฟอสโฟริกเอสเตอร์ของนิวคลีโอไซด์ เกิดจากกรดนิวคลีอิกถูกไฮโดรไลด์บางส่วนด้วยเอนไซม์นิวคลีเอส หน้าที่ของนิวคลีโอไทด์ คือ เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก (ดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ) ใช้ในการสังเคราะห์ high energy phosphate เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของโคเอนไซม์ เช่น nicotinamide adenine dinucleotide (NAD), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP), flavin adenine nucleotide (FAD) และโคเอนไซม์เอ ซึ่งทั้งหมดอยู่ในกระบวนการเมทาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน (Mateo, 2005)

Nupro® ซึ่งผลิตจากยีสต์สายพันธุ์ *S. cerecisiae* ในกระบวนการผลิตจะนำเซลล์ยีสต์มา ผ่านกระบวนการแยกผนังเซลล์ออกซึ่งได้ออกมา ในขณะที่สารที่อยู่ภายในเซลล์นำมาผ่านกระบวนการต่อได้เป็นผลิตภัณฑ์ที่ชื่อว่า Nupro® ความเข้มข้นในการใช้คือ 2 เปอร์เซ็นต์ โดยสารประกอบต่าง ๆ ภายใน Nupro® จะประกอบด้วย โปรตีน วิตามิน นิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโนอิสระ Nupro® นับว่าเป็นแหล่งโปรตีนที่ดี มีโปรตีนประมาณร้อยละ 47-50 และมี นิวคลีโอไทด์ประมาณร้อยละ 50 ของน้ำหนักแห้ง ส่วนใหญ่นิวคลีโอไทด์ใน Nupro® สามารถละลายและดูดซึมไปใช้ได้ง่ายกว่าที่อยู่ในรูปนิวคลีโอ-โปรตีน แหล่งของนิวคลีโอไทด์มาจากเซลล์พืชและสัตว์ ซึ่งนิวคลีโอไทด์ส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของ นิวคลีโอโปรตีน แหล่งที่มีนิวคลีโอไทด์สูง เช่น น้ำนึ่งปลา, ปลาป่น ยีสต์สกัด และสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียว เช่น ยีสต์ และแบคทีเรีย ซึ่งจะมีดีเอ็นเอหรือ อาร์เอ็นเอ ในปริมาณสูง (Deversse, 2000)



ภาพที่ 2-5 โครงสร้างโดยทั่วไปของนิวคลีโอไทด์

ที่มา : Mateo and Stein, 2004

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

มลฤดี และคณะ (2543) ได้ทำการสกัดสารบีตากลูแคนจากยีสต์ *S. cerevisiae* ในแต่ละวิธีซึ่งให้ปริมาณสารบีตากลูแคนแตกต่างกัน และนำบีตากลูแคนที่ได้ไปเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 15 กรัม โดยมีอาหาร 4 สูตร ดังนี้ คือ อาหารชุดควบคุม อาหารที่ผสมผนังเซลล์ยีสต์ 8.4 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม อาหารที่ผสมสารบีตากลูแคน ก่อนการทำให้บริสุทธิ์ 1.7 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม และอาหารที่ผสมสารบีตากลูแคนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ 1.0 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม พบว่ากุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมบีตากลูแคน ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ให้ผลการทดลองดีที่สุด โดยให้ค่าปริมาณเม็ดเลือดรวมสูงที่สุด และมีความต้านทานต่อเชื้อ *Vibrio haveyi* โดยคิดเป็นอัตรารอดตายเท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์

Chang *et al*. (2003) ได้ศึกษาผลของบีตากลูแคนต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ โดยศึกษาในกุ้งที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 6.5±0.4 กรัม ให้อาหารผสมบีตากลูแคนที่ระดับ 0, 1, 2, 10 และ 20 กรัม/อาหาร 1กิโลกรัม เป็นเวลา 20 วัน หลังจากนั้นฉีดเชื้อ WSSV(white spot syndrome virus) แล้วทำการตรวจวัด ปริมาณเม็ดเลือดรวม และ แอคทิวิตีของฟีนอลออกซิเดส ในวันที่ 0, 1, 3, 6, 9, 12 และ 24 หลังจากฉีดเชื้อ พบว่า กลุ่มที่ได้รับ บีตากลูแคน 2, 10, 20 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีอัตรารอด 55, 65 และ 65 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ปริมาณเม็ดเลือดรวม และ แอคทิวิตีของฟีนอลออกซิเดส ลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากได้รับเชื้อและหลังจากนั้นก็กลับสู่สภาวะปกติ

Ancieta-Probstl *et al.* (2005) ได้ศึกษาผลของการเสริมนิวคลีโอไทด์ ในกุ้งกุลาดำและกุ้งก้ามกราม พบว่า ปริมาณเม็ดเลือดรวม และ เม็ดเลือดชนิดแกรนูลาร์ มีปริมาณที่เพิ่มขึ้น

Sritunyalucksana *et al.* (2005) ได้ศึกษาผลของนิวคลีโอไทด์ (NuPro ®)ในกุ้ง ที่ความเข้มข้น 2 และ 4 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า มีการเพิ่มขึ้น ของ total hemocyte count ไม่แตกต่างกันที่ความเข้มข้น 2 และ 4 เปอร์เซ็นต์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์ที่สำคัญ

1. เครื่องชั่งน้ำหนัก รุ่น PT 1200 บริษัท Sartorius, Germany
2. Salino-refractometer
3. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ รุ่น 3K18 (Sigma Osterode and Germany)
4. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง
5. เครื่องวัดค่าพีเอช (pH meter) บริษัทOrion, USA
6. เครื่องผสมสาร (Vortex mixter) รุ่น G650E บริษัท Scientific Industries, Inc.,USA
7. หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) รุ่น HA-36 บริษัท Hirayama Manufacturing Corporation, Japan
8. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) รุ่น RO-8 บริษัท Memmert, Western Germany
9. เครื่องเขย่า (Shaker) รุ่น 2100 บริษัท Innova,USA
10. สไลด์นับเม็ดเลือด (Hemacytometer)
11. กล้องจุลทรรศน์ (Microscope) บริษัท Olympus, USA
12. ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar flow) บริษัท Hepaire, England

3.2 สารเคมีที่สำคัญ

1. โซเดียมคลอไรด์ บริษัท Sigma Chemical Co., USA
2. แมกนีเซียมคลอไรด์ บริษัท Sigma Chemical Co., USA
3. แคลเซียมคลอไรด์ บริษัท Sigma Chemical Co., USA
4. โซเดียมคาโคดีเลท บริษัท Sigma Chemical Co., USA
5. L-DOPA (L-dihydroxyphenyl-Alanine) บริษัท Sigma Chemical Co., USA
6. MBTH (3-Methyl-2-Benzothaizolinone Hydrazone) บริษัท Sigma Chemical Co., USA
7. ทริปซิน บริษัท Sigma Chemical Co., USA
8. โปรตีนมาตรฐานจากไข่ขาว (Bovine Serum Albumin) บริษัท Sigma Chemical Co., USA
9. น้ำยาสำเร็จรูปวัดความเข้มข้นโปรตีน บริษัท Bio-Rad, USA
10. กรดเปอร์คลอริก บริษัท Sigma Chemical Co., USA

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulfate citrate bile sucrose agar (TCBS agar) บริษัท HiMedia Laboratories Pvt.Ltd.
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB) บริษัท HiMedia Laboratories Pvt.Ltd.

3.4 การวางแผนการทดลอง

ศึกษาผลของสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อการเติบโต การรอดตาย และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei* ออกแบบการทดลองแบบสุ่มตลอด Completely Randomized Design (CRD) โดยใช้อาหารทดลอง 3 สูตร คือ สูตรมาตรฐาน, สูตรเสริม 0.01% บีตากลูแคน และ สูตรเสริม 2% นิวคลีโอไทด์ เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

3.5 สถานที่ทดลอง

ทำการผลิตอาหาร ณ ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทดลองเลี้ยงและวิเคราะห์อาหาร ณ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.6 อาหารทดลอง

วัตถุดิบและส่วนประกอบที่ใช้ในอาหารทดลอง แสดงในตารางที่ 3.1 การผสมและผลิตอาหารทดลองทำขึ้น ณ ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีอาหารสัตว์น้ำ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อาหารที่ใช้ในการทดลองเป็นอาหารสำเร็จรูปอัดเม็ด (practical diet) ผลิตขึ้นโดยเครื่องอัดเม็ดอาหาร (pelleting machine) จากบริษัท CPM ประเทศสหรัฐอเมริกา อาหารที่ใช้ในการทดลองมี 3 สูตร คือ อาหารสูตรมาตรฐาน, สูตรเสริมบีตากลูแคน ซึ่งบีตากลูแคนที่ใช้มีชื่อทางการค้าว่า ProVale™ ซึ่งเป็นบีตากลูแคนที่มีความบริสุทธิ์สูง ผลิตจากผนังเซลล์ของยีสต์ *S. cerevicea* ความเข้มข้นที่เหมาะสมในการใช้ คือ 0.01 เปอร์เซ็นต์ และ สูตรเสริมนิวคลีโอไทด์ ซึ่งนิวคลีโอไทด์ที่ใช้มีชื่อทางการค้าว่า NuPro® ผลิตจากยีสต์ *S. cereviceae* ที่สกัดเอาผนังเซลล์ออก เป็นสารพวกโปรตีนที่อยู่รูปนิวคลีโอไทด์ มีโครงสร้างเป็นเปปไทด์สายสั้น ทำให้กุ้งสามารถย่อยและดูดซึมไปใช้ได้ง่าย โดยกำหนดระดับโปรตีนในอาหารร้อยละ 40 ระดับไขมันร้อยละ 10 นำวัตถุดิบในการประกอบการทำอาหารกุ้งขาวแวนนาไมมาวิเคราะห์โปรตีนและไขมัน เพื่อนำไปใช้ในการกำหนดส่วนประกอบของสูตรอาหารกุ้งขาวแวนนาไม (ตารางที่ 3.2)

ตารางที่ 3-1 คุณภาพวัตถุดิบที่ใช้ผลิตอาหารทดลอง

วัตถุดิบ/คุณภาพ	ปริมาณโปรตีน (ร้อยละ)	ปริมาณไขมัน (ร้อยละ)	หมายเหตุ
ปลาป่น	60.07	11.21	แหล่งโปรตีน
กากถั่วเหลืองป่น	45.26	-	แหล่งโปรตีน
แป้งสาลี	21.12	-	แหล่งคาร์โบไฮเดรต
กลูเตนจากข้าวสาลี	76.69	-	ช่วยยึดเกาะอาหาร
หัวกุ้งป่น	45.11	-	แหล่งโปรตีน

ที่มา : วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและไขมันด้วยวิธี AOAC (1995)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3-2 ส่วนประกอบของอาหารทดลอง

ส่วนประกอบ (%)	สูตรอาหาร		
	สูตรมาตรฐาน	0.01% บีตากลูแคน	2% นิวคลีโอไทด์
ปลาป่น[1]	40	40	40
น้ำมันทูน่า	6	6	6
กากถั่วเหลืองป่น	17	17	17
หัวกุ้งป่น	4	4	4
Wheat gluten	5	5	5
Wheat flour	20.5	20.5	20.5
Vitamin mix[2]	2	2	2
Mineral mix[3]	2	2	2
Cholesterol	0.5	0.5	0.5
Lecithin	1	1	1
Cellulose	2	1.99	0
บีตากลูแคน[4]	0	0.01	0
นิวคลีโอไทด์[5]	0	0	2
รวม	100	100	100

[1]บริษัท PC ยูเนี่ยน จำกัด (โปรตีนร้อยละ 60.07)

[2]คอมพลีทดีวี บริษัทโคเดล (ประเทศไทย) จำกัด ประกอบด้วย วิตามินเอ 10,000,000 IU วิตามินดี3 1,000,000 IU วิตามินอี1,000 IU วิตามินเค 1,000 มิลลิกรัม วิตามินบี1 500 มิลลิกรัม วิตามินบี2 1,500 มิลลิกรัม วิตามินซี 10,000 มิลลลิกรัม โฟเลท 1,000 มิลลิกรัมและดีเมทไธโอนีน 16,038 มิลลิกรัมในปริมาณ 1 กิโลกรัม

[3]แคลพลัส บริษัทโคเดล (ประเทศไทย) จำกัด ประกอบด้วย แคลเซียม 147 กรัม ฟอสฟอรัส 147 กรัม เหล็ก 2,010 มิลลิกรัม ทองแดง 3,621 มิลลิกรัม สังกะสี 6,424 มิลลิกรัม แมงกานีส 10,062 มิลลิกรัม โคบอลต์ 105 มิลลิกรัม ไอโอดีน 1,000 มิลลิกรัม และซีลีเนียม 60 มิลลิกรัม ในปริมาณ 1 กิโลกรัม

[4]บริษัท Progressive BioActives

[5] บริษัท Alltech (ประเทศไทย)

3.7 การเตรียมและผลิตอาหาร

การผสมและผลิตอาหารทดลองทำขึ้น ณ ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีอาหารสัตว์น้ำ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยนำวัตถุดิบที่เป็นส่วนประกอบของอาหารมาบดให้ละเอียด และร่อนผ่านตะแกรงขนาด 200 ไมครอน ชั่งน้ำหนักวัตถุดิบแต่ละชนิดตามสูตร ผสมส่วนประกอบทั้งหมดให้เข้ากันเป็นเนื้อเดียว ประมาณ 20 นาที นำวัตถุดิบที่ผสมแล้วเข้าเครื่องอัดเม็ดอาหาร ปรับขนาดเม็ดอาหารให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 มิลลิเมตร ยาวประมาณ 3 มิลลิเมตร อาหารที่ได้มีลักษณะเป็นเม็ดกึ่งชื้น หลังจากนั้นนำไปอบไอน้ำที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วคัดขนาดอาหารอัดเม็ดที่ต้องการผ่านตะแกรงคัดขนาด บรรจุอาหารแต่ละขนาดใส่ถุงพลาสติก เก็บไว้ในตู้แช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้

3.8 การเตรียมการทดลอง

3.8.1 การศึกษาการเติบโตและการรอดของกุ้งขาวแวนนาไมเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์

3.8.1.1 สัตว์ทดลอง

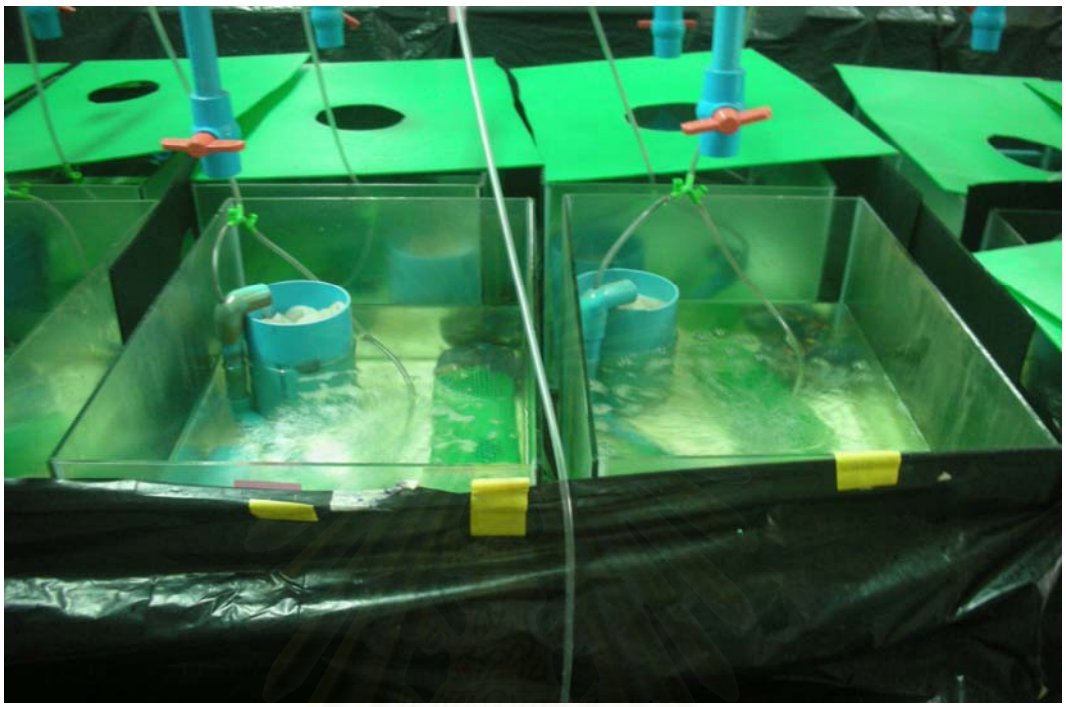
การทดลองนี้ใช้ลูกกุ้งขาวแวนนาไม อายุ 30 วัน จำนวน 300 ตัว จากฟาร์มเอกชนในจังหวัดปทุมธานี โดยนำลูกกุ้งขาวแวนนาไม มาเลี้ยงปรับสภาพในถังไฟเบอร์กลาสขนาดความจุ 1 ลูกบาศก์เมตร โดยให้อาหารสูตรมาตรฐาน (basal diet) วันละ 3 ครั้ง (เวลา 9.00, 13.00 และ 17.00) เป็นเวลา 2 สัปดาห์ (เปลี่ยน ถ่ายน้ำทุกวันๆ ละ 20%) เมื่อปรับสภาพกุ้งแล้วจึงสุ่มคัดขนาดกุ้งที่แข็งแรง สมบูรณ์ลงในหน่วยทดลอง ชั่งน้ำหนัก วัดความยาว และหาน้ำหนักเฉลี่ยเมื่อเริ่มการทดลอง โดยมีน้ำหนักและความยาวเริ่มต้นเฉลี่ย 0.1 กรัมและ 2.1 เซนติเมตร ตามลำดับ

-การทดลอง เริ่มตั้งแต่วันที่ 11 พฤษภาคม 2551 ถึงวันที่ 3 สิงหาคม 2551 รวมทั้งสิ้น 12 สัปดาห์

3.8.1.2ระบบน้ำและวิธีเลี้ยง

3.8.1.2.1 เตรียมตู้ทดลองและน้ำที่ใช้ในการทดลอง โดยใช้ตู้กระจกขนาด 32x52x30 (กว้างxยาวxสูง) เซนติเมตร ที่มีระบบน้ำหมุนเวียนแบบปิด (ภาพที่ 3-1) ใช้ระบบ air lift โดยใช้อากาศดันน้ำเข้าสู่ระบบผ่านตัวกรองชีวภาพที่ประกอบด้วย เปลือกหอยและใยสังเคราะห์ ให้อากาศตลอดเวลา ปริมาณน้ำในการเลี้ยงประมาณ 40 ลิตร เตรียมน้ำที่ใช้ในการเลี้ยงโดยใช้น้ำทะเลความเค็มสูงประมาณ 120-150 ส่วนในพันส่วน (ppt) เจือจางด้วยน้ำประปา ปรับความเค็มให้ได้ระดับความเค็ม 20 ส่วนในพันส่วน อุณหภูมิของน้ำ 26-28 องศาเซลเซียส และฆ่าเชื้อด้วยแคลเซียมไฮเปอร์คลอไรด์ (Calcium

hypochloride) ความเข้มข้น 60 ส่วนในล้านส่วน (ppm) ให้อากาศตลอดเวลา 1 สัปดาห์ เพื่อให้คลอรีนสลายตัว กำจัดตะกอนและสิ่งแขวนลอยต่าง ๆก่อนเริ่มทำการทดลองเลี้ยง



ภาพที่ 3-1 ตู้กระจกขนาด 32x52x30 (กว้างxยาวxสูง) เซนติเมตร ระบบน้ำหมุนเวียนแบบปิด

3.8.1.2.2 สุ่มกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรควบคุม เป็นเวลา 2 สัปดาห์ลงเลี้ยงในตู้กระจกขนาด 32x52x30 (กว้างxยาวxสูง) เซนติเมตร ชั่งน้ำหนักและวัดความยาวของกุ้งแต่ละตัว ตู้ละ 10 ตัว โดยใช้อาหารทดสอบที่แตกต่างกัน 3 สูตร แต่ละสูตรอาหารทำ 6 ซ้ำ สูตรอาหารที่1 คือ อาหารเม็ดสำเร็จรูปสูตรควบคุม (control) สูตรอาหารที่ 2 คือ อาหารเม็ดสำเร็จรูปเสริมบีตากลูแคน 0.01 % สูตรอาหารที่ 3 คือ อาหารเม็ดสำเร็จรูปเสริม 2% นิวคลีโอไทด์ ให้อาหารวันละ 3 ครั้ง (เวลา 9.00, 13.00 และ 17.00) บันทึกปริมาณการให้อาหารทุกๆ สัปดาห์ ให้อากาศอย่างเพียงพอตลอดการทดลอง ดูดตะกอนทุกวัน เปลี่ยนถ่ายน้ำประมาณ 20% วันเว้นวัน ตรวจสอบการเติบโตและการรอดในแต่ละตู้ทุก 4 สัปดาห์ จนครบ 12 สัปดาห์ ระหว่างการเลี้ยงบันทึกผลคุณภาพน้ำ ได้แก่ ปริมาณแอมโมเนีย ไนไตรท์ อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ และความเค็ม ทุก 7 วัน เลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์

3.8.2 การศึกษาการเติบโต การรอด และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในกุ้งขาวแวนนาไม

3.8.2.1 สัตว์ทดลอง

การทดลองนี้ใช้กุ้งขาวแวนนาไมน้ำหนักประมาณ 11-15 กรัม จากฟาร์มเอกชนในจังหวัดปทุมธานี โดยนำลูกกุ้งขาวแวนนาไมเลี้ยงปรับสภาพในถังไฟเบอร์กลาสขนาดความจุ 1 ลูกบาศก์เมตร โดยให้อาหารสูตรมาตรฐาน (basal diet) วันละ 3 ครั้ง (เวลา 9.00, 13.00 และ 17.00) เป็นเวลา 2 สัปดาห์ (เปลี่ยน ถ่ายน้ำทุกวันๆ ละ 20%) เมื่อปรับสภาพกุ้งแล้วจึงสุ่มคัดขนาดกุ้งที่แข็งแรง สมบูรณ์ ลงในหน่วยทดลอง

-การทดลอง เริ่มตั้งแต่วันที่ 26 ธันวาคม 2551 ถึงวันที่ 23 มกราคม 2551 รวมทั้งสิ้น 4 สัปดาห์

3.8.2.2ระบบน้ำและวิธีเลี้ยง

3.8.2.2.1 เตรียมตู้ทดลองและน้ำที่ใช้ในการทดลอง เช่นเดียวกับการศึกษาการเติบโต และการรอดของกุ้งขาวแวนนาไมเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์

3.8.2.2.2 โดยสุ่มกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรควบคุม เป็นเวลา 2 สัปดาห์ลงเลี้ยงในตู้กระจกขนาด 32x52x30 (กว้างxยาวxสูง) เซนติเมตร ชั่งน้ำหนักและวัดความยาวของกุ้งแต่ละตัว ตู้ละ 10 ตัว ชุดการทดลองละ 5 ซ้ำ (5 ตู้) โดยใช้อาหารทดสอบที่แตกต่างกัน 3 สูตร ทำ 3 ชุดการทดลอง คือ ชุดการทดลองที่ 1 คือ อาหารเม็ดสำเร็จรูปสูตรควบคุม (control) ชุดการทดลองที่ 2 คือ อาหารเม็ดสำเร็จรูปเสริมบีตากลูแคน 0.01 % ชุดการทดลองที่ 3 คือ อาหารเม็ดสำเร็จรูปเสริม 2% นิวคลีโอไทด์ ให้อาหารวันละ 3 ครั้ง (เวลา 9.00, 13.00 และ 17.00) บันทึกปริมาณการให้อาหารทุกๆ สัปดาห์ ให้อากาศอย่างเพียงพอตลอดการทดลอง ดูดตะกอนทุกวัน เปลี่ยนถ่ายน้ำประมาณ 50% วันเว้นวัน ตรวจสอบการเติบโตและการรอด เมื่อเลี้ยงครบ 4 สัปดาห์ ระหว่างการเลี้ยงบันทึกผลคุณภาพน้ำ ได้แก่ ปริมาณแอมโมเนีย ไนไตรท์ อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ และ ความเค็ม ทุก 7 วัน เลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

3.8.2.3 การศึกษาระบบภูมิคุ้มกันก่อนการชักนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 1526 ในช่วงการเลี้ยง 28 วัน

สุ่มกุ้ง 6 ตัวจากแต่ละชุดการทดลอง เพื่อนำไปตรวจวิเคราะห์หาปริมาณเม็ดเลือดรวม (total haemocyte count) และวิเคราะห์หาแอคทิวิตีของฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase activity) ทุกสัปดาห์ ตรวจวัดวันที่ 7, 14, 21 และ 28

3.8.2.3.1 การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณเม็ดเลือดรวม โดยเจาะเลือดกุ้งจาก ventral sinus ปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร ด้วยเข็มฉีดยาเบอร์ 27G ผสมกับสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร (อัตราส่วนเลือดกุ้งต่อสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด 1:1) ผสมให้เข้ากันเบา ๆ หยดเลือดปริมาตร 10 µl ลงบนสไลด์ (haemacytometer) นับจำนวนเม็ดเลือดทั้งหมดด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10 เท่า คำนวณปริมาณเม็ดเลือดที่นับได้ มีหน่วยเป็น เซลล์/มิลลิลิตร (ดัดแปลงจาก Voigh, 2000)

3.8.2.3.2 วิเคราะห์หาแอคทิวิตีของฟีนอลออกซิเดส ด้วยวิธี MBTH Assay และวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนรวม (total protein assay) โดยเจาะเลือดกุ้งจาก ventral sinus ปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร ด้วยเข็มฉีดยาเบอร์ 27G ผสมกับสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร (อัตราส่วนเลือดกุ้งต่อสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด 1:1) ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,600g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำตะกอนเซลล์เม็ดเลือดที่ได้มาละลายในสารละลายคาโคดีเลทบัฟเฟอร์ (cacodylate buffer, CAC buffer) pH 7.4 แล้วทำให้เซลล์เม็ดเลือดแตก โดยนำไปแช่แข็งแล้วทำให้ละลายทันทีเป็นจำนวน 1 รอบ จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาหมุนเหวี่ยงที่ 15,900g เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แยกส่วนใสซึ่งเป็น HLS นำมาวิเคราะห์ระดับแอคทิวิตีของฟีนอลออกซิเดสและปริมาณโปรตีนทันที โดยนำ HLS (hemocyte lysate supernatant) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร มาบ่มในสารละลาย CAC buffer 30 ไมโครลิตร ในไมโครไตเตอร์เพลทแบบ 96 หลุม เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลายทริปซิน 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย MBTH (3-Methyl-2-Benzothaizolinone Hydrazone) เข้มข้น 20.7 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 75 ไมโครลิตร สารละลาย CAC buffer ปริมาตร 55 ไมโครลิตร และสารละลาย L-DOPA (L-dihydroxyphenylalanine) เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมกรดเปอร์คลอริกเข้มข้น 2.4% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เพื่อหยุดปฏิกิริยา นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาคำนวณค่าดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงไปต่อนาทีต่อมิลลิกรัมของโปรตีน (ชัยชาญ, 2545)

การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Bradford ปิเปต HLS 160 ไมโครลิตร ลงในไมโครเพลทแบบ 96 หลุม เติมน้ำยาทดสอบโปรตีนสำเร็จรูป (BioRad) ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร ภายใน 1 ชั่วโมง โดยใช้สารละลาย CAC buffer แทน HLS ตามขั้นตอนข้างต้น เป็น blank (Bradford, 1976) และคำนวณโปรตีนเป็น มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เทียบกับเส้นกราฟโปรตีนมาตรฐาน BSA (ภาคผนวก ค)

3.8.2.4 ศึกษาระบบภูมิคุ้มกันหลังการชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 ในกุ้งขาวแวนนาไม หลังจากเลี้ยงครบ 28 วัน

3.8.2.4.1 การเตรียม *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 เตรียม *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปติกซอยที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) บนเครื่องเขย่าที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบ/นาที เวลา 18-24 ชั่วโมง หลังจากนั้นปั่นเหวี่ยงเซลล์ด้วยความเร็ว 8,000 รอบ/นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที เก็บเซลล์สด จากนั้นปรับ *V. harveyi* ให้มีความเข้มข้น10^5 CFU/ml (ความเข้มข้นที่ทำให้กุ้งตายประมาณ 50 % ในเวลา 96 ชั่วโมง) ในน้ำเลี้ยงกุ้ง

3.8.2.4.2 การศึกษาระบบภูมิคุ้มกันหลังการชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 จากชุดการทดลองที่ 2 เมื่อเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม ครบ 28 วัน นำกุ้งที่เหลือจากตู้กระจกมาชักนำให้เกิดโรคด้วยเชื้อ *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 ความเข้มข้นประมาณ 10^5 CFU/ml (ปริมาณที่ทำให้กุ้งตาย 50 เปอร์เซ็นต์ในระยะเวลา 96 ชั่วโมง ในถังขนาด 38 ×45 ×28 (กว้าง×ยาว×สูง)) จากนั้นทำการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณเม็ดเลือดรวม และ วิเคราะห์หาแอคทิวิตีของฟีนอลออกซิเดสทุกวัน เป็นระยะเวลา 4 วัน ตรวจวัดที่ 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับชุดควบคุม

3.8.2.5 การติดตามการตายสะสม (cumulative mortality)

บันทึกผลกุ้งตายจากแต่ละชุดการทดลอง ที่ 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง

3.8.2.6 การทดสอบหลังการชักนำให้เกิดโรค

สุ่มกุ้งตัวอย่างที่ตาย มาทดสอบยืนยันผลว่ากุ้งตายเนื่องจาก *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 โดยการแยกเชื้อจาก เฮปพาโทแพนเครียส (hepatopancreas) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งไทโอซัลเฟตซิเตรท-บายซอลท์ซูโครส บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมงเพื่อเป็นการยืนยันว่ากุ้งตายโดยแบคทีเรียชนิดนี้

3.9 การวิเคราะห์คุณภาพอาหารโดยวิเคราะห์หาค่า Proximate composition

ทำการวิเคราะห์โปรตีน ไขมัน เถ้า ความชื้น และเส้นใย ตามวิธีของ AOAC (1995) ที่แสดงในภาคผนวก ก.

- การวิเคราะห์โปรตีนใช้วิธี semimicro-kjeldahl โดยใช้เครื่อง kjeldahltherm
- การวิเคราะห์ไขมันใช้วิธี Ether Extraction Method โดยใช้เครื่อง Soxtherm
- การวิเคราะห์เถ้าใช้เครื่อง Electic Muffle Furnance
- การวิเคราะห์ความชื้นใช้เครื่อง Hot air oven
- การวิเคราะห์เส้นใยใช้วิธี Acid Alkaline digestion

3.10 การประเมินผล การเลี้ยง และการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกัน

3.10.1 ประเมินผลการเลี้ยง โดยใช้สูตรต่อไปนี้

น้ำหนักเฉลี่ย = ผลบวกของน้ำหนักกุ้งทุกตัว / จำนวนตัว

น้ำหนักที่เพิ่ม (Weight gain) (กรัม/ตัว) = น้ำหนักสุดท้าย (กรัม) – น้ำหนักเริ่มต้น (กรัม)

อัตราการเติบโตสัมพัทธ์ต่อวัน (daily relative growth rate)

$$= \frac{\text{น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (กรัม)}}{\text{น้ำหนักเริ่มต้น (กรัม)} \times \text{จำนวนวันที่เลี้ยง (วัน)}}$$

อัตราการบริโภคอาหารเฉลี่ยต่อกรัมน้ำหนักกุ้งต่อวัน (daily feed intake; เปอร์เซ็นต์)

$$= \frac{\text{อาหารที่ได้รับทั้งหมด (กรัม)} \times 100}{\text{จำนวนวันที่ให้อาหาร (วัน)} \times \frac{\text{น้ำหนักสุดท้าย (กรัม)} + \text{น้ำหนักเริ่มต้น (กรัม)}}{2}}$$

$$\text{ประสิทธิภาพการใช้อาหาร (Feed efficiency)} = \frac{\text{น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (กรัม)}}{\text{อาหารที่ได้รับทั้งหมด(กรัม)}}$$

ผลผลิตกุ้ง = น้ำหนักรวมของกุ้งแต่ละหน่วยการทดลอง (กรัม)

$$\text{อัตราการแลกเนื้อ (Feed Conversion Ratio, FCR)} = \frac{\text{น้ำหนักของอาหารที่ให้}}{\text{น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (กรัม)}} \times 100$$

อัตราการรอด (survival rate %)

$$= \frac{\text{จำนวนกุ้งที่เหลืออยู่ในวันสิ้นสุดการทดลอง}}{\text{จำนวนกุ้งเมื่อเริ่มทดลอง}} \times 100$$

3.10.2 การตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกัน

3.10.2.1 การคำนวณปริมาณเม็ดเลือด (Total hemocytes count)

ปริมาตรของ Hemacytometer = กว้าง × ยาว × ลึก = 1mm × 1mm × 0.1mm = $0.1mm^3$

จำนวนเซลล์เม็ดเลือด/ mm^3 = เซลล์เม็ดเลือดที่นับได้

จำนวนเซลล์เม็ดเลือด/ ml = เซลล์เม็ดเลือดที่นับได้× 10^4× ค่า dilution

3.10.2.2 การคำนวณแอคทิวิตีของฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase activity)

หนึ่งหน่วยของเอนไซม์ = ค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้น 0.001/1 นาที /มิลลิกรัมโปรตีน

3.11 วิเคราะห์คุณภาพน้ำ

ระหว่างการทำการทดลองตรวจสอบคุณภาพน้ำ ดังนี้

- ตรวจสอบความเค็มด้วยเครื่อง Refractometer
- ตรวจสอบปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำและอุณหภูมิด้วย YSI model 57 (ppm หรือ mg/l) ของบริษัท Hanna
- ตรวจสอบความเป็นกรดด่างด้วยเครื่อง pH meter รุ่น HI 8424 microcomputer ของบริษัท Hanna
- ตรวจสอบปริมาณแอมโมเนียและปริมาณไนไตรต์ ด้วยชุดทดสอบ Aqua-VBC

3.12 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

1. วิเคราะห์ความแปรปรวนของบีตากลูแคนและนิวคลีโอไทด์ ต่อการเติบโต การรอดตาย และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในกุ้งขาว การประเมินผลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS ด้วยวิธีวิเคราะห์ Analysis of variance

2. วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 คุณภาพอาหารทดลอง

การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของอาหารทดลองวิเคราะห์โดยใช้วิธี proximate analysis (ตารางที่ 4-1) พบว่าระดับโปรตีนมีค่าใกล้เคียงกับสูตรอาหารที่กำหนด โดยอาหารทดลองมีค่าโปรตีน 38.72-39.02% ไขมัน 9.46-9.54% เส้นใย 2.43-2.57% เถ้า 18.54-18.72% และความชื้น 10.08-10.31% เม็ดอาหารที่ผลิตมีลักษณะเหมาะสมกับนิสัยการกินของกุ้งขาวแวน-นาไม คือ เป็นเม็ดยาว ไม่แตกง่าย และจมน้ำ เนื่องจากกุ้งขาวแวนนาไมมีลักษณะการกินอาหารกลางน้ำและพื้นน้ำ

ตารางที่ 4-1 คุณภาพของอาหารทดลอง 3 สูตร

สารอาหาร (ร้อยละ)	สูตรอาหาร		
	สูตรมาตรฐาน	0.01% บีตากลูแคน	2% นิวคลีโอไทด์
โปรตีน	38.72±0.20	38.72±0.11	39.02±0.22
ไขมัน	9.46±0.04	9.52±0.07	9.54±0.07
เถ้า	18.54±0.23	18.71±0.23	18.72±0.05
เส้นใย	2.57±0.05	2.53±0.07	2.43±0.10
ความชื้น	10.08±0.08	10.18±0.09	10.31±0.21

4.2 การเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมเพื่อศึกษาการเติบโตและการรอด

4.2.1การเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์

ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 4 กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรเสริมบีตากลูแคน มีน้ำหนักเฉลี่ยแตกต่างทางสถิติกับกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรมาตรฐาน แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับอาหารสูตรเสริมนิวคลีโอไทด์ ($P<0.05$) (ตารางที่ 4-2) ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 8 กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรเสริมบีตากลูแคนและนิวคลีโอไทด์มีน้ำหนักเฉลี่ยแตกต่างทางสถิติกับอาหารสูตรมาตรฐาน ($P<0.05$) (ตารางที่ 4-2)

ตารางที่ 4-2 น้ำหนักตัวเฉลี่ย (กรัม/ตัว) ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสูตรต่าง ๆ

สูตรอาหาร	4 สัปดาห์	8 สัปดาห์	12 สัปดาห์
สูตรมาตรฐาน	0.24±0.02[b]	0.34±0.02[b]	0.54±0.03[b]
0.01% บีตากลูแคน	0.28±0.03[a]	0.51±0.02[a]	0.94±0.11[a]
2% นิวคลีโอไทด์	0.26±0.03[ab]	0.49±0.04[a]	0.89±0.10[a]

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวยกซ้ำกัน ในแนวตั้งเดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 95%

น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของกุ้งขาวแวนนาไมต่อตู้ พบว่าในสัปดาห์ที่ 4 กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรเสริมบีตากลูแคน มีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นแตกต่างทางสถิติกับกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรมาตรฐาน แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับอาหารสูตรเสริมนิวคลีโอไทด์ ($P<0.05$) (ตารางที่ 4-3) ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 8 กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรสริมบีตากลูแคน และนิวคลีโอไทด์มีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของกุ้งต่อตู้แตกต่างทางสถิติกับอาหารสูตรมาตรฐาน ($P<0.05$) (ตารางที่ 4-3)

ตารางที่ 4-3 น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (กรัม/ตัว) ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสูตรต่าง ๆ

สูตรอาหาร	0-4 สัปดาห์	5-8 สัปดาห์	9-12 สัปดาห์
สูตรมาตรฐาน	0.14±0.02[b]	0.11±0.03[b]	0.19±0.03[b]
0.01% บีตากลูแคน	0.18±0.03[a]	0.24±0.05[a]	0.43±0.10[a]
2% นิวคลีโอไทด์	0.16±0.03[ab]	0.23±0.03[a]	0.41±0.10[a]

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวยกซ้ำกัน ในแนวตั้งเดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 95%

อัตราการเติบโตสัมพัทธ์ต่อวัน ในสัปดาห์ที่ 4 ของกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรเสริมบีตากลูแคน แตกต่างทางสถิติกับกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรมาตรฐาน แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับอาหารสูตรเสริมนิวคลีโอไทด์ ($P<0.05$) (ตารางที่ 4-4) ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 8 กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรเสริมบีตากลูแคน และนิวคลีโอไทด์ มีอัตราการเติบโตสัมพัทธ์ต่อวันของกุ้งต่อตู้แตกต่างทางสถิติกับอาหารสูตรมาตรฐาน ($P<0.05$) (ตารางที่ 4-5) เมื่อคิดอัตราการเติบโตสัมพัทธ์ต่อวันโดยรวม พบว่า กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรเสริมบีตากลูแคน และนิวคลีโอไทด์มีอัตราการเติบโตสัมพัทธ์ต่อวันตลอดการทดลองของกุ้งต่อตู้แตกต่างทางสถิติกับอาหารสูตรมาตรฐาน ($P<0.05$) (ตารางที่ 4-5)

ตารางที่ 4-4 อัตราการเติบโตสัมพัทธ์ต่อวันของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสูตรต่าง ๆ

สูตรอาหาร	0-4 สัปดาห	5-8 สัปดาห์	9-12 สัปดาห์
สูตรมาตรฐาน	0.0049±0.0008[b]	0.0167±0.0068[b]	0.0201±0.0030[b]
0.01% บีตากลูแคน	0.0063±0.0011[a]	0.0313±0.0097[a]	0.0298±0.0075[a]
2% นิวคลีโอไทด์	0.0057±0.0010[ab]	0.0311±0.0054[a]	0.0301±0.0086[a]

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวยกซ้ำกัน ในแนวตั้งเดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 95%

ตารางที่ 4-5 อัตราการเติบโตสัมพัทธ์ต่อวันของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสูตรต่าง ๆ (ตลอดการทดลอง 12 สัปดาห์)

สูตรอาหาร	อัตราการบริโภคอาหาร
สูตรมาตรฐาน	0.014±0.008[b]
0.01% บีตากลูแคน	0.023±0.014[a]
2% นิวคลีโอไทด์	0.022±0.013[a]

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวยกซ้ำกัน ในแนวตั้งเดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 95%

อัตราการบริโภคอาหาร (%) ต่อวัน พบว่า สัปดาห์ที่ 4 กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารทั้ง 3 สูตร มีอัตราการบริโภคอาหารต่อวันไม่แตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 4-6) สัปดาห์ที่ 8 พบว่า กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรเสริมบีตากลูแคน และนิวคลีโอไทด์มีอัตราการบริโภคอาหารต่อวันที่สูงกว่าอาหารสูตรมาตรฐานอย่างมีสถิติ($P<0.05$) (ตารางที่ 4-6) และสัปดาห์ที่ 12 พบว่า กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารทั้ง 3 สูตร มีอัตราการบริโภคอาหารต่อวันไม่แตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 4-6) และเมื่อคิดอัตราการบริโภคอาหารต่อวันตลอดการทดลองโดยรวม พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างอาหารทั้ง 3 สูตร ($P<0.05$) (ตารางที่ 4-7)

ตารางที่ 4-6 อัตราการบริโภคอาหาร (%) ต่อวันของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสูตรต่าง ๆ

สูตรอาหาร	0-4 สัปดาห์	5-8 สัปดาห์	9-12 สัปดาห์
สูตรมาตรฐาน	4.52±0.35[a]	2.26±0.45[b]	2.66±0.31[a]
0.01% บีตากลูแคน	4.28±0.35[a]	2.93±0.22[a]	2.40±0.30[a]
2% นิวคลีโอไทด์	4.50±0.36[a]	3.06±0.33[a]	2.82±0.52[a]

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวยกซ้ำกัน ในแนวตั้งเดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 95%

ตารางที่ 4-7 อัตราการบริโภคอาหารเฉลี่ย (%) ต่อวันของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสูตรต่าง ๆ (ตลอดการทดลอง 12 สัปดาห์)

สูตรอาหาร	อัตราการบริโภคอาหาร(%)
สูตรมาตรฐาน	3.15±1.07[a]
0.01% บีตากลูแคน	3.20±0.86[a]
2% นิวคลีโอไทด์	3.46±0.86[a]

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวยกซ้ำกัน ในแนวตั้งเดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 95%

ประสิทธิภาพการใช้อาหาร พบว่า สัปดาห์ที่ 4 กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารทั้ง 3 สูตร มีประสิทธิภาพการใช้อาหารไม่แตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 4-8) สัปดาห์ที่ 8 พบว่า อาหารสูตรเสริมบีตากลูแคน และนิวคลีโอไทด์มีประสิทธิภาพการใช้อาหารแตกต่างทางสถิติกับอาหารสูตรมาตรฐาน ($P<0.05$) (ตารางที่ 4-8) และสัปดาห์ที่ 12 พบว่า กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรเสริมบีตากลูแคน มีประสิทธิภาพการใช้อาหารสูงที่สุดแตกต่างทางสถิติกับอาหารทดลองชุดอื่น ๆ ($P<0.05$) (ตารางที่ 4-8) และเมื่อคิดประสิทธิภาพการใช้อาหารโดยรวม พบว่า อาหารสูตรเสริมบีตากลูแคน มีประสิทธิภาพการใช้อาหารสูงที่สุดแตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 4-9) กับกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองชุดอื่น ๆ

ตารางที่ 4-8 ประสิทธิภาพการใช้อาหารของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสูตรต่าง ๆ

สูตรอาหาร	0-4 สัปดาห์	5-8 สัปดาห์	9-12 สัปดาห์
สูตรมาตรฐาน	0.64±0.11[a]	0.60±0.08[b]	0.59±0.07[c]
0.01% บีตากลูแคน	0.79±0.13[a]	0.73±0.10[a]	0.86±0.09[a]
2% นิวคลีโอไทด์	0.71±0.13[a]	0.71±0.07[a]	0.74±0.09[b]

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวยกซ้ำกัน ในแนวตั้งเดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 95%

ตารางที่ 4-9 ประสิทธิภาพการใช้อาหารของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสูตรต่าง ๆ (ตลอดการทดลอง 12 สัปดาห์)

สูตรอาหาร	ประสิทธิภาพการใช้อาหาร
สูตรมาตรฐาน	0.61±0.08[c]
0.01% บีตากลูแคน	0.79±0.10[a]
2% นิวคลีโอไทด์	0.72±0.12[b]

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวยกซ้ำกัน ในแนวตั้งเดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 95%

ผลผลิตรวมของกุ้งขาวแวนนาไม พบว่า หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรเสริมบีตากลูแคน มีผลผลิตรวมสูงที่สุดแตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 4-10) จากกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองชุดอื่น ๆ

ตารางที่ 4-10 ผลผลิตรวมของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสูตรต่าง ๆ (ตลอดการทดลอง 12 สัปดาห์)

สูตรอาหาร	ผลผลิตรวม (กรัม)
สูตรมาตรฐาน	1.43±0.28[c]
0.01% บีตากลูแคน	5.92±1.17[a]
2% นิวคลีโอไทด์	4.38±0.49[b]

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวยกซ้ำกัน ในแนวตั้งเดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 95%

4.2.2 อัตราการแลกเนื้อ

ผลของอัตราการแลกเนื้อ พบว่า จนถึงสัปดาห์ที่ 4 กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารทั้ง 3 สูตร มีอัตราการแลกเนื้อไม่แตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 4-11) ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 5-8 พบว่า กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรเสริมบีตากลูแคน และนิวคลีโอไทด์มีอัตราการแลกเนื้อแตกต่างทางสถิติกับอาหารสูตรมาตรฐาน ($P<0.05$) (ตารางที่ 4-11) และเมื่อคิดอัตราการแลกเนื้อโดยรวม พบว่า กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรเสริมบีตากลูแคน และนิวคลีโอไทด์ มีอัตราการแลกเนื้อแตกต่างทางสถิติกับอาหารสูตรมาตรฐาน ($P<0.05$) (ตารางที่ 4-12)

ตารางที่ 4-11 อัตราการแลกเนื้อของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสูตรต่าง ๆ

สูตรอาหาร	0-4 สัปดาห์	5-8 สัปดาห์	9-12 สัปดาห์
สูตรมาตรฐาน	1.61±0.35[a]	1.75±0.26[b]	1.71±0.19[b]
0.01% บีตากลูแคน	1.31±0.24[a]	1.40±0.18[a]	1.17±0.12[a]
2% นิวคลีโอไทด์	1.45±0.27[a]	1.43±0.14[a]	1.36±0.15[a]

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวยกซ้ำกัน ในแนวตั้งเดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 95%

ตารางที่ 4-12 อัตราการแลกเนื้อของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสูตรต่าง ๆ (ตลอดการทดลอง 12 สัปดาห์)

สูตรอาหาร	อัตราการแลกเนื้อ
สูตรมาตรฐาน	1.69±0.26[b]
0.01% บีตากลูแคน	1.29±0.20[a]
2% นิวคลีโอไทด์	1.41±0.19[a]

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวยกซ้ำกัน ในแนวตั้งเดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 95%

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2.3 การรอด

การรอดของกุ้งขาวแวนนาไม พบว่า ในสัปดาห์ที่ 4 กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองทั้ง 3 สูตร ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) (ตารางที่ 4-13) ในสัปดาห์ที่ 8 พบว่า กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองสูตรผสมบีตากลูแคนและนิวคลีโอไทด์มีการรอดแตกต่างทางสถิติ($P<0.05$) (ตารางที่ 4-13) กับอาหารสูตรมาตรฐาน และใน 4 สัปดาห์สุดท้าย พบว่า สูตรผสมบีตากลูแคนมีการรอดที่ดีสุดแตกต่างทางสถิติกับอาหารทดลองชุดอื่น ๆ ($P<0.05$) (ตารางที่ 4-13)

ตารางที่ 4-13 การรอด (%) ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสูตรต่าง ๆ

สูตรอาหาร	0-4 สัปดาห์	5-8 สัปดาห์	9-12 สัปดาห์
สูตรมาตรฐาน	98.33±4.08[a]	53.33±5.16[a]	26.67±5.16[a]
0.01% บีตากลูแคน	100.00±0.00[a]	86.67±10.33[b]	63.33±12.11[c]
2% นิวคลีโอไทด์	98.33±4.08[a]	81.67±11.69[b]	50.00±8.94[b]

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวยกซ้ำกัน ในแนวตั้งเดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 95%

4.2.4 คุณภาพน้ำ

ข้อมูลคุณภาพน้ำทดลองระหว่างการเลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ อุณหภูมิ 26.3-27.5 องศาเซลเซียส ความเค็ม 20 ส่วนในพันส่วน (ppt) ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ 7.6-8.2 ส่วนในล้านส่วน (ppm) ไนไตรต์ 0-0.1 ส่วนในล้านส่วน (ppm) แอมโมเนีย 0-0.25 ส่วนในล้านส่วน (ppm) อัลคาไลนิตี้ 90-120 ส่วนในล้านส่วน(ppm) (ตารางที่ 4-14) จากการเก็บข้อมูลคุณภาพน้ำตั้งแต่เริ่มต้นการทดลองจนสิ้นสุดการทดลอง พบว่ามีค่าเปลี่ยนแปลงไม่มากนัก เนื่องจากบ่อทดลองมีระบบกรองกายภาพ ช่วยในการบำบัดน้ำทำให้คุณภาพน้ำมีค่าใกล้เคียงกันตลอดการทดลอง บ่อทดลองมีการให้ออกซิเจนตลอดเวลาทำให้มีออกซิเจนมากเพียงพอที่จะทำให้แอมโมเนีย (NH_3) เปลี่ยนเป็นไนไตรต์ (NO^{2-}) และไนเตรท (No^{3-}) ตามลำดับ ซึ่งเมื่อสารอินทรีย์อยู่ในรูปของไนเตรทจะไม่เป็นพิษต่อกุ้ง ขณะที่แอมโมเนียและไนไตรต์จะมีผลต่อการเติบโตของกุ้งทำให้ประสิทธิภาพการใช้อาหารลดลงและมีความเป็นพิษเพิ่มมากขึ้น

ตารางที่ 4-14 คุณภาพน้ำระหว่างการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมด้วยอาหารทดลอง 3 สูตร

สัปดาห์ที่	ความเค็ม (ppt)	ความเป็นกรดเป็นด่าง	อุณหภูมิ (°c)	ออกซิเจนละลายในน้ำ (ppm)	ไนไตรต์ (ppm)	แอมโมเนีย (ppm)	อัลคาไลนิตี้ (ppm)
เริ่มต้น	20	7.89-8.09	26.3-27.1	7.7-7.8	0	0	110-120
2	20	7.83-8.08	26.5-27.2	7.6-7.9	0-0.05	0	110-120
4	20	7.87-8.02	26.8-27.5	7.8-8.0	0-0.05	0-0.25	100-110
6	20	7.98-8.07	26.8-27.3	7.8-8.2	0-0.05	0-0.25	100-110
8	20	7.95-8.05	27.0-27.2	7.9-8.1	0-0.1	0-0.25	90-120
10	20	7.96-8.07	26.6-27.2	7.8-8.0	0.05-0.1	0-0.25	90-110
12	20	7.94-8.03	26.9-27.4	7.7-7.9	0.05-0.1	0-0.25	100-110

4.3 การเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมเพื่อศึกษาการเติบโต การรอด และระบบภูมิคุ้มกันก่อนและหลังการชักนำให้เกิดโรคด้วยเชื้อ *Vibrio harveyi*

4.3.1 การเติบโตและการรอด

หลังจากเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมน้ำหนักตัวเฉลี่ย 11-15 กรัม เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรเสริมบีตากลูแคน และ นิวคลีโอไทด์มีน้ำหนักเฉลี่ยแตกต่างทางสถิติกับอาหารสูตรมาตรฐาน ($P<0.05$) (ตารางที่ 4-15)

ตารางที่ 4-15 น้ำหนักตัวเฉลี่ยของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสูตรต่าง ๆ เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยง 4 สัปดาห์

สูตรอาหาร	น้ำหนักตัวเฉลี่ย
สูตรมาตรฐาน	14.01 ± 0.62^{b}
0.01% บีตากลูแคน	15.14 ± 0.44^{a}
2% นิวคลีโอไทด์	14.66 ± 0.12^{a}

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวยกซ้ำกัน ในแนวตั้งเดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 95%

น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของกุ้งขาวต่อตู้ ที่เลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรเสริมบีตากลูแคน มีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของกุ้งต่อตู้สูงสุดแตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 4-16) เกับอาหารทดลองชุดอื่น ๆ

ตารางที่ 4-16 น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (กรัมต่อตัว) ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสูตรต่าง ๆ เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยง 4 สัปดาห์

สูตรอาหาร	Weight gain
สูตรมาตรฐาน	0.36 ± 0.04^{b}
0.01% บีตากลูแคน	0.74 ± 0.16^{a}
2% นิวคลีโอไทด์	0.42 ± 0.07^{b}

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวยกซ้ำกัน ในแนวตั้งเดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 95%

อัตราการเติบโตสัมพัทธ์ต่อวันของกุ้งขาวแวนนาไม ที่เลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรเสริมบีตากลูแคน มีอัตราการเติบโตสัมพัทธ์ต่อวันสูงสุดแตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 4-17) กับอาหารทดลองชุดอื่น ๆ

ตารางที่ 4-17 อัตราการเติบโตสัมพัทธ์ต่อวันของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสูตรต่าง ๆ เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยง 4 สัปดาห์

สูตรอาหาร	อัตราการเติบโตสัมพัทธ์ต่อวัน
สูตรมาตรฐาน	0.0009 ± 0.0001^{b}
0.01% บีตากลูแคน	0.0018 ± 0.0004^{a}
2% นิวคลีโอไทด์	0.0011 ± 0.0002^{b}

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวยกซ้ำกัน ในแนวตั้งเดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 95%

อัตราการบริโภคอาหาร (%) ต่อวันของกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าในอาหารทดลองทั้ง 3 สูตร ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) (ตารางที่ 4-18)

ตารางที่ 4-18 อัตราการบริโภคอาหาร (%) ต่อวันของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสูตรต่าง ๆ เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยง 4 สัปดาห์

สูตรอาหาร	อัตราการบริโภคอาหาร (%) ต่อวัน
สูตรมาตรฐาน	0.20 ± 0.02^{a}
0.01% บีตากลูแคน	0.21 ± 0.03^{a}
2% นิวคลีโอไทด์	0.18 ± 0.01^{a}

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวยกซ้ำกัน ในแนวตั้งเดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 95%

ประสิทธิภาพการใช้อาหารของกุ้งขาวแวนนาไม ที่เลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรเสริมบีตากลูแคน มีประสิทธิภาพการใช้อาหารสูงสุดแตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 4-19) กับอาหารทดลองชุดอื่น ๆ

ตารางที่ 4-19 ประสิทธิภาพการใช้อาหารของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสูตรต่าง ๆ เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยง 4 สัปดาห์

สูตรอาหาร	ประสิทธิภาพการใช้อาหาร
สูตรมาตรฐาน	0.46 ± 0.05^{c}
0.01% บีตากลูแคน	0.84 ± 0.06^{a}
2% นิวคลีโอไทด์	0.58 ± 0.13^{b}

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวยกซ้ำกัน ในแนวตั้งเดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 95%

ผลผลิตรวมของกุ้งขาวแวนนาไม หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า อาหารสูตรเสริมบีตากลูแคน มีความแตกต่างทางสถิติกับกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรมาตรฐาน ($P<0.05$) (ตารางที่ 4-20) แต่ไม่ความแตกต่างทางสถิติกับกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรเสริมนิวคลีโอไทด์ ($P<0.05$) (ตารางที่ 4-20)

ตารางที่ 4-20 ผลผลิตรวม (กรัม) ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสูตรต่าง ๆ เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยง 4 สัปดาห์

สูตรอาหาร	ผลผลิตรวม(กรัม)
สูตรมาตรฐาน	118.96±20.63[b]
0.01% บีตากลูแคน	151.40±0.44[a]
2% นิวคลีโอไทด์	134.53±11.92[ab]

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวยกซ้ำกัน ในแนวตั้งเดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 95%

อัตราการแลกเนื้อของกุ้งขาวแวนนาไม หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า อาหารสูตรเสริมบีตากลูแคนมีอัตราการแลกเนื้อที่ดีที่สุดแตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 4-21) กับอาหารทดลองชุดอื่น ๆ

ตารางที่ 4-21 อัตราการแลกเนื้อของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสูตรต่าง ๆ เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยง 4 สัปดาห์

สูตรอาหาร	อัตราการแลกเนื้อ
สูตรมาตรฐาน	2.20±0.25[a]
0.01% บีตากลูแคน	1.20±0.09[b]
2% นิวคลีโอไทด์	1.79±0.35[c]

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวยกซ้ำกัน ในแนวตั้งเดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 95%

อัตราการรอดของกุ้งขาวแวนนาไม หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า อาหารสูตรเสริมบีตากลูแคนมีอัตราการรอดแตกต่างทางสถิติกับกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรมาตรฐาน ($P<0.05$) (ตารางที่ 4-22) แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรเสริมนิวคลีโอไทด์

ตารางที่ 4-22 อัตราการรอดของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสูตรต่าง ๆ เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยง 4 สัปดาห์

สูตรอาหาร	อัตราการรอด
สูตรมาตรฐาน	84.67±12.77[b]
0.01% บีตากลูแคน	100.00±0.00[a]
2% นิวคลีโอไทด์	91.78±8.45[ab]

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวยกซ้ำกัน ในแนวตั้งเดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 95%

4.3.2 คุณภาพน้ำ

ข้อมูลคุณภาพน้ำทดลองระหว่างการเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ อุณหภูมิ 26.3-27.1 องศาเซลเซียส ความเค็ม 20 ส่วนในพันส่วน (ppt) ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ 5.6-6.0 ส่วนในล้านส่วน (ppm) ไนไตรต์ 0-0.1 ส่วนในล้านส่วน (ppm) แอมโมเนีย 0-0.25 ส่วนในล้านส่วน (ppm) อัลคาไลนิตี้ 90-120 ส่วนในล้านส่วน(ppm) (ตารางที่ 4-23) จากการเก็บข้อมูลคุณภาพน้ำตั้งแต่เริ่มต้นการทดลองจนสิ้นสุดการทดลอง พบว่ามีค่าเปลี่ยนแปลงไม่มากนัก เนื่องจากบ่อทดลองมีระบบกรองกายภาพ ช่วยในการบำบัดน้ำทำให้คุณภาพน้ำมีค่าใกล้เคียงกันตลอดการทดลอง บ่อทดลองมีการให้ออกซิเจนตลอดเวลาทำให้มีออกซิเจนมากเพียงพอที่จะทำให้แอมโมเนีย (NH_3) เปลี่ยนเป็นไนไตรต์ (NO^{2-}) และไนเตรท (No^{3-}) ตามลำดับ ซึ่งเมื่อสารอินทรีย์อยู่ในรูปของไนเตรทจะไม่เป็นพิษต่อกุ้ง ขณะที่แอมโมเนียและไนไตรต์จะมีผลต่อการเติบโตของกุ้งทำให้ประสิทธิภาพการใช้อาหารลดลงและมีความเป็นพิษเพิ่มมากขึ้น

ตารางที่ 4-23 คุณภาพน้ำระหว่างการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมด้วยอาหารทดลอง 3 สูตร

สัปดาห์ที่	ความเค็ม (ppt)	ความเป็นกรดเป็นด่าง	อุณหภูมิ (^{o}c)	ออกซิเจนละลายในน้ำ (ppm)	ไนไตรต์ (ppm)	แอมโมเนีย (ppm)	อัลคาไลนิตี้ (ppm)
เริ่มต้น	20	7.83-8.02	26.3-26.9	5.7-5.8	0	0	110-120
2	20	7.80-7.95	26.5-27.1	5.6-5.9	0-0.05	0-0.25	100-110
4	20	7.82-7.96	26.6-27.0	5.8-6.0	0-0.1	0-0.25	90-110

4.3.2 ระบบภูมิคุ้มกันก่อนและหลังการชักนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 1526

4.3.2.1 ระบบภูมิคุ้มกันก่อนการชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526

4.3.2.1.1 ปริมาณเม็ดเลือดรวม (total hemocytes)

ปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรเสริมบีตากลูแคนมีปริมาณเม็ดเลือดรวมสูงสุดแตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 4-24) กับกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรอื่น ๆ ในทุกสัปดาห์

ตารางที่ 4-24 ปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสูตรต่าง ๆ

สูตรอาหาร	ปริมาณเม็ดเลือดรวม ($\times 10^6$เซลล์/ มิลลิลิตร)			
	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 3	สัปดาห์ที่ 4
สูตรมาตรฐาน	4.67±2.41[b]	2.35±1.18[b]	2.96±1.57[b]	3.00±1.25[b]
0.01% บีตากลูแคน	15.17±8.39[a]	7.95±3.94[a]	7.83±2.97[a]	9.89±3.48[a]
2% นิวคลีโอไทด์	5.60±2.27[b]	3.88±3.47[b]	4.37±1.16[b]	4.92±1.05[b]

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวยกซ้ำกัน ในแนวตั้งเดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 95%

4.3.2.1.1 แอคทิวิตีของฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase activity)

แอคทิวิตีของฟีนอลออกซิเดส ของกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองทั้ง 3 สูตร ไม่แตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$)ในสัปดาห์ที่ 1 (ตารางที่ 4-25) อย่างไรก็ตามในสัปดาห์ที่ 2 พบว่า กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรเสริมบีตากลูแคนมีแอคทิวิตีของฟีนอลออกซิเดสแตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 4-25) จากกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรมาตรฐาน แต่ไม่แตกต่างทางสติถิกับกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรเสริมนิวคลีโอไทด์ สัปดาห์ที่ 3 พบว่า กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรเสริมบีตากลูแคนและอาหารสูตรเสริมนิวคลีโอไทด์มีแอคทิวิตีของฟีนอลออกซิเดสแตกต่างทางสถิติกับอาหารสูตรมาตรฐาน ($P<0.05$) (ตารางที่ 4-25) สัปดาห์ที่ 4 พบว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรเสริมบีตากลูแคนมีแอคทิวิตีของฟีนอลออกซิเดสที่สูงสุดแตกต่างทางสติถิ ($P<0.05$) (ตารางที่ 4-25)กับอาหารทดลองชุดอื่น ๆ

ตารางที่ 4-25 แอคทิวิตีของฟีนอลออกซิเดส (unit/min/mg protein) ในกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสูตรต่าง ๆ

สูตรอาหาร	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 3	สัปดาห์ที่ 4
สูตรมาตรฐาน	2833.71±534.12[a]	3756.94±1709.53[b]	3346.82±1067.21[b]	3943.54±1179.63[b]
0.01%บีตากลูแคน	6888.79±3916.44[a]	10385.78±3809.36[a]	6898.22±1508.35[a]	7077.01±940.69[a]
2%นิวคลีโอไทด์	5903.22±2273.4[a]	8777.46±4307.39[ab]	5509.62±1023.69[a]	5006.98±941.25[b]

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวยกซ้ำกัน ในแนวตั้งเดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 95%

4.3.2.2 ระบบภูมิคุ้มกันหลังการชักนำให้เกิดโรคด้วยเชื้อ *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526

4.3.2.2.1 ปริมาณเม็ดเลือดรวม (total hemocytes)

หลังการชักนำให้เกิดโรค (challenge test) ด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 พบว่า ในชั่วโมง ที่ 24 กับ ชั่วโมงที่ 72 กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรเสริมบีตากลูแคนมีปริมาณเม็ดเลือดรวมที่สูงสุดและแตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 4-26) กับกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองชุดอื่น ๆ ทั้งนี้ในชั่วโมงที่ 96 พบว่า กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองสูตรเสริมบีตากลูแคนมีปริมาณเม็ดเลือดรวมสูงสุดแตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 4-26) จากกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองชุดอื่น ๆ และกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรเสริมนิวคลีโอไทด์มีปริมาณเม็ดเลือดรวมที่สูงแตกต่างทางสถิต ($P<0.05$) (ตารางที่ 4-26) กับกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรมาตรฐาน

ตารางที่ 4-26 ปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสูตรต่าง ๆ หลังการชักนำให้เกิดโรค

สูตรอาหาร	ปริมาณเม็ดเลือดรวม ($\times 10^6$เซลล์/ มิลลิลิตร) หลังการชักนำให้เกิดโรค			
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง	96 ชั่วโมง
สูตรมาตรฐาน	1.43±0.47[b]	1.04±0.72[b]	1.05±0.21[b]	0.88±0.34[c]
0.01% บีตากลูแคน	5.07±0.91[a]	6.04±1.19[a]	5.91±1.75[a]	6.07±0.92[a]
2% นิวคลีโอไทด์	2.53±0.53[b]	3.95±1.13[b]	2.28±0.51[b]	3.05±0.51[b]

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวยกซ้ำกัน ในแนวตั้งเดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 95%

4.3.2.2.2 แอคทิวิตีของฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase activity)

ในชั่วโมงที่ 24 กุ้งที่เลี้ยงอาหารทดลองทั้ง 3 สูตร มีแอคทิวิตีของฟีนอลออกซิเดสไม่แตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 4-27) ชั่วโมงที่ 48 พบว่า กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรเสริมบีตากลูแคนมีแอคทิวิตีของฟีนอลออกซิเดสแตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 4-27) กับอาหารสูตรมาตรฐาน แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับอาหารสูตรเสริมนิวคลีโอไทด์ ($P<0.05$) (ตารางที่ 4-27) และ ชั่วโมงที่ 72 กับ ชั่วโมงที่ 96 พบว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองสูตรเสริมบีตากลูแคนมีแอคทิวิตีของฟีนอลออกซิเดส สูงสุดแตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 4-27) กับอาหารทดลองชุดอื่น ๆ และอาหารสูตรเสริมนิวคลีโอไทด์มีแอคทิวิตีของฟีนอลออกซิเดสที่สูงแตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 4-27) กับอาหารสูตรมาตรฐาน

ตารางที่ 4-27 แอคทิวิตีของฟีนอลออกซิเดส (unit/min/mg protein) ในกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารสูตรต่าง ๆหลังการชักนำให้เกิดโรค

สูตรอาหาร	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง	96 ชั่วโมง
สูตรมาตรฐาน	2459.66±971.71[a]	1847.61±1250.10[b]	2049.87±491.57[c]	2151.20±250.94[c]
0.01%บีตากลูแคน	5137.10±431.93[a]	5065.80±303.89[a]	5110.52±341.20[a]	5645.61±335.41[a]
2%นิวคลีโอไทด์	3913.00±844.21[a]	4066.41±421.60[ab]	3347.71±334.63[b]	3760.39±542.82[b]

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวยกซ้ำกัน ในแนวตั้งเดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 95%

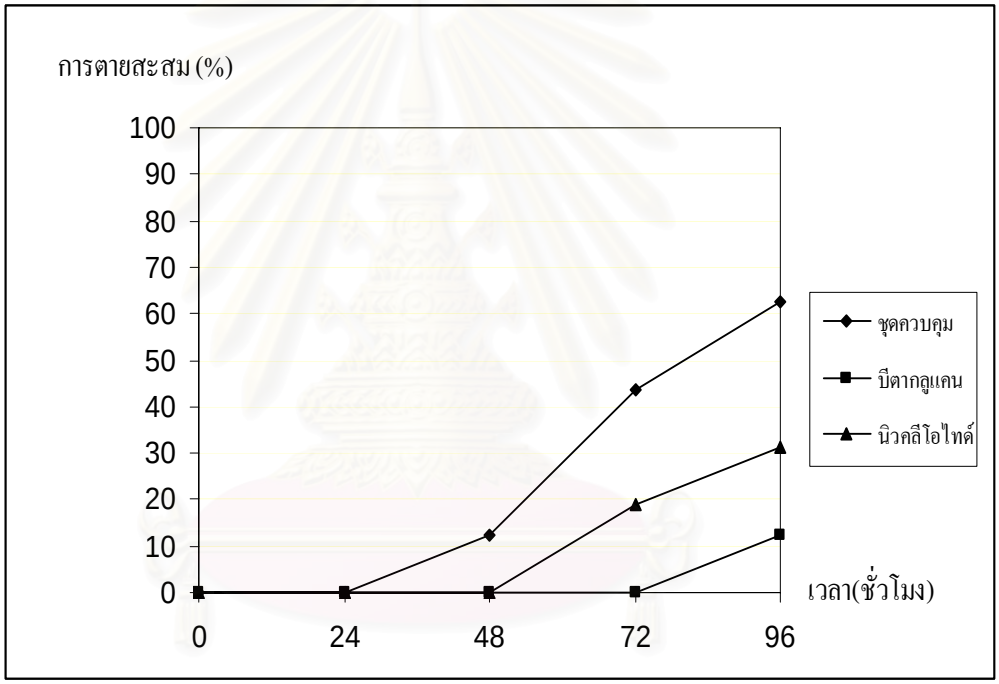
4.3.2.2.3 การตายสะสม (cumulative mortality)

หลังการชักนำให้เกิดโรค (challenge test) ด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 พบว่าในระยะเวลา 96 ชั่วโมง กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรเสริมบีตากลูแคนมีการตายสะสมที่น้อยที่สุดแตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 4-28) กับอาหารทดลองชุดอื่น ๆ และอาหารสูตรเสริมนิวคลีโอไทด์มีการตายสะสมแตกต่างทางสถิติ($P<0.05$) (ตารางที่ 4-28) กับอาหารสูตรมาตรฐาน

ตารางที่ 4-28 การตายสะสม (%) ของกุ้งขาวแวนนาไมหลังการชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 ในระยะเวลา 96 ชั่วโมง

สูตรอาหาร	การตายสะสม (%)
สูตรมาตรฐาน	62.50±0.00[c]
0.01% บีตากลูแคน	12.50±0.00[a]
2% นิวคลีโอไทด์	31.25±8.84[b]

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวยกซ้ำกัน ในแนวตั้งเดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 95%



รูปที่ 4-1 การตายสะสม (cumulative mortality) (%) ของกุ้งขาวแวนนาไมระหว่างการชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 เป็นเวลา 4 วัน (24, 48, 72, 96 ชั่วโมง)

4.3.2.2.4 การทดสอบหลังการชักนำให้เกิดโรค สุ่มกุ้งตัวอย่างที่ตาย มาทดสอบยืนยันผลว่ากุ้งตายเนื่องจาก *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 โดยการแยกเชื้อจาก เฮปพาโทแพนเครียส(hepatopancreas) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งไทโอซัลเฟตซิเตรทบายซอลท์ซูโครส (TCBS) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง พบว่า โคโลนีสีเขียวของ *V. harveyi* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเป็นการยืนยันว่ากุ้งตายด้วยแบคทีเรียชนิดนี้

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

1. การเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมเพื่อศึกษาการเติบโตและการรอด

บีตากลูแคนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จะประกอบด้วยโมเลกุลของน้ำตาลที่มีขนาดเล็ก เช่น กลูโคส ซึ่งจะง่ายต่อการดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือด (Manner *et al*, 1973) ส่วนนิวคลีโอไทด์ เป็นสารพวกโปรตีนซึ่งมีโครงสร้างเป็นเปปไทด์สายสั้น ทำให้กุ้งสามารถย่อยและดูดซึมไปใช้ได้ง่าย (Diehl, 2004)

หลังจากเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมน้ำหนักตัวเฉลี่ยประมาณ 0.1 กรัมในตู้กระจก ขนาด 32× 52×30 (กว้าง×ยาว×สูง) เซนติเมตร ที่มีระบบน้ำหมุนเวียนแบบปิด (Closed recirculating water system) ประกอบด้วยตัวกรองชีวภาพอยู่ในตู้กระจกเลี้ยง แบ่งการทดลองออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม (อาหารสูตรมาตรฐาน) กลุ่มเสริม 0.01%บีตากลูแคน และกลุ่มเสริม 2%นิวคลีโอไทด์ เลี้ยงกุ้งเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรเสริม 0.01% บีตากลูแคน และ 2% นิวคลีโอไทด์ มีน้ำหนักตัวเฉลี่ย น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเติบโตสัมพัทธ์ต่อวัน อัตราการบริโภคอาหารต่อวัน และ อัตราการแลกเนื้อ ไม่แตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$) แต่แตกต่างทางสถิติกับอาหารสูตรมาตรฐาน (ชุดควบคุม) ($P<0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Sung *et al*. (1994) พบว่า กุ้งกุลาดำ ที่แช่ในสารละลายบีตากลูแคนความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถเพิ่มการเติบโตของกุ้งกุลาดำได้ ซึ่งกลไกที่ทำให้กุ้งมีการเติบโตดีอาจเนื่องมาจากกุ้งมีสุขภาพที่แข็งแรงสามารถต้านทานโรคต่าง ๆ ได้ดี ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Lopez *e t al*. (2003) พบว่า กุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงด้วย บีตากลูแคน 2 กรัมต่อกิโลกรัม สามารถเพิ่มการเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไมได้ ส่วน Li *et al*.(2007) พบว่า กุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม 0.04% นิวคลีโอไทด์ สามารถเพิ่มการเติบโตในกุ้ง แต่จากการทดลองนี้ พบว่า อาหารเสริม 0.01% บีตากลูแคน มีอัตราการรอดของกุ้งสูงสุดและแตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารชุดอื่น ๆ และยังส่งผลให้ปริมาณน้ำหนักรวม (ผลผลิตรวม) ของกุ้งทั้งหมดที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมบีตากลูแคนมีน้ำหนักสูงสุด และมีผลแตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$) จากกลุ่มทดลองอื่น ๆ

หลังจากเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมน้ำหนักตัวเฉลี่ย 11-15 กรัม เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในตู้กระจกขนาดเดิม ซึ่งระบบการเลี้ยงเช่นเดียวกับการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมขนาด 0.1 กรัม พบว่า กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริม 0.01% บีตากลูแคน มีน้ำหนักตัวเฉลี่ยไม่แตกต่างทางสถิติกับอาหารเสริม 2% นิวคลีโอไทด์ ($P<0.05$) แต่แตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) กับอาหารสูตรมาตรฐาน แต่น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น อัตราการเติบโตสัมพัทธ์มีความแตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$) กับอาหารทดลองสูตรอื่น ๆ และเมื่อเปรียบเทียบอัตราการบริโภคอาหาร (%) ต่อวัน พบว่า อาหารทดลองทั้ง 3 สูตร ไม่มีความ

แตกต่างทางสถิติ แต่ พบว่า อาหารเสริม 0.01 % บีตากลูแคน มีประสิทธิภาพการใช้อาหารและอัตราการแลกเนื้อ แตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$) กับอาหารทดลองสูตรอื่น ๆ และเมื่อเปรียบเทียบผลิตผลรวมของกุ้งขาวแวนนาไม พบว่า กุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริม 0.01% บีตากลูแคน มีผลผลิตรวมสูงที่สุด แตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$) กับอาหารสูตรมาตรฐาน แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับอาหารเสริม 2% นิวคลีโอไทด์ แต่มีแนวโน้มที่สูงกว่า ซึ่งพบว่ามีการรอด 100 % และพบว่า ผลการเลี้ยงกุ้งเริ่มต้นขนาดเล็กระยะ post-larvae มีผลแตกต่างกับกุ้งโตน้ำหนักประมาณ 11-15 กรัม อาจเนื่องจาก ช่วงวัย และขนาดของกุ้งรับอาหารได้ไม่เหมือนกัน

2. ระบบภูมิคุ้มกันก่อนการชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526

ปัจจุบันได้มีการศึกษากลุ่มของสารที่เกี่ยวข้องในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดยพบว่า บีตากลูแคนและนิวคลีโอไทด์สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของกุ้งได้ Chang *et al*. (2003) ได้พบว่า บีตากลูแคนสามารถต้านทานต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ และมีอัตราการรอดที่แตกต่างจากอาหารชุดควบคุม ($P<0.05$) และในปี 2005 Ancieta-Probstl *et a*l. ได้ศึกษาผลของอาหารผสมนิวคลีโอไทด์ในกุ้งกุลาดำ พบว่า แอคทิวิตีของฟีนอลออกซิเดส และปริมาณเม็ดเลือดรวมที่สูงขึ้น

จากการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมน้ำหนักประมาณ 11-15 กรัม พบว่า ปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริม 0.01% บีตากลูแคนมีความแตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$) กับอาหารทดลองสูตรอื่น ๆ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Smith and Soderhall (1983) ที่รายงานว่า ปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งน้ำจืด *Astacus astacus* จะเพิ่มสูงขึ้นหลังจากที่ฉีดบีตากลูแคน 0.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยมีจำนวนเม็ดเลือดรวม เท่ากับ 1.03×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เช่นเดียวกับ กิจการและคณะ (2543ก) ทดลองเลี้ยงกุ้งกุลาดำด้วยอาหารผสมบีตากลูแคนซึ่งสกัดได้จากยีสต์ *S .cerevisiae* เป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่า อาหารผสมบีตากลูแคน 1 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีผลช่วยเสริมให้ปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งสูงขึ้น การที่กุ้งมีปริมาณเม็ดเลือดสูงจะส่งผลให้กุ้งสามารถจะกำจัดเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ตัวกุ้งได้อย่างเพียงพอ และมีประสิทธิภาพโดยอาศัยเซลล์เม็ดเลือด (hemocytes) ซึ่งจะทำหน้าที่กำจัดเซลล์สิ่งแปลกปลอมออกจากร่างกาย โดยอาศัยกระบวนการกลืนทำลาย กระบวนการกักล้อม และระบบโปรพีโอในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมซึ่งเข้าสู่ร่างกายของกุ้ง (Smith and Ratcliffe, 1980) ส่วนอาหารเสริม 2% นิวคลีโอไทด์ พบว่า มีปริมาณเม็ดเลือดรวมไม่แตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$) กับอาหารสูตรมาตรฐานแต่มีแนวโน้มที่สูงกว่า สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ancieta-Probstl *et al*. (2005) พบว่าอาหารเสริมนิวคลีโอไทด์ในกุ้งกุลาดำและกุ้งก้ามกราม มีปริมาณเม็ดเลือดรวมมีปริมาณที่เพิ่มขึ้น

แอคทิวิตีของฟีนอลออกซิเดส พบว่า กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริม 0.01% บีตากลูแคน มีแอคทิวิตีของฟีนอลออกซิเดสที่สูงสุด แตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$) กับอาหารทดลองสูตรอื่น ๆ สอดคล้องกับงานวิจัย พรเลิศ และคณะ (2541) พบว่า ให้อาหารผสมบีตากลูแคนที่ระดับ 10 กรัมต่อ

อาหาร 1 กิโลกรัม มีผลช่วยเสริมให้แอคทิวิตีของฟีนอลออกซิเดสมีแอคทิวิตีที่สูงขึ้นแตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารสูตรมาตรฐาน ส่วนอาหารเสริม 2 % นิวคลีโอไทด์ พบว่าแอคทิวิตีของฟีนอลออกซิเดสไม่แตกต่างทางสถิติ($P<0.05$) กับอาหารทดลองสูตรมาตรฐาน แต่มีแนวโน้มที่สูงกว่า สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ancieta-Probstl *et al.* (2005) ได้ศึกษาผลของอาหารผสมนิวคลีโอไทด์ในกุ้งกุลาดำกับกุ้งก้ามกราม พบว่า สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้ง โดยมีแอคทิวิตีของฟีนอลออกซิเดสที่สูงขึ้น

2. ระบบภูมิคุ้มกันหลังการชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526

หลังจากเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมน้ำหนักประมาณ 11-15 กรัม เป็นเวลา 4 สัปดาห์ แล้วชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 พบว่า กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริม 0.01% บีตากลูแคนมีปริมาณเม็ดเลือดรวม และแอคทิวิตีของฟีนอลออกซิเดสที่สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารทดลองสูตรอื่น ๆ และอาหารเสริม 2 %นิวคลีโอไทด์ มีปริมาณเม็ดเลือดรวมและแอคทิวิตีของฟีนอลออกซิเดสแตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$) กับอาหารสูตรมาตรฐาน และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณเม็ดเลือดรวม และแอคทิวิตีของฟีนอลออกซิเดสของกุ้งก่อนและหลังการชักนำให้เกิดโรค พบว่า ก่อนการชักนำให้เกิดโรคมีปริมาณที่สูงกว่าหลังชักนำให้เกิดโรค และพบว่า ปริมาณเม็ดเลือดรวมและแอคทิวิตีของฟีนอลออกซิเดสของกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริม 0.01% บีตากลูแคนมีปริมาณที่สูงที่สุดแตกต่างทางสถิติ($P<0.05$) กับอาหารทดลองสูตรอื่น ๆ ซึ่ง Lee *et al.*(1995) พบว่า แบคทีเรีย *V. harveyi* สามารถผลิตสารย่อยสลายเม็ดเลือด hemolysin ทำให้ปริมาณเม็ดเลือดลดลงและเป็นไปได้ว่า เมื่อกุ้งได้รับสิ่งแปลกปลอมเข้าไปในร่างกาย ทำให้เซลล์เม็ดเลือดในระบบไหลเวียนของร่างกายลดลงเนื่องจากเซลล์เม็ดเลือดจะเข้ามาล้อมจับสิ่งแปลกปลอม สอดคล้องกับงานวิจัย Smith and Soderhall (1983) รายงานว่า กุ้งน้ำจืด *Astacus astacus* และ ปู *Carninus maenas* มีจำนวนเม็ดเลือดรวมลดลง เมื่อฉีดสิ่งแปลกปลอมเข้าไปในตัวสัตว์ และ กิจการและคณะ (2543ข) ทดลองฉีดเซลล์ยีสต์เข้าไปในเซลล์กุ้งเพื่อศึกษาการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ตัวกุ้ง พบว่า หลังจากฉีดยีสต์เข้าไป พบว่า ปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งลดลง ผลทั้งหมดแสดงถึงการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อสิ่งแปลกกลอมในตัวกุ้งและสอดคล้องกับการทดลองของ Chang *et al.* (2003) ได้ศึกษาผลของบีตากลูแคนต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ โดยให้อาหารที่ระดับ 0, 1, 2, 10 และ 20 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 20 วัน หลังจากนั้นฉีดเชื้อ ไวรัส WSSV พบว่า ปริมาณเม็ดเลือดรวมและแอคทิวิตีของฟีนอลออกซิเดสลดลงหลังจากได้รับเชื้อ

อัตราการรอดของกุ้งขาวแวนนาไมหลังการชักนำให้เกิดโรค ด้วยเชื้อ *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 ที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริม 0.01% บีตากลูแคน มีอัตราการรอดที่สูงที่สุด คือ 87.50% สอดคล้องกับงานวิจัยของ Chang *et al.* (2003) พบว่ากุ้งกุลาดำที่ให้อาหารผสมบีตากลูแคน 2, 10 และ 20 กรัม

ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีอัตราการรอดที่สูงกว่าอาหารสูตรมาตรฐาน($P<0.05$) กิจการ และคณะ (2543ก) พบว่า กุ้งกุลาดำที่ให้อาหารผสมบีตากลูแคน 1 กรัม/อาหาร1 กิโลกรัมหลังจากการชักนำให้เกิดโรคด้วยเชื้อ *V. harveyi* พบว่า มีอัตราการรอด 81% Sung *et al*.(1994) ซึ่งพบว่า กุ้งกุลาดำที่แช่ในสารละลายบีตากลูแคนเข้มข้น 0.5 และ 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร แล้วนำมาแช่ในสารละลายเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* ความเข้มข้น 5×10^7 CFU/ml นาน 12 ชั่วโมง จะต้านทานเชื้อได้นาน 18 วัน และ Itami *et al*.(1994) รายงานว่ากิจกรรมของเม็ดเลือดในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมของกุ้ง *Penaeus japonicus* ที่ได้รับอาหารผสมบีตากลูแคน 0.01% บีตากลูแคนเป็นเวลา 3 วัน หรือระดับ 0.005% นาน 10 วัน มีค่าสูงขึ้น และมีความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อโรคได้สูงกว่ากุ้งในกลุ่มควบคุม

ส่วน อาหารสูตรเสริม 2% นิวคลีโอไทด์ และอาหารสูตรมาตรฐาน มีอัตราการรอด 68.75% และ37.5% ตามลำดับ Stein and Mateo (2005) กล่าวว่า อาหารเสริมนิวคลีโอไทด์สามารถช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันโดยเซลล์ (cellular defenses) และระบบภูมิคุ้มกันโดยสารน้ำ (humoral defenses)

การศึกษาครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่า อาหารเสริม 0.01% บีตากลูแคนมีประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันดีที่สุดซึ่งสอดคล้องกับผลของปริมาณเม็ดเลือดรวม แอคทิวิตีของฟีนอลออกซิเดส และอัตราการรอดที่ดีที่สุด เนื่องจากเม็ดเลือดเป็นศูนย์กลางในการตอบสนองภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงของกุ้ง โดยอาศัยการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดและสารน้ำในน้ำเลือดในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายด้วยกระบวนการต่าง ๆ เช่น แอคทิวิตีของฟีนอลออกซิเดส ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย กระบวนการกลืนทำลาย การสร้างโนดูล การห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอม และ การแข็งตัวของเลือด เป็นต้น ดังนั้นหากพบว่า ปริมาณเม็ดเลือดยิ่งมากนั้น หมายถึง ประสิทธิภาพการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันก็จะสูงขึ้น ร่างกายก็จะสามารถต่อต้านสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อโรคที่จะเข้าสู่ร่างกายได้มีประสิทธิภาพด้วย (กิจการ และคณะ, 2543ค; Matin and Graves, 1985) ดังนั้นจึงเห็นได้ว่าปริมาณเม็ดเลือดรวมมีความสัมพันธ์กับปริมาณแอคทิวิตีของฟีนอลออกซิเดส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 6

ข้อเสนอแนะ

1. การทดลองครั้งนี้ทำการทดลองโดยกุ้งขาวแวนนาไมในตู้กระจกขนาด 32x52x30 เซนติเมตร เมื่อเปรียบเทียบกับสถานที่เลี้ยงกุ้งเพื่อการค้าจะเป็นบ่อดินขนาดใหญ่ เนื่องจากในสภาพการเลี้ยงจริงมีปัจจัยแวดล้อมบางประการที่ส่งผลต่อระบบภูมิคุ้มกันที่ผู้เลี้ยงไม่สามารถควบคุมได้เหมือนในการทดลอง และการเติบโตของกุ้งมีความแตกต่างกัน โดยกุ้งที่เลี้ยงในบ่อดินจะมีอัตราการเจริญเติบโตดีกว่าที่เลี้ยงในตู้กระจก ดังนั้น ควรทดลองเลี้ยงกุ้งขาวในบ่อดินเพื่อประโยชน์ในการอบรมผู้เลี้ยงต่อไป

2. ควรทำการศึกษาเปรียบเทียบผลของสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ต่อการตอบสนองโดยเซลล์และโดยสารน้ำชนิดอื่น เช่น bactericidin phagocytosis เป็นต้น รวมทั้งการต้านทานโรคติดเชื้อต่าง ๆ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กิจการ ศุภมาตย์, จูอะดี พงศ์มณีรัตน์ และ ธนาวุฒิ กล่อมเกลี้ยง. 2543ก. สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันและการใช้วัคซีนในกุ้งกุลาดำ: III ผลของบีตากลูแคน (MacroGard) ต่อการเจริญเติบโต ภูมิคุ้มกัน และความต้านทานโรคในกุ้งกุลาดำ. วารสารสงขลานครินทร์. ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22 (ฉบับพิเศษ): 678-687.

กิจการ ศุภมาตย์, วุฒิพร พรหมขุนทอง, ชุติมา ตันติกิตติ และ Rudolf Hoffmann. 2543ข. ภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ: II เซลล์และเนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมในกุ้งกุลาดำ. วารสารสงขลานครินทร์. ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22 (ฉบับพิเศษ): 581-588.

กำเนิด สุกัณวงษ์. 2534. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.

ชลอ ลิ้มสุวรรณ และ พรเลิศ จันทร์รัชชกูล. 2547. อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.

ชัยชาญ ไตรศรีศิลป์. 2545. ฟีนอลออกซิเดสที่เกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon*. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ธนพงศ์ แสงซื่อ. 2546. พื้นฐานทั่วไปของกุ้งขาวแวนนาไม. กุ้งขาวอินเทคค์. กรุงเทพมหานคร: อินเทคค์และแลบอินเตอร์.

นิพนธ์ เหมาะประสิทธิ์. 2522. ผลของอาหารผสมซึ่งมีระดับโปรตีนต่าง ๆ ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ. ใน รายงานประจำปีหน่วยอาหารกุ้งและปลา, หน้า 86. กรุงเทพมหานคร: กองประมงน้ำกร่อย. กรมประมง.

ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์. 2546ก. ศาสตร์ของกุ้งขาว ลิโทพีเนียส แวนนาไม. สัตว์น้ำ. 14(162): 119-122.

เปี่ยมศักดิ์ มานะเศวต. 2525. แหล่งน้ำกับปัญหามลภาวะ. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พรเลิศ จันทร์รัชชกูล, นภดล ศุกระกาญจน์ และพัฒนพงศ์ ยั่งยืน. 2541. ผลของ β-1,3-glucan ต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (immune response) ของกุ้งกุลาดำ. ใน รายงานการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 36, หน้า 43-52. กรุงเทพมหานคร: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ภิญโญ เกียรติภิญโญ. 2545. วิธีปฏิบัติสำหรับการเลี้ยงกุ้งขาว แอล. แวนาไม (Practical Technology for *Litopenaeus vannamei* Culture). สมุทรปราการ: สำนักพิมพ์เมืองเกษตร แม็กกาซีน.

มลฤดี สิทธิพันธ์, อรัญ หันพงศ์กิตติกูล และกิจการ ศุภมาตย์. 2543. สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันและการใช้วัคซีนในกุ้งกุลาดำ: I. การสกัดสารบีตากลูแคนจากยีสต์และการประยุกต์ใช้ในกุ้งกุลาดำ. วารสารสงขลานครินทร์. ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22 (ฉบับพิเศษ): 653-662.

ไมตรี ดวงสวัสดิ์ และจารุวรรณ สมศิริ. 2528. คุณสมบัติของน้ำและวิธีวิเคราะห์สำหรับการวิจัยทางการประมง. กรุงเทพมหานคร: กรมประมง.

ยนต์ มุสิก. 2531. กำลังผลิตทางชีวภาพในบ่อปลา 2. กรุงเทพมหานคร: คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พชรวดี เลาหะมงคลรักษ์. 2549. การใช้วิตามินซีเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius). วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ฤทัย สกุลแรมรุ่ง. 2539. วิทยาภูมิคุ้มกัน. กรุงเทพมหานคร: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ระบิล รัตนพานี. 2545. ระบบการป้องกันและภูมิคุ้มกันโรคในกุ้ง. เพื่อนชาวกุ้ง 3(32): 40-48.

รวมความรู้การเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม. 2549. นิตยสารสัตว์น้ำไทย 10: 3-27.

วัชริยา ภูริวิโรจน์กุล. 2547. ระบบภูมิคุ้มกันโรคของกุ้ง. ใน การฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่อง การวินิจฉัยและการป้องกันโรคสัตว์น้ำ, หน้า 46-64. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วัชริยา ภูริวิโรจน์กุล. 2549. การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* Fabricius. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วัลลภ คงเพิ่มพูล. 2534. กุ้งกุลาดำ. กรุงเทพมหานคร: โครงการหนังสือเกสรชุมชน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วรวิทย์ ชีวาพร. 2531. คุณภาพน้ำ-ดินในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. ใน การเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ, หน้า 171-182. ชลบุรี: คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทร์วิโรฒ.

สิริ ทุกข์วินาศ. 2528. วิธีวิเคราะห์น้ำเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง. เอกสารเผยแพร่ฉบับที่ 4/2528. สงขลา: สถาบันเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง จังหวัดสงขลา กรมประมง.

สุธี เกื้อเกตุ. 2543. การสะสมและการกระจายของไอออนจากน้ำทะเลในแหล่งเลี้ยงกุ้งกุลาดำเขตน้ำจืด: กรณีศึกษาที่อำเภอบ้านสร้าง จังหวัดปราจีนบุรี. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุทธิพันธ์ สาระสมบัติ, วิบูลศรี พิมลพันธุ์, นภาพร บานชื่น, ทัศนีย์ สุโกศล, ธารารัชต์ ธารากุล, ศันสนีย์ เสนะวงศ์ และ สิริฤกษ์ ทรงศิวิไล. 2542. อิมมูโนวิทยา. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์พีพีเอสไซเอนซ์เทคนิคอล.

ศิริเพ็ญ ตรัยไชยาพร. 2543. การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ. เชียงใหม่: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ภาษาอังกฤษ

Ancieta-Probstl, D.K., Barnes, A.C. and Smullen, R. 2005. Enhancing growth performance of shrimp with nucleotide-supplemented diets. Aquaculture Asia-Pacific 1(4): 29-32.

Association of Official Analytical Chemists. 1990. Official Methods Analysis. 14th ed. Washington D.C.: Association of Official Analytical Chemists.

APHA, AWwA and AWCA. 1989. Standard Methods for the Examination Water and Wastewater. 17th ed. Washington. D.C.: Amerrican Public Health Association.

Aquacop. 1979. Penaeid reared brood stock: closing cycle of *P. monodon*, *P. stylirostris* and *P. vannamei*. Proc. World. Maricult. Soc. 10: 445-452.

Arrignon, J.V.C., Huner, J.V., Laurent, P.J., Griessinger J.M., Lacroix D., Gonduin, P. and Autrand, M. 1994. Warm-Water Crustaceans. London and Basingstoke: The Macmillan press Ltd.

Bachere, E., Mialhe, E. and Rodriguez. 1995. Identification of defence effectors in the haemolymph of Crustraceans with particular reference to the shrimp *Penaeus japonicus* (Bate): Prospects and applications. Fish & Shellfish Immunol. 5: 597-612.

Bacon, J.S.D., Farmer, V.C., Jones, D. and Taylor, I.F. 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. Crustaceaus. In N.A. Ratcliffe and F.F Rowley(eds.), Invertebrate blood cells Vol. 2 ed, pp. 385-420. London : Academic Press.

Boddeke, R. 1983. Survival strategies of penaeid shrimps and their significance for shrimp culture. In Proceedings of the first International Conference on Warmwater Aquaculture, February 1983, pp. 514-523. Hawai .

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

Boyd, C.E. 1989. Water Quality Management and Aeration in Shrimp Farming. Fisheries and Allled Aquacultures Departmental Series No.2. Alabama: Auburn University.

Boyd, C.E. and Fast, A.W. 1992. Pond monitoring and management. In A.W. Fast and L.J. Lester (eds.), Marine Shrimp Culture: Principles and Practices, pp. 497-513. Netherlands : Elsevier Science.

Brock, J.A. and Main, K. 1994. A Guide to the Common Problems and Diseases of Cultured *Penaeus vannamei*. Publ. USA: By the Oceanic Institute Makapu point.

Brown, A., Patlan J. and Patlan. D. 1974. Color changes in the ovaries of penaeid shrimp as a Determinant of their maturity. Mar. Fish. Rev. 36: 23-26.

Buchanan, R.E. and Gibbons. 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8 th ed., The Williams and Wilkins Co., Baltimore. 1,268 p.

Chang, C.F., Su, M.S., Chen, H.Y. and Liao, I.C. 2003. Dietary β-1,3-glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenge with white spot syndrome virus**.** Fish Shellfish Immunol**.** 15 : 297-310.

Ceballos-Vazquez, B.P., Rosas, C. and Racotta, I.S. 2003. Sperm quality in relation to age and weight of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture. 228: 141-151.

Conte, F.P. 1969. Salt secretion pp. 241-292. In W.S. Hoar and Randal (eds.). Fish Physiol. Vol.1. New York : Academic Press.

Devresse, B. 2000. Nucleotides : a key nutrient for the immune system of shrimp? Feed. Mix. 8 (3):20-22.

Diehl, J. 2004. All in good taste: creating natural savoury flavorings from yeast. In T.P. Lyons and K.A. Jacques (eds.), Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries, Proceedings of Alltech's 20th Annual Symposium, pp. 258-263. UK : Nottingham University Press.

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

Eldred, B. and Hutton, R.F. 1660. On the grading and identification of domestic commercial Shrimps (Family Penaeidae) with a tentative world list of commercial Penaeids. Quart. J. Flor. Acad. Sci. 23(2): 89-118.

FAO. 1994. Aquaculture Production 1986-1992. Rome: FAO Fisheries Circular 815 (Rev. 6) FAO.

Grey, D.L., Dall, W. and Baker, A. 1983. A Guide to the Australian Penaeid Prawns. Australia: The Department of Primary Production of the Northen Territory.

Harmova, M. and Fincher, G.B. 1993. Purification properties of three (1,3)-β-D-glucanase isoenzymes from young leaves of barley (Hordeum vulgare). Biochem.J. 289: 453-461.

Holthuis, L.B. 1980. Animal Tissue Techniques. 4th ed. San Francisco: W.H. Freeman and Company.

Huang, H.J. 1983. Factor affecting the successful culture of *Penaeus stylirostris* and *Penaeus Vannamei* at an estuarine power plant site : temperature, salinity, inherent growth wariability, damselfly nymph predation, population density and distribution and polyculture. PhD dissertation. USA: TexasA & M University.

Itami, T., Takahashi Y., Tsuchihira, E. and Igusa, H. 1994. Enhancementof disease of Kuruma prawn *Penaeus japonicus* and increase in phagocytic activity of prawn Haemocytes after oral administration of β-1,3-glucan (Schizophyllan). 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 Thrid Asian Fisheries Forum, pp. 375-379. Philippines : Asian Fisheries Society.

Johansson, M.W. and Soderhall, K. 1989. A cell adhesion factor from crayfish haemocytes has degranulating activity towards crayfish granular cells. Insect. Biochem. 19: 183-190.

Kery, V., Kogan, G., Zajacova, K., Slamova, K., Masler, L. and Alfoldi, J. 1991. Hydrolysis of yeast cell wall glucan by extracellular (1,3)-β-glucanases from *Aspergillus niger*. Enzyme. Microb. Technol. 13: 87-90.

Kitani, H. 1986. Larval development of the white shrimp (*Penaeus vannamei*) reared in the Laboratory and statistical observation of its naupliar stages. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 52: 1131-1139.

Lackie, A.M. 1980. Invertebrate immunity. Parasitology. 80: 393-412.

Lackie, A.M. 1986. Immune mechanisms in invertebrate vectors. Clarendon Press, Oxford.

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

Lee, D.O.C. and Wickins, J.F. 1992. Crustacean Farming. London: Blackwell Sciencetific Publications.

Li, p., Lawrence, A.L., Castille, F.L and Gatlin D.M. 2007. Preliminnary evaluation of a purified Nucleotide mixture as a dietary supplement for Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone). Aquac. Res. 38: 887-890.

Liao, I.C. and Chen, Y.P. 1983. Maturation and spawning of penaeid prawns in Tungkang Marine laboratory, Taiwan, In J.P. McVey (ed.), Handbook of Mariculture, Vol. I Crustacean aquaculture, pp. 155-160. Florida : CRC Press.

Limsuwan, C. 1999. Shrimp culture in Thailand toward year 2000. AAHRI Newsletter. 8(1): 5-8.

Lopez, N., Cuzon, G., Gaxiola, G. Taboada, G. Valenzuela, M., Pascual, C., Sanchez, A. and Rosas, C. 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.

Mateo, C.D. 2005. Aspcets of Nucleotide Nutrition in Pigs. UAS: Department of Animal and Range Science South Dakota State University.

Mateo, C.D. and Stein, H.H. 2004. Nucleotide and young animal health: can we enhance intestinal tract development and immune function. In T.P. Lyons and Jacques K.A. (eds.), Nutritional Biotechnology in the fed and food Industry, Proceeding of Alltech' 20th Annual Symposium, pp. 159-168. UK : Nottingham University Press.

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

Mats, W.J., Keyser, P., Sritunyalucksana and Soderhall, K. 2000. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. Aquaculture 191: 45-52

Munoz, M., Vandenbuleke, F., Gueguen, Y. and Bachere, E. 2003. Expression of penaeidin antimicrobial peptides in early larval stages of the shrimp *Penaeus vannamei*. Dev. Comp. Immunol. 27(4): 283-289.

Ogle, J.T. 1992. A review of the current (1992) state of our knowledge concerning reproduction in open thelycum Penaeid shrimp with emphasis on *Penaeus vannamei*. Invertebr. Reprod. Devel. 22: 267-274.

Farfante, P. and Kensley, B. 1997. Penaeoid and Sergestoid Shrimps and Prawns of the World. Keys and Diagnoses for the Families and Genera. France : Memories du Museum Nation D'historie Naturelle.

Partrick. 1977. Ecology of freshwater diatoms-diatom communities. In D. Werner (ed.), The Biology of Diatoms, pp. 284-332. Berkeley : University of Califonia Press.

Ratcliffe, N. A. 1985. Invertabrate immunity-A primer for the non-specialist.

Immunology letters. 10: 253-270.

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

Reid, K.B.H. and Porter, R.R. 1981. The proteolytic activation systems of completment. Annu. Rev. Biochem. 50: 433-464.

Rosenberry, R.F. 1976. The cell wall. In J.E. Smith and D.R. Berry (ed.), The Filamentous Fungi Biosynthesis and Metabolism, pp. 328-334. London : Edward Arnold.

Rosenberry, R.F. 1993. World Shrimp Farming 1993. Aquaculture Digest, December 1993.

Smith, V.J. and Chisholm, J.R.S. 1992. Non- cellular immunity in crustaceans. Fish shellfish Immunol. 2: 1-31.

Smith, V.J. and Ratcliffe, N.A. 1980. Cellular defense reactions the shore crab. *Carinus maenas*. J. Invert. Pathol. 35: 65-75.

Smith, V.J. and Soderhall, K. 1983. Separation of the haemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods and phenoloxidase distribution. Dev. Comp. Immunul. 7: 229-239.

Smith, V.J. and Soderhall, K. 1986. Cellular immune mechanism in the crustacea. Symposium of the Zoological Society of London. 56: 59-79.

Smith, V.J. and Soderhall, K. 1991. A comparison of phenoloxidase activity in the blood of Marine invertebrates. Dev. Comp. Immunol. 15: 251-261.

Sprague, J.B. 1971. Measurement of Pollution Toxicity to Fish, Sublethal Effects and Safe Concentration. Water. Res. 5: 245-266.

Stein, H.H. and Mateo, C.D. 2005. Nucleotides in nutrition: importance in infant and childhood diets. In T.P. Lyons and K.A. Jacques (eds.), Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries, Proceedings of Alltech's 21st Annual Symposium, pp. 147-150. UK : Nottingham University Press.

Sindermann, C.J. 1971. Internal defences of Grustacea: A review. Fisheries Bulletin 69: 455-489.

Soderhall, K. 1982. Prophenoloxidase activating system and melanization a recognition Mechanism in arthopods. A review. Dev. Comp. Immunol. 6: 601-611.

Soderhall, K. and L. Cerenius. 1992. Crustracean immunity. Annual Rev. of Fish Diseases. 2: 3-23.

Soderhall, K. and Smith, V.J. 1986. Prophenoloxidase-activating cascade as a recognition

System in arthropods. In A.P. Gupta (ed.), Hemolytic and Humoral Immunity in Arthropods, pp. 251- 258. New York : John Wiiley & Sons, Inc.

Sritunyalucksana, K. and Soderhall, K. 2000. The proPO and clotting system in crustaceans. Aquaculture 191: 53-69.

Sritunyalucksana, K., Gangnonngiew, W., Archakunakorn, S., Fegan, D. F. and Flegel, T.W. 2005. Bacterial clearance rate and a new differential hemocyte staining method to assess immunostimulant activity in shrimp. Dis. Aquat. Org. 63:89-94

Sung, H.H., Yang Y.L. and Song, Y.L. 1994. Vibriosis resistance induced by glucan treatment in the Tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Fish Patho. 29(1): 11-17.

Tseng, W.Y. 1987. Shrimp Mariculture, A Practical Manual. Departments of Fisheries The university of Papua New Guinea, Port Moresby, Papua New Guinea.

Vargas-Albores, A.F. 1995. The defense system of brown shrimp (*Penaeus californiensis*): humoral recognition and cellular responses. J.Mar.Biotechnol. 3:153-156.

Wassenberg, T.J. and Hill, B.J. 1987. Natural diet of the tiger prawns *Penaeus* esculentus and *P. semisulcatus*. Aus. J. Mar. Freshwater Res. 38: 169-182.

Wickins, J.F. 1985. Ammonia production and oxidation during in culture of marine prawns and lobsters in laboratory system. USA: Aquaculture Engineering.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

วิธีวิเคราะห์อาหารแบบ proximate analysis (AOAC , 1990)

1. การวิเคราะห์โปรตีน (crude protein) ในอาหารสัตว์

หลักการ

วิธีหาปริมาณไนโตรเจนที่เป็นส่วนประกอบของโปรตีนซึ่งโดยทั่วไปโปรตีนประกอบด้วยไนโตรเจนประมาณร้อยละ 16 ดังนั้น เมื่อทราบปริมาณไนโตรเจนแล้วนำมาคูณกับแฟคเตอร์ 6.25 ผลที่ได้คือ โปรตีนทั้งหมด (crude protein) ในอาหารสัตว์ ขั้นตอนในการวิเคราะห์มี 3 ขั้นตอน คือ

1. การย่อยตัวอย่างอาหารให้อยู่ในรูปสารละลาย
2. การหาปริมาณโปรตีนโดยการกลั่นสารละลายที่ได้จากข้อ 1
3. การหาความเข้มข้นที่แน่นอนของกรด H_2SO_4

อุปกรณ์

1. เครื่อง erhardt kjeldathern digestion unit
2. เครื่อง erhardt vapodast 1
3. ชุดไตเตรท

สารเคมี

1. สารละลายกรด H_2SO_4 เข้มข้น
2. สารละลายกรด H_2SO_4 เข้มข้น 0.1 N
3. สารละลาย NaOH เข้มข้นร้อยละ 50
4. สารละลายกรด Boric เข้มข้นร้อยละ 4
5. protein cataiyst
6. tastiro indicator

การเตรียมสารเคมี

1. Protein cataiyst เตรียมจาก $CuSO_4$ 7 กรัม ผสมกับ $K_2 SO_4$ 100 กรัม
2. boric acid ร้อยละ 4 เตรียมจาก boric acid 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่นเป็น 1 ลิตร
3. tashiro indicator เตรียมจาก methyl red : methylene blue สัดส่วน 3 ต่อ 2 โดยละลาย methyl red 1 กรัม ใน NaOH เข้มข้น 0.1 N ปริมาตร 37 มิลลิลิตรและน้ำกลั่น ให้มีปริมาตรรวมเป็น 1 ลิตร ผสมกับสารละลาย methylene blue 1 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร
4. 0.5 N H_2SO_4 เตรียมจาก สูตร

$$V = (100 \times M \times N)/ a \times p \times d$$

เมื่อ V = ปริมาตรของสารที่ใช้เตรียมสารละลาย 1 ลิตร

M = น้ำหนักโมเลกุลของสาร

N = ความเข้มข้นเป็นนอร์มอล

a = จำนวนโปรตอนของกรดที่ทำปฏิกิริยาได้

p = เปอร์เซนต์ความบริสุทธิ์

d = ความหนาแน่นของสาร

5. การเตรียม 0.5 N Na_2CO_3 ชั่ง Na_2CO_3 26.5 g อบที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง เพื่อไล่ความชื้น ละลายในน้ำกลั่นอุ่นที่ต้มไล่ CO_2 ออกแล้ว ทำให้เป็น 1 ลิตร

6. การเตรียม 0.131 N NaOH เตรียมจาก สูตร

$$V = (100 \times M \times N) / a \times p \times d$$

เมื่อ V = ปริมาตรของสารที่ใช้เตรียมสารละลาย 1 ลิตร

M = น้ำหนักโมเลกุลของสาร

N = ความเข้มข้นเป็นนอร์มอล

a = จำนวนอิเลคตรอนที่ทำปฏิกิริยาได้

p = ร้อยละความบริสุทธิ์

d = ความหนาแน่นของสาร

การหาความเข้มข้นที่แน่นอนของกรด H_2SO_4 (Skoog and West, 1986)

วิธีการทดลอง

1. เตรียมสารละลาย 0.5 N H_2SO_4 และ 0.5 N Na_2CO_3
2. ปิเปต 0.5 N Na_2CO_3 25 ml ใส่ใน flask หยด methyl orange 2 – 3 หยด ไตเตรดกับ 0.5 N H_2SO_4 จนถึงจุดยุติ จะได้สีชมพูเหลือง

คำนวณหาความเข้มข้นของ H_2SO_4 จาก

$$N_{acid} = (N_{base} \times V_{base}) / V_{acid}$$

โดย N_{acid} = ความเข้มข้นของสารละลาย H_2SO_4 เป็นนอร์มอล

N_{base} = ความเข้มข้นของสารละลาย Na_2CO_3 เป็นนอร์มอล

V_{base} = ปริมาตรของสารละลาย Na_2CO_3 เป็นมิลลิลิตร

V_{acid} = ปริมาตรของสารละลาย H_2SO_4 เป็นมิลลิลิตร

การย่อยตัวอย่างอาหาร (Kjeldatherm digestion)

วิธีการทดลอง

1. ชั่งตัวอย่างอาหารแห้งประมาณ 2 กรัม ใส่ใน digestion tube
2. เติม catalyst 10.01 กรัม ลงไปแล้วเติม H_2SO_4 เข้มข้น 25 มิลลิลิตร
3. นำ digestion tube ใส่ใน rack แล้วนำ rack ไปใส่ใน Kjeldatherm digestion block พร้อมทั้งประกอบท่อดูดควันระบบสุญญากาศทิ้งให้เกิดการย่อยจนได้สารประกอบสีดำประมาณ 20 นาที
4. เริ่มตั้งอุณหภูมิเครื่อง Kjeldatherm digestion block ไว้ที่ประมาณ 100 องศาเซลเซียส แล้วเพิ่มอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ทุก ๆ ประมาณ 15 – 20 นาที จนอุณหภูมิถึง 380 องศาเซลเซียส
5. ปล่อยให้เกิดการย่อยสมบูรณ์ (โดยสีของสารละลายใน digestion tube จะขึ้นกับชนิดของ catalyst ในการย่อยนี้จะได้สีฟ้า)
6. ปล่อยทิ้งไว้ให้สารละลายมีอุณหภูมิลดลงถึงอุณหภูมิห้อง
7. เติมน้ำกลั่นลงใน digestion tube ให้น้ำใน tube มีปริมาณมากพอที่จะนำไปกลั่นได้ (เติมประมาณ 100 – 150 องศาเซลเซียส)

การกลั่นสารละลายเพื่อนำไปหาโปรตีน

วิธีการทดลอง

1. เปิดเครื่องมือ vapodest 1 โยกคันโยกมาอยู่ในตำแหน่ง fill เพื่อปล่อยน้ำเข้าสู่ boiler จนได้ระดับน้ำประมาณ 6/10 ของ boiler แล้วโยกคันโยกมาอยู่ที่ตำแหน่ง stand by น้ำใน boiler จะเริ่มเดือด ไม่ควรเติมน้ำมากเกินไปเพราะเวลาน้ำเดือดจะล้นเข้ามาอยู่ใน digestion tube

2. เติม 4% boric acid 100 ml ลงใน Eelenmeyer flask ขนาด 500 มิลลิลิตร หยก tashiro indicator ลงไป 5 - 6 หยด จะได้สารละลายสีม่วง วาง flask ที่มี boric acid ไว้ในตำแหน่งที่มี digestion tube โดยปล่อยให้ปลาย digestion tube จุ่มอยู่ในสารละลาย boric acid ตลอดเวลา

3. นำ digestion tube ที่มีตัวอย่างที่ dilute แล้วไปวางบน clamp โดยให้ส่วนปลายของ tube แนบสนิทกับ cone – shape rubber stopper

4. เมื่อน้ำเริ่มเดือดเป็นไอให้กดปุ่ม “added NaOH” เพื่อให้ 50%NaOH solution ไหลเข้าสู่ digestion tube สารละลายใน digestion tube จะเกิดฟองก๊าซขึ้น กดปุ่ม added NaOH ไปเรื่อย ๆ จนไม่เกิดฟองขึ้น (สารละลายใน digestion tube จะขุ่นมีตะกอน) เติม 50%NaOH solution ให้มากเกินพออีกประมาณ 10 มิลลิลิตร ถ้าในตัวอย่างอาหารมีสารประกอบไนโตรเจนมาก สีของสารละลาย boric acid และ tashiro indicator จะเริ่มเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเขียว ในขั้นตอนนี้จะต้องปล่อยน้ำให้ไหลเข้า condenser เพื่อให้ก๊าซ NH_3 ควบแน่นไหลเข้าสู่ flask ที่บรรจุ boric acid

5. โยกคันโยกมาที่ตำแหน่ง distillation เพื่อให้ไอน้ำเข้าไปใน digestion tube และปล่อยให้เกิดการกลั่นจนได้สารละลายใน flask ที่มี boric acid จนได้ปริมารเป็น 300 มิลลิลิตร แล้วให้โยกคันโยกมาที่ตำแหน่ง stand by ถอด digestion tube ออก

6. นำ flask ที่มี boric acid และ tashiro indicator ไปไตเตรดกับสารละลาย standard H_2SO_4 ความเข้มข้นประมาณ 0.5 N จนถึงจุดยุติซึ่งสารละลายใน flask จะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีม่วงอ่อน

การคำนวณหาปริมาณโปรตีน

$$\text{โปรตีน (ร้อยละ)} = \frac{1400 \times V_s \times N_s \times N_p}{\text{น้ำหนักของตัวอย่าง (กรัม)} \times 100}$$

โดย V_s = ปริมาตรของ H_2SO_4 ที่ใช้ในการไตเตรต เป็น มิลลิลิตร

N_s = ความเข้มข้นของสารละลาย H_2SO_4 ใช้ในการไตเตรตเป็นนอร์มอล

N_p = conversion factor (มีค่า 6.25)

2. การวิเคราะห์หาปริมาณความชื้น

หลักการ

ความชื้นของตัวอย่างอาหารสัตว์จะถูกดึงไปโดยการระเหยด้วยความร้อนจนกระทั่งได้น้ำหนักของอาหารที่เหลืออยู่คงที่ น้ำหนักที่สูญหายไปของอาหารก็คือความชื้นของอาหารนั่นเอง

อุปกรณ์

1. ตู้อบแห้ง (hot air oven)
2. โหลดูดความชื้น (desiccator)
3. ถ้วยอะลูมิเนียม
4. คีมคีบ (tong)

วิธีการทดลอง

1. อบถ้วยอะลูมิเนียมที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโหลดูดความชื้นแล้วชั่งน้ำหนักละเอียด
2. ชั่งตัวอย่างอาหาร (รู้น้ำหนักละเอียด) ประมาณ 2 กรัม ใส่ในถ้วยอะลูมิเนียม
3. อบอาหารที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
4. ทิ้งให้โหลเย็นในโหลดูดความชื้นชั่งน้ำหนักละเอียด
5. คำนวณ ความชื้น (ร้อยละ) จากสูตร

$$\text{ความชื้น (ร้อยละ)} = \frac{(\text{น้ำหนักอาหารก่อนอบ} - \text{น้ำหนักอาหารหลังอบ}) \times 100}{\text{น้ำหนักอาหารก่อนอบ}}$$

3. การหาปริมาณเถ้า (AOAC, 1980)

หลักการ

เมื่อนำตัวอย่างอาหารสัตว์ไปเผาไหม้ที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส พวกสารอินทรีย์ทั้งหมดจะถูกเผาไหม้ไป ส่วนที่เหลืออยู่ คืออนินทรีย์สาร โดยอนินทรีย์สารทั้งหมดที่ไม่ได้ระเหยไปในอุณหภูมิดังกล่าวเรียกว่าเถ้า (ash) เถ้าคือแร่ธาตุที่มีอยู่ในสารอาหารนั่นเอง

อุปกรณ์

1. เตาเผาอุณหภูมิความร้อนสูง (muffle furnace)
2. ถ้วยกระเบื้อง (porcelain crucibles)
3. โหลดูดความชื้น (desiccator)
4. ตู้ดูดควัน (fume hood)
5. เตาเผา (hot plate)
6. คีมคีบ (tong)

วิธีการทดลอง

1. อบ crucible ที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโหลดูดความชื้นชั่งน้ำหนักละเอียด
2. ชั่งน้ำหนักแห้ง (รู้น้ำหนักละเอียด) ประมาณ 2 กรัม ใส่ใน crucible
3. วาง crucible บน hotplate ปล่อยให้เกิดการ ignite ในตู้ควันจนหมดควัน
4. ย้าย crucible ไปเผาใน muffle furnace ที่ 600 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง
5. ทิ้งให้เย็นในโหลดูดความชื้นชั่งน้ำหนักละเอียด
6. คำนวณร้อยละความชื้นจากสูตร

$$\text{เถ้า (ร้อยละ)} = \frac{\text{ปริมาณเถ้าที่เหลือ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างแห้ง}} \times 100$$

4. การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน (AOAC, 1980)

หลักการ

อีเทอร์จะถูกระเหยเป็นไอติดต่อกันหลังจากนั้นไอของอีเทอร์กระทบความเย็นจากเครื่องควบแน่นแล้วกลั่นตัวกลับเป็นของเหลว และไหลผ่านตัวอย่างอาหารสัตว์ พร้อมทั้งสกัดสารที่สามารถละลายได้ในอีเทอร์ออกมาด้วยจนกระทั่งกระบวนการเสร็จสิ้นอีเทอร์จะถูกระเหยหรือทำให้แห้งไปจนหมดสิ่งที่เหลืออยู่คือไขมัน (crude fat) หรือที่เรียกว่า ether extract

อุปกรณ์

1. เครื่องสกัดไขมัน (soxtherm automatic) รุ่น S-11 ของบริษัท erhardt ประเทศเยอรมนี ประกอบด้วย cooler, oil bate โดยมี silicone oil เป็นตัวถ่ายเทความร้อน, pressure control pump และ condenser
2. thimble ชนิด double layer ขนาด 28x80 มิลลิเมตร
3. ขวดสกัดไขมัน (extraction beaker)
4. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1
5. โถดูดความชื้น (desiccator)

สารเคมี

1. petroleum ether (AR grade)

วิธีการทดลอง

1. อบขวดสกัดไขมันของเครื่องที่ 130 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักคงที่ ใช้เวลาอบประมาณ 2-3 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโหลดูดความชื้นชั่งน้ำหนักละเอียด
2. ชั่งตัวอย่างแห้ง (รู้น้ำหนักละเอียด) ประมาณ 2 กรัม ห่อด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1
3. ใส่ตัวอย่างที่ห่อด้วยกระดาษกรองแล้วใส่ใน thimble หลังจากนั้นใส่ thimble ลงในขวดสกัดไขมันของเครื่อง แล้วเติม petroleum ether 90 มิลลิลิตร ลงไปในขวดสกัดไขมัน (ระวังอย่าให้ thimble แช่อยู่ใน petroleum ether)
4. นำขวดสกัดไขมันไปประกอบกับเครื่อง soxtherm เปิดสวิตช์ oil bath แล้วตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 150 องศาเซลเซียส แล้วเปิดสวิตช์ที่ pressure control pump เปิด cooler ให้น้ำเย็นไหลเข้าสู่ condenser ของเครื่อง soxtherm
5. เลื่อนคันโยกที่เครื่อง soxtherm มายังตำแหน่งที่จะทำให้เกิดการ reflux กลับของ petroleum ether ปล่อยให้เกิดการสกัดเป็นเวลา 6 ชั่วโมง
6. เลื่อนคันโยกที่เครื่อง soxtherm มาที่ตำแหน่งที่ทำให้เกิดการกลั่นเก็บของ petroleum ether รอจน petroleum ether แห้งเกือบหมด
7. นำขวดสกัดไขมันไปอบที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นใน desiccator
8. นำขวดสกัดไขมันไปชั่งน้ำหนักละเอียด
9. คำนวณร้อยละของไขมันจากสูตร

$$\text{ไขมัน (ร้อยละ)} = \frac{\text{น้ำหนักของไขมัน}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างแห้ง}} \times 100$$

5. การหาปริมาณเยื่อใย (fiber)(AOAC, 1978)

หลักการ

นำอาหารที่สกัดไขมันออกแล้วไปย่อยด้วยสารละลายกรดเจือจางหลังจากนั้นอาหารจะถูกย่อยต่อไปด้วยสารละลายด่างเจือจางสารที่เหลืออยู่ถูกกรองเก็บไว้ในกระดาษกรองใน crucible แล้วนำไปเผาที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส น้ำหนักที่สูญหายไปในการเผาคือเยื่อใยทั้งหมดที่มีอยู่ในอาหารนั่นเอง

อุปกรณ์

1. crude fiber digestion apparatus ประกอบด้วย digestion beaker และ condenser
2. กระดาษกรองชนิดไม่มีเถ้า (Whatman เบอร์ 41)
3. เตาเผาอุณหภูมิความร้อนสูง (muffle furnace)
4. ถ้วยกระเบื้อง (porcelain crucibles)
5. โหลดูดความชื้น (desiccator)
6. กรวยกรอง (funnel)
7. กระดาษลิตมัส

สารเคมี

1. H_2SO_4 เข้มข้น 0.255 N
2. NaOH เข้มข้น 0.313 N
3. 95% ethyl alcohol

วิธีการทดลอง

1. อบกระดาษกรองเบอร์ 41 และ crucible ที่ 105 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโหลดูดความชื้นจนได้น้ำหนักคงที่ ชั่งน้ำหนักละเอียด
2. นำตัวอย่างที่สกัดไขมันออกไปแล้ว (ทราบน้ำหนักละเอียดเริ่มต้นของตัวอย่างก่อนสกัดไขมัน) ใส่ลงใน beaker ทรงสูงขนาด 600 มิลลิลิตร เติม H_2SO_4 เข้มข้น 0.225 N ลงไป 200 มิลลิลิตร ต่อ condenser เข้ากับ beaker เพื่อรักษาระดับของกรดให้คงที่ เปิด heater ให้ความร้อนกับกรดจนเดือด ทำการย่อยต่อเป็นเวลา 30 นาที
3. กรองสารละลายที่ได้จากข้อ 2 ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 41 จนหมด (ไม่ควรให้มีตะกอนเหลือค้างอยู่ใน beaker) ล้างตะกอนที่ค้างอยู่บนกระดาษกรองด้วยน้ำกลั่นจนหมดความเป็นกรด
4. นำส่วนที่เหลือบนกระดาษกรองใส่ลงใน beaker ในข้อ 2 จนหมด เติมสารละลาย NaOH เข้มข้น 0.131 N ลงไป 200 มิลลิลิตร ใช้สารละลายนี้ล้างสารตัวอย่างบนกระดาษกรองให้หมดแล้วจึงต้มให้เดือดเป็นเวลา 30 นาที

5. กรองเอาสารละลายจากข้อ 4 ด้วยกระดาษกรองแผ่นเดิมแล้วล้างตัวอย่างจนหมดความเป็นด่างด้วยน้ำกลั่น ล้างตะกอนด้วย 95% ethyl alcohol ประมาณ 30 มิลลิลิตร นำตัวอย่างที่เหลือบนกระดาษกรองไปอบให้แห้งที่ 100 องศาเซลเซียส (ประมาณ 2 ชั่วโมง) ทิ้งให้เย็นใน desiccator จนได้น้ำหนักคงที่ ชั่งน้ำหนักละเอียด
6. นำตะกอนพร้อมกระดาษกรองไปเผาเพื่อหาเถ้าโดยใส่ไว้ใน crucible ที่ทราบน้ำหนักละเอียดแล้ว ทิ้งให้เย็นใน desiccator แล้วนำไปชั่งน้ำหนักละเอียด
7. คำนวณร้อยละของเยื่อใยจากสูตร

$$\text{เยื่อใย(ร้อยละ)} = \frac{[(\text{น้ำหนักตะกอน+กระดาษกรอง})-\text{น้ำหนักกระดาษกรอง}-\text{ปริมาณเถ้า}]}{\text{น้ำหนักตัวอย่างแห้ง}} \times 100$$

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

สารละลายที่ใช้ในการทดลอง

สารละลายบัฟเฟอร์ cacodylate

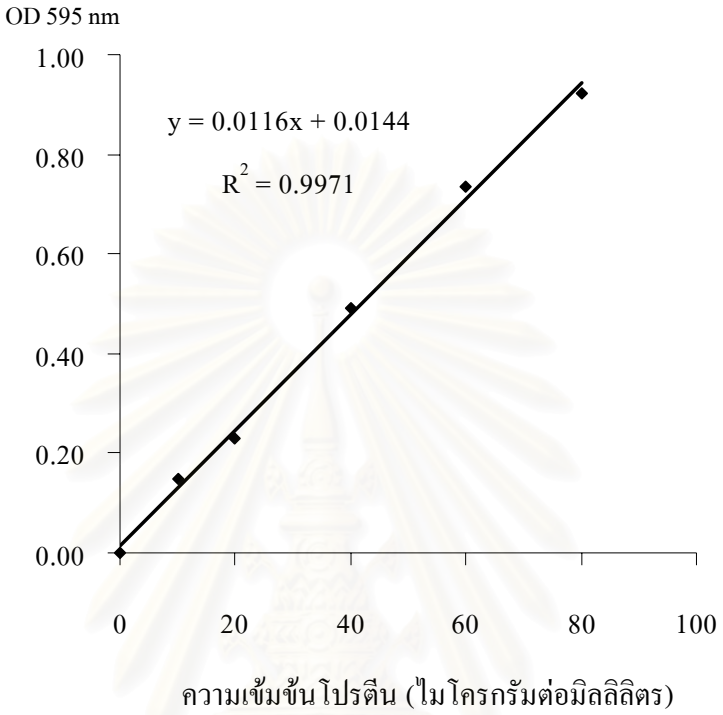
โซเดียมคาโคดีเลต(sodium cacodylate)	10	มิลลิโมลาร์
โซเดียมคลอไรด์	450	มิลลิโมลาร์
แคลเซียมคลอไรด์	10	มิลลิโมลาร์
แมกนีเซียมคลอไรด์	26	มิลลิโมลาร์

ปรับพีเอชเป็น 7.3

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

กราฟมาตรฐานโปรตีน (bovine serum albumin)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง

จำนวนกุ้งขาวแวนนาไมที่ตายหลังใส่ *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 ที่ระดับความเข้มข้มประมาณ 10^5 CFU/ml ในน้ำเลี้ยงกุ้ง เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

สูตรอาหาร	จำนวน (ซ้ำ)	V. harveyi สายพันธุ์1526	จำนวน (ตัว)	จำนวนกุ้งตายสะสม(ตัว)				
				0 ชม	24 ชม	48 ชม	72 ชม	96 ชม.
สูตรมาตรฐาน	1	$(2.60\pm0.20)\times10^4$	8	0	0	1	3	5
	2	$(2.64\pm0.17)\times10^4$	8	0	0	1	4	5
0.01%บีตากลูแคน	1	$(2.76\pm0.06)\times10^4$	8	0	0	0	0	1
	2	$(2.71\pm0.10)\times10^4$	8	0	0	0	0	1
2%นิวคลีโอไทด์	1	$(2.74\pm0.06)\times10^4$	8	0	0	0	2	2
	2	$(2.56\pm0.19)\times10^4$	8	0	0	0	1	3

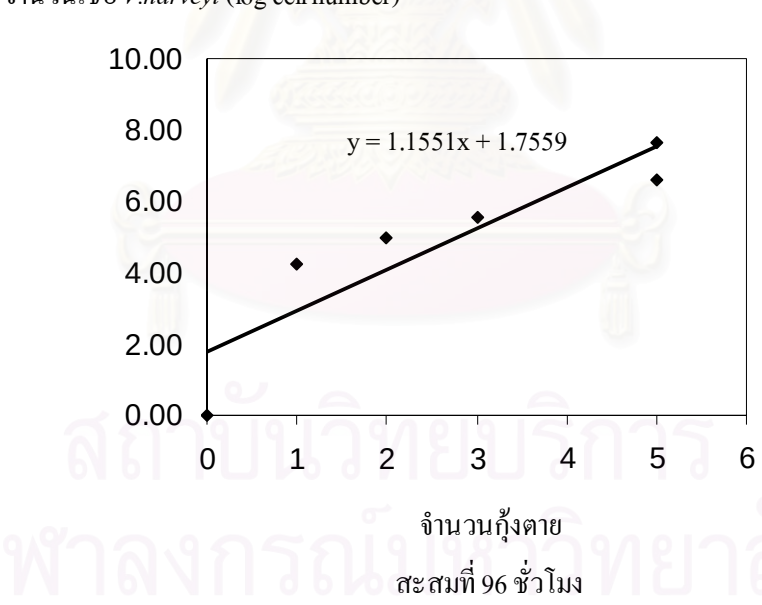
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก จ

จำนวนกุ้งขาวแวนนาไมที่ตายหลังใส่ *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในน้ำเลี้ยงกุ้ง เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

V. harveyi สายพันธุ์1526	Log cell number	จำนวน (ตัว)	จำนวนกุ้งตายสะสม(ตัว)
			96 ชม.
1.82×10^{4}	4.26	5	1
9.43×10^{4}	4.97	5	2
3.55×10^{5}	5.55	5	3
4.00×10^{6}	6.60	5	5
4.27×10^{7}	7.63	5	5

ค่าความเข้มข้นของเชื้อ *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 ที่ทำให้กุ้งตาย 50 % (LC_{50})



ความเข้มข้นของเชื้อที่ทำให้กุ้งตาย 50 เปอร์เซ็นต์ที่ 96 ชั่วโมง เท่ากับ 4.42×10^{4} CFU/ml

ภาคผนวก ฉ.

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบน้ำหนัก ความยาวและการรอดของกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ด้วยอาหารทดลอง 3 สูตร

Diet No.	Block	Initial				28 days				Survival rate (%)
		No.of Shrimp	Body weight (g)		Body length (cm)	No.of Shrimp	Body weight (g)		Body length (cm)	
			Total	Avg weight	Avg length		Total	Avg weight	Avg length	
Basal diet	B-I	10	1.00	0.10	2.10	10	2.30	0.23	3.07	100.00
	B-II	10	1.00	0.10	2.10	10	2.53	0.25	3.09	100.00
	B-III	10	1.00	0.10	2.10	9	1.73	0.19	2.79	90.00
	B-VI	10	1.00	0.10	2.10	10	2.50	0.25	3.16	100.00
	B-V	10	1.00	0.10	2.10	10	2.55	0.26	3.11	100.00
	B-VI	10	1.00	0.10	2.10	10	2.37	0.24	3.01	100.00
	Mean+S.D.	10±0.00	1.00±0.00	0.10±0.00	2.10±0.00	9.83±0.41	0.31±0.31	0.24±0.02	3.04±0.13	98.33±4.08
0.01% Betaglucan	B-I	10	1.00	0.10	2.10	10	2.30	0.23	3.07	100.00
	B-II	10	1.00	0.10	2.10	10	2.79	0.28	3.25	100.00
	B-III	10	1.00	0.10	2.10	10	2.64	0.26	3.12	100.00
	B-VI	10	1.00	0.10	2.10	10	2.66	0.27	3.17	100.00
	B-V	10	1.00	0.10	2.10	10	3.09	0.31	3.41	100.00
	B-VI	10	1.00	0.10	2.10	10	3.08	0.31	3.42	100.00
	Mean+S.D.	10±0.00	1.00±0.00	0.10±0.00	2.10±0.00	10.00±0.00	2.76±0.30	0.28±0.03	3.24±0.15	100.00±0.00
2% Nucleotide	B-I	10	1.00	0.10	2.10	10	2.53	0.25	3.15	100.00
	B-II	10	1.00	0.10	2.10	10	2.18	0.22	3.02	100.00
	B-III	10	1.00	0.10	2.10	9	2.87	0.29	3.29	90.00
	B-VI	10	1.00	0.10	2.10	10	2.58	0.26	2.99	100.00
	B-V	10	1.00	0.10	2.10	10	2.98	0.30	3.25	100.00
	B-VI	10	1.00	0.10	2.10	10	2.5	0.25	3.19	100.00
	Mean+S.D.	10±0.00	1.00±0.00	0.10±0.00	2.10±0.00	9.83±0.41	2.61±0.29	0.26±0.03	3.15±0.12	98.33±4.08

ตารางที่ 1(ต่อ) เปรียบเทียบน้ำหนัก ความยาวและการรอดของกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ด้วยอาหารทดลอง 3 สูตร

Diet No.	Block	28 days				56 days				Survival rate (%)
		No.of Shrimp	Body weight (g)		Body length (cm)	No.of Shrimp	Body weight (g)		Body length (cm)	
			Total	Avg weight	Avg length		Total	Avg weight	Avg length	
Basal diet	B-I	10	2.30	0.23	3.07	6	1.93	0.32	3.43	60.00
	B-II	10	2.53	0.253	3.09	5	1.77	0.35	3.62	50.00
	B-III	9	1.73	0.192	2.79	5	1.78	0.37	3.42	50.00
	B-IV	10	2.50	0.25	3.16	5	1.7	0.34	3.48	50.00
	B-V	10	2.55	0.255	3.11	5	1.82	0.36	3.54	50.00
	B-VI	10	2.37	0.237	3.01	6	1.95	0.33	3.45	60.00
	Mean+S.D.	9.83±0.41	0.31±0.31	0.24±0.02	3.04±0.13	5.33±0.52	1.83±0.10	0.34±0.02	3.49±0.08	53.33±5.16
0.01% Betaglucan	B-I	10	2.30	0.23	3.07	7	3.83	0.55	4.13	70.00
	B-II	10	2.79	0.28	3.25	9	4.64	0.52	3.98	90.00
	B-III	10	2.64	0.26	3.12	10	5.16	0.52	4.16	100.00
	B-IV	10	2.66	0.27	3.17	8	3.77	0.47	3.85	80.00
	B-V	10	3.09	0.31	3.41	9	4.56	0.51	4.04	90.00
	B-VI	10	3.08	0.31	3.42	9	4.66	0.52	4.09	90.00
	Mean+S.D.	10.00±0.00	2.76±0.30	0.28±0.03	3.24±0.15	8.67±1.03	4.44±0.54	0.51±0.02	4.04±0.11	86.67±10.33
2% Nucleotide	B-I	10	2.53	0.25	3.15	8	4.24	0.53	4.06	80.00
	B-II	10	2.18	0.22	3.02	10	4.21	0.42	3.74	100.00
	B-III	9	2.87	0.29	3.29	8	3.93	0.49	3.94	80.00
	B-IV	10	2.58	0.26	2.99	7	3.41	0.49	3.86	70.00
	B-V	10	2.98	0.30	3.25	7	3.54	0.51	3.90	70.00
	B-VI	10	2.5	0.25	3.19	9	4.37	0.48	3.87	90.00
	Mean+S.D.	9.83±0.41	2.61±0.29	0.26±0.03	3.15±0.12	8.17±1.17	3.95±0.40	0.49±0.04	3.89±0.11	81.67±11.69

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1(ต่อ) เปรียบเทียบน้ำหนัก ความยาวและการรอดของกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ด้วยอาหารทดลอง 3 สูตร

Diet No.	Block	56 days				84 days				Survival rate (%)
		No.of Shrimp	Body weight		Body length	No.of Shrimp	Body weight		Body length	
			Total	Avg weight	Avg length		Total	Avg weight	Avg length	
Basal diet	B-I	6	1.93	0.32	3.43	3	1.68	0.49	3.9	30.00
	B-II	5	1.77	0.35	3.62	3	1.76	0.59	4.23	30.00
	B-III	5	1.78	0.37	3.42	3	1.55	0.52	4.03	30.00
	B-IV	5	1.7	0.34	3.48	2	1.10	0.55	4.00	20.00
	B-V	5	1.82	0.36	3.54	2	1.08	0.54	4.10	20.00
	B-VI	6	1.95	0.33	3.45	3	1.59	0.53	3.93	30.00
	Mean+S.D.	5.33±0.52	1.83±0.10	0.34±0.02	3.49±0.08	2.67±0.52	1.46±0.30	0.54±0.03	4.03±0.12	26.67±5.16
0.01% Betaglucan	B-I	7	3.83	0.55	4.13	7	7.58	1.08	5.30	70.00
	B-II	9	4.64	0.52	3.98	5	4.57	1.00	5.10	50.00
	B-III	10	5.16	0.52	4.16	8	6.49	0.81	4.66	80.00
	B-IV	8	3.77	0.47	3.85	6	5.97	1.00	5.23	60.00
	B-V	9	4.56	0.51	4.04	5	4.22	0.84	4.64	50.00
	B-VI	9	4.66	0.52	4.09	7	6.25	0.89	4.80	70.00
	Mean+S.D.	8.67±1.03	4.44±0.54	0.51±0.02	4.04±0.11	6.33±1.21	5.85±1.26	0.94±0.11	4.96±0.29	63.33±12.11
2% Nucleotide	B-I	8	4.24	0.53	4.06	4	4.90	1.05	5.22	40.00
	B-II	10	4.21	0.42	3.74	4	3.73	0.93	4.95	40.00
	B-III	8	3.93	0.49	3.94	6	4.71	0.87	4.62	60.00
	B-IV	7	3.41	0.49	3.86	5	4.50	0.90	4.72	50.00
	B-V	7	3.54	0.51	3.90	5	4.31	0.86	4.94	50.00
	B-VI	9	4.37	0.48	3.87	6	4.40	0.73	4.52	60.00
	Mean+S.D.	8.17±1.17	3.95±0.40	0.49±0.04	3.89±0.11	5.00±0.89	4.43±0.40	0.89±0.10	4.83±0.26	50.00±8.94

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบน้ำหนัก ความยาวและการรอดของกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ด้วยอาหารทดลอง 3 สูตร

Diet No.	Block	Initial				28 days				Survival rate (%)
		No.of Shrimp	Body weight (g)		Body length (cm)	No.of Shrimp	Body weight (g)		Body length (cm)	
			Total	Avg weight	Avg length		Total	Avg weight	Avg length	
Basal diet	B-I	10	150.77	13.71	12.21	8	112.13	14.02	12.21	88.89
	B-II	10	145.26	14.53	12.08	9	134.20	14.91	12.08	100.00
	B-III	10	128.60	12.86	11.77	9	118.59	13.18	11.77	90.00
	B-IV	10	135.98	13.60	11.70	6	69.81	13.96	11.70	66.67
	B-V	10	135.92	13.59	11.87	7	98.04	14.01	11.87	77.78
	Mean+S.D.	10±0.00	139.31±8.72	13.66±0.59	11.93±0.22	7.80±1.30	106.55±24.31	14.01±0.61	11.93±0.22	84.67±12.77
0.01% Betaglucan	B-I	10	147.67	14.75	12.24	10	153.16	15.32	12.46	100.00
	B-II	10	136.84	13.68	11.88	10	129.77	14.42	11.98	100.00
	B-III	10	147.67	14.77	12.21	9	140.20	15.58	12.37	100.00
	B-IV	10	144.82	14.48	12.10	9	154.76	15.11	12.38	100.00
	B-V	10	143.08	14.31	11.92	10	152.75	15.28	12.22	100.00
	Mean+S.D.	10±0.00	144.02±4.46	14.40±0.44	12.07±0.16	10.00±0.55	142.38±10.34	15.14±0.44	12.28±0.19	100.00±0.00
2% Nucleotide	B-I	10	143.16	14.32	12.05	9	132.43	14.71	12.20	90.00
	B-II	10	158.92	14.45	12.28	8	118.54	14.82	12.42	88.89
	B-III	10	140.86	14.09	11.96	10	146.38	14.64	11.99	100.00
	B-IV	10	141.83	14.18	12.17	8	117.06	14.63	12.26	80.00
	B-V	10	141.74	14.17	11.94	10	145.37	14.50	12.05	100.00
	Mean+S.D.	10±0.00	145.30±7.66	14.24±0.14	12.08±0.14	9.00±1.00	131.96±14.05	14.66±0.11	12.19±0.17	91.78±8.45

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว ขวัญดาว จันทโชติ เกิดวันที่ 17 เมษายน 2525 ภูมิลำเนาจังหวัดพัทลุง เข้ารับการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนต้น และตอนปลายจากโรงเรียนพัทลุง จังหวัดพัทลุง ศึกษาต่อระดับปริญญาตรี ในสาขาผลิตภัณฑ์ประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตบางเขน สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (ประมง) เมื่อปี พ.ศ. 2548 และเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี พ.ศ. 2549 ในระหว่างการศึกษาได้เสนอผลงานการวิจัยในการประชุมวิชาการดังนี้

ขวัญดาว จันทโชติ และ คณะ. 2552. ผลของบีตากลูแคนและนิวคลีโอไทด์ต่อการเติบโตและการรอดตายในกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei* Boone การประชุมวิชาการครั้งที่ 47 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน วันที่ 17-20 มีนาคม 2552 (นำเสนอผลงานแบบโปสเตอร์)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย