

ผลของเมทัลโลโปรตีนต่อการเจริญเติบโต การรอดตาย และระบบภูมิคุ้มกัน
แบบไม่จำเพาะของกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*)
Effect of Metalloprotein on Growth, Survival and Non-Specific Immunity
of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

ปณิตา ประถมยา¹, วชิรียา ภูริวิโรจน์กุล², ชลล ลิมสุวรรณ¹ และ นิตี ชูเชิด¹
Panita Prathomya¹, Watchariya Purivirojkul², Chalor Limsuwan¹ and Niti Chuchird¹

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของเมทัลโลโปรตีนต่อการเจริญเติบโต การรอดตาย และระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) ในห้องปฏิบัติการ แบ่งการทดลองออกเป็น 3 ชุดการทดลอง ได้แก่ ชุดการทดลองที่ได้รับอาหารปกติ ในสภาวะออกซิเจนปกติ (5.9 - 7.8 ppm) หรือกลุ่มควบคุม, ชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมสารเมทัลโลโปรตีนที่ระดับความเข้มข้น 1 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ในสภาวะออกซิเจนต่ำ (3.0 - 4.1 ppm) และชุดการทดลองที่ได้รับอาหารปกติ ในสภาวะออกซิเจนต่ำ จำนวนชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ โดยแต่ละซ้ำใช้กุ้งขาวแวนนาไมน้ำหนักเฉลี่ย 7.5 ± 0.5 กรัม จำนวน 30 ตัว เลี้ยงเป็นระยะเวลา 55 วัน พบว่า กลุ่มควบคุมที่ได้รับอาหารปกติ ในสภาวะออกซิเจนปกติ มีน้ำหนักตัวเฉลี่ยเท่ากับ 15.00 ± 1.36 กรัม สูงกว่ากุ้งชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมสารเมทัลโลโปรตีนที่ระดับความเข้มข้น 1 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ในสภาวะออกซิเจนต่ำ (12.11 ± 1.13 กรัม) และชุดการทดลองที่ได้รับอาหารปกติ ในสภาวะออกซิเจนต่ำ (12.00 ± 2.85 กรัม) ($P < 0.05$) อัตราการรอดตายของกุ้งกลุ่มควบคุมเท่ากับ 93.33 ± 3.33 เปอร์เซ็นต์ มากกว่ากุ้งที่ได้รับอาหารผสมสารเมทัลโลโปรตีนที่ระดับความเข้มข้น 1 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ในสภาวะออกซิเจนต่ำ (61.11 ± 1.92 เปอร์เซ็นต์) และอาหารปกติ ในสภาวะออกซิเจนต่ำ (45.56 ± 3.85 เปอร์เซ็นต์) แต่กลุ่มที่ได้รับสารเมทัลโลโปรตีนมีอัตราการรอดตายสูงกว่า กลุ่มที่ไม่ได้รับสารนี้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ผลการศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในกุ้งขาวแวนนาไม พบว่า ปริมาณเม็ดเลือดรวม กระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม ค่าปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase และการผลิต superoxide dismutase ของกุ้งชุดควบคุมและชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมสารเมทัลโลโปรตีนที่ระดับความเข้มข้น 1 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ในสภาวะออกซิเจนต่ำ ไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) แต่สูงกว่าชุดการทดลองที่ไม่ได้รับอาหารผสมสารเมทัลโลโปรตีน ในสภาวะออกซิเจนต่ำ ($P < 0.05$) และกิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดของกุ้งชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมสารเมทัลโลโปรตีนที่ระดับความเข้มข้น 1 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ในสภาวะออกซิเจนต่ำ ดีที่สุด (1:8) ผลจากการทดลองแสดงให้เห็นว่า การใช้สารเมทัลโลโปรตีนมีผลช่วยในการเสริมระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไมได้ในสภาวะออกซิเจนต่ำ ซึ่งจะช่วยให้กุ้งมีอัตราการรอดตายเพิ่มขึ้น

Keyword: Pacific white shrimp, Metalloprotein, Non-Specific Immunity

Email: qoo_qoon@hotmail.com

¹ศูนย์วิจัยธุรกิจเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาชีววิทยาประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จตุจักร กทม. 10900

Aquaculture Business Research Center, Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Bangkok. 10900

²ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จตุจักร กทม. 10900

Department of Zoology, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900

Abstract

The effects of metalloprotein on growth, survival and immune response in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) was conducted under laboratory conditions. The experiment was carried out in three treatments (with three replicates/treatment). Each replicate was consisted of 30 shrimp (7.5 ± 0.5 g) and rearing for the period of 55 days. Treatment 1 or control group, shrimp were fed with pelleted feed containing graded levels of normal feed with normal oxygen conditions (5.9 - 7.8 ppm). Treatment 2, 1g metalloprotein/kg of the feed was added and rearing in low oxygen conditions (3.0 - 4.1 ppm). Treatment 3, shrimp were fed with normal feed without metalloprotein also in low oxygen conditions. After 55 days of dietary administration. shrimp fed with normal feed with normal oxygen conditions had an average body weight (15.00 ± 1.36 g) which was significantly higher ($P < 0.05$) than shrimp fed with 1g metalloprotein/kg of the feed in low oxygen conditions (12.11 ± 1.13 g) and the group that fed with normal feed in low oxygen conditions (12.00 ± 2.85 g) respectively. Survival rate of shrimp was higher ($P > 0.05$) in the group that fed with normal feed in normal oxygen conditions ($93.33 \pm 3.33\%$) than that shrimp fed with 1g metalloprotein/kg of the feed in low oxygen conditions ($61.11 \pm 1.92\%$) and normal feed in low oxygen conditions ($45.56 \pm 3.85\%$) ($P < 0.05$) respectively. However, shrimp fed with 1 g metalloprotein/kg of the feed had significantly higher survival rate than the control group without metalloprotein ($P < 0.05$). The immune characteristics of Pacific white shrimp in this study revealed that number of total hemocyte (THC), percentage phagocytosis, phenoloxidase activity and superoxide dismutase activity of shrimp from control group and shrimp fed 1 g metalloprotein/kg of the feed in low oxygen conditions were not significantly different ($P > 0.05$) but higher than treatment group without metalloprotein ($P < 0.05$). The present study indicate that oral administration of metalloprotein could increase immune response and survival rate of *L. vannamei* in low oxygen conditions.

คำนำ

อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งของประเทศไทยทำเงินเข้าประเทศปีละหลายหมื่นล้านบาทในปัจจุบัน เกษตรกรส่วนใหญ่เปลี่ยนจากการเลี้ยงกุ้งกุลาดำมาเป็นกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) เนื่องจากได้ปรับปรุงสายพันธุ์มาเป็นระยะเวลานาน กุ้งขาวแวนนาไมจึงเป็นกุ้งที่โตเร็ว เลี้ยงง่าย ให้ผลผลิตสูง (ชลอและพรเลิศ, 2547) เกษตรกรส่วนใหญ่จะปล่อยลูกกุ้งขาวในอัตราตั้งแต่ความหนาแน่นสูงมาก ทำให้ต้องให้อาหารในปริมาณมาก สิ่งขี้ถ่ายและอาหารส่วนที่เหลือจะตกค้างสะสมอยู่ที่พื้นบ่อเป็นสาเหตุให้คุณภาพน้ำเสื่อมลง โดยเฉพาะปริมาณแอมโมเนียที่เพิ่มขึ้นในขณะที่ยอดออกซิเจนจะลดลงจากกระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์โดยจุลินทรีย์ซึ่งจะมีปัญหามากในช่วงท้ายๆของการเลี้ยง ปัจจัยเหล่านี้จะเพิ่มความเครียดให้กับกุ้ง ส่งผลให้กุ้งอ่อนแอ ภูมิคุ้มกันของร่างกายต่ำลง ในช่วงที่กุ้งอ่อนแอนี้โอกาสที่เชื้อโรคจะเข้าทำอันตรายต่อกุ้งได้ง่ายและทำให้กุ้งเกิดโรคในที่สุด (บุญรัตน์, 2553) เนื่องจากปริมาณออกซิเจนมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการเจริญเติบโตของกุ้ง ดังนั้นการเพิ่มประสิทธิภาพการรับออกซิเจนของกุ้งจึงเป็นสิ่งจำเป็น สารประกอบเมทัลโลโปรตีนคือกลุ่มของโปรตีนที่มีโลหะเป็นองค์ประกอบร่วม จัดอยู่ในกลุ่มขนส่งออกซิเจน (dioxygen transport) เป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนและสารประกอบอื่นที่ไม่ใช่โปรตีน (prosthetic group) ได้แก่ โลหะทองแดง รวมอยู่ด้วย ทำหน้าที่ในการลำเลียงและเก็บกักออกซิเจน จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการลำเลียงก๊าซออกซิเจนเนื่องจากกุ้งต้องใช้ทองแดงเพื่อเป็นองค์ประกอบของฮีโมไซยานิน (haemocyanin) ซึ่งเป็นรงควัตถุที่เกี่ยวกับการหายใจ (respiratory pigment) ทำหน้าที่หลักในการจับออกซิเจน (oxygen affinity) (Mangum, 1989) และลำเลียงออกซิเจน (Dallinger, 1997) ฮีโมไซยานินเป็นรงควัตถุที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงซึ่งประกอบด้วยทองแดง 0.17 เปอร์เซ็นต์ พบเป็นส่วนประกอบในเลือดกุ้งที่เป็น macrocrustacean ถึง 80-95 เปอร์เซ็นต์ การศึกษาครั้งนี้เพื่อต้องการทราบประสิทธิภาพของสารเมทัลโลโปรตีนซึ่งมีบทบาทช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการจับออกซิเจนต่อการเจริญเติบโต อัตราการรอดตายและระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของกุ้งขาวแวนนาไมในห้องปฏิบัติการ โดยผลการศึกษาที่ได้จะนำไปประยุกต์เพื่อใช้สำหรับฟาร์มเลี้ยงกุ้งต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

ทำการทดลองที่อาคารปฏิบัติการศูนย์วิจัยธุรกิจเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาชีววิทยาประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารเมทัลโลโปรตีน

สารเมทัลโลโปรตีน ได้รับความอนุเคราะห์จาก บริษัท CISCHEM AGRICULTURE จำกัด ประเทศไทย

การเตรียมสัตว์ทดลอง

นำกุ้งขาวแวนนาไมขนาดประมาณ 7.5 ± 0.5 กรัม จำนวน 300 ตัว จากฟาร์มเลี้ยงกุ้งในจังหวัดจันทบุรีมาปรับสภาพในถังไฟเบอร์ขนาดความจุ 500 ลิตร บรรจุน้ำความเค็ม 25 ส่วนในพันส่วน (พีพีที) ปริมาตร 300 ลิตร เป็นระยะเวลา 5 วัน ก่อนเริ่มการทดลอง คัดเลือกกุ้งที่มีขนาดใกล้เคียงกันมาทำการทดลองในถังไฟเบอร์กลาสขนาดเดียวกัน จำนวน 9 ถังและใส่กุ้งถังละ 30 ตัว (100 ตัวต่อตารางเมตร) เพื่อทำการทดลองต่อไป

1. การศึกษาผลของสารเมทิลโลโปรตีนต่อการเจริญเติบโต การรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไม ระยะฟอสลาร์วาในห้องปฏิบัติการ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด โดยมี 3 ชุดการทดลอง (treatments) ในแต่ละชุดการทดลองมี 3 ซ้ำ (replicates) ชุดการทดลองที่ 1 คือ ชุดอาหารสำเร็จรูปปกติเคลือบน้ำมันปลาหมัก เลี้ยงในสภาวะออกซิเจนละลายในน้ำปกติ ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม โดยมีเครื่องให้อากาศอย่างพอเพียงตลอดเวลา ชุดการทดลองที่ 2 คือ ชุดอาหารสำเร็จรูปปกติผสมสารเมทิลโลโปรตีน 1 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม แต่เลี้ยงในสภาวะออกซิเจนละลายในน้ำ 3-4 มิลลิกรัมต่อลิตร (ppm) ลดปริมาณออกซิเจนลงจากระดับปกติและติดตามการเปลี่ยนแปลงในรอบวัน (เช้า-เย็น) เพื่อควบคุมให้อยู่ในระดับ 3-4 ppm ตลอดวัน ชุดการทดลองที่ 3 คือ ชุดอาหารสำเร็จรูปปกติ เคลือบน้ำมันปลาหมัก และเลี้ยงในสภาวะออกซิเจนละลายในน้ำ 3-4 ppm เช่นเดียวกับในชุดการทดลองที่ 2 ให้อาหารปริมาณ 3% ของน้ำหนักตัวต่อวัน วันละ 4 มื้อ ระหว่างการทดลองเก็บตัวอย่างน้ำจากถังทดลองมาวิเคราะห์ทุกสัปดาห์ ได้แก่ ความเค็ม ความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ ค่าความเป็นด่าง ความกระด้าง แอมโมเนีย และไนไตรท์ บันทึกการเจริญเติบโต และการรอดตายของกุ้งหลังการทดลองนาน 55 วัน

2. การศึกษาผลของสารเมทิลโลโปรตีนต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง ของกุ้งขาวแวนนาไมในห้องปฏิบัติการ

หลังจากสิ้นสุดการทดลองเลี้ยงกุ้งในการศึกษาข้อ 1 สุ่มกุ้งในแต่ละชุดทดลองมาทำการศึกษากุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงโดยเจาะเลือดจากแอ่งเลือด (ventral sinus) ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ด้วยเข็มฉีดยา ซึ่งภายในกระบอกฉีดยาบรรจุสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (K-199 + 5% L-cysteine) ปริมาณ 1 มิลลิลิตร (อัตราส่วนเลือดต่อสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดเท่ากับ 1:2) นำเลือดใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เพื่อทำการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว โดยวิเคราะห์จากการตรวจนับปริมาณเม็ดเลือดรวม และกิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้ง ตามวิธีของ กิจการ และคณะ (2543), กิจกรรมของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้งตามวิธีของ Itami *et al.* (1994), กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase ตามวิธีของ กิจการ และคณะ (2543) และ Soderhall and Hall (1984) และการศึกษาปริมาณการผลิต superoxide anion โดยใช้ชุดการทดลองสำเร็จรูป (test kit) RANSOD@Superoxide dismutase

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอดและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มทดลอง โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ (อนันต์ชัย, 2542)

ผลและวิจารณ์

1. การศึกษาผลของสารเมทัลโลโปรตีนต่อการเจริญเติบโต การรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไม ระยะโพสลาร์วาในห้องปฏิบัติการ

หลังจากนำกุ้งขาวแวนนาไมมาเลี้ยงด้วยอาหารปกติ ในสภาวะออกซิเจนปกติ ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม, อาหารปกติผสมสารเมทัลโลโปรตีน ในสภาวะออกซิเจนต่ำและอาหารปกติในสภาวะออกซิเจนต่ำ เป็นระยะเวลา 55 วัน พบว่า กุ้งชุดที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปปกติ ในสภาวะออกซิเจนปกติหรือกลุ่มควบคุม มีน้ำหนักเฉลี่ยสูงที่สุด โดยแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับชุดที่ได้รับอาหารปกติผสมสารเมทัลโลโปรตีน ในสภาวะออกซิเจนต่ำและชุดการทดลองที่ได้รับอาหารปกติแต่ไม่ผสมสารเมทัลโลโปรตีน (Table 1)

Table 1 Average body weight and percentage survival rates of *L. vannamei* from three treatment groups after 55 days of experiment

| parameter | 0 g metalloprotein /kg of the feed, normal oxygen | 1 g metalloprotein /kg of the feed, low oxygen | 0 g metalloprotein /kg of the feed, low oxygen |
|------------------------|---|--|--|
| | | | |
| Average body weight(g) | 15.00 ± 1.36^a | 12.11 ± 1.13^b | 12.00 ± 2.85^b |
| % survival | 93.33 ± 3.33^a | 61.11 ± 1.92^a | 45.56 ± 3.85^b |

Average values with different letters in the same row are statistically significantly different ($P < 0.05$)

เนื่องจากออกซิเจนมีความสำคัญกับการดำรงชีวิตของกุ้ง กุ้งในกลุ่มควบคุมที่ได้รับออกซิเจนเพียงพอจึงมีการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายสูงที่สุด เนื่องจากปริมาณออกซิเจนที่สูง ทำให้กุ้งกินอาหารได้มาก นอกจากนั้น มีผลต่อประสิทธิภาพการย่อยอาหารและการลำเลียงสารอาหาร เพราะว่ากระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์ต้องใช้ ออกซิเจน ซึ่งหลังจากเลี้ยงนาน 55 วัน กุ้งในกลุ่มควบคุมมีน้ำหนักเฉลี่ยสูงถึง 15 กรัม และมีอัตราการรอดตายสูงถึง 93.33 % สูงกว่าชุดที่เลี้ยงในปริมาณออกซิเจนต่ำทั้งสองกลุ่ม แต่เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบระหว่างชุดการทดลองที่ได้รับอาหารปกติผสมสารเมทัลโลโปรตีน ในสภาวะออกซิเจนต่ำพบว่า ชุดการทดลองที่ได้รับอาหารปกติผสมสาร เมทัลโลโปรตีนมีอัตราการรอดตายสูงกว่า ($61.11 \pm 1.92\%$) กลุ่มที่ไม่ได้รับสารชนิดนี้ ($45.56 \pm 3.85\%$) โดยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่น้ำหนักเฉลี่ยกุ้งทั้ง 2 ชุดการทดลองไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) เนื่องจากสาร เมทัลโลโปรตีนมีคุณสมบัติช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการรับออกซิเจนเนื่องจากมีหน้าที่ในการลำเลียงและเก็บกัก ออกซิเจนโดยมีองค์ประกอบของแร่ธาตุทองแดงเหมือนกับองค์ประกอบของฮีโมโกลบินซึ่งเป็นงควัตถุที่เกี่ยวกับการ หายใจทำหน้าที่หลักในการจับออกซิเจน (Mangum, 1989) และลำเลียงออกซิเจน (Dallinger, 1997) จากผล การศึกษาอัตราการรอดตาย ในทุกชุดการทดลอง แสดงให้เห็นว่าการเลี้ยงกุ้ง ในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนสูง ตลอดเวลา มีผลต่ออัตราการรอดตายและการเจริญเติบโตดีกว่าการเลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนต่ำ แต่ใน สภาพการเลี้ยงจริง ปริมาณออกซิเจนจะอยู่ในระดับที่ต่ำในช่วงท้ายๆของการเลี้ยง โดยเฉพาะในตอนกลางคืน จนกระทั่งเข้ามิดของวันถัดไปก่อนที่จะมีแสงแดด การเสริมสารเมทัลโลโปรตีนจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการจับ ออกซิเจนได้ในระดับหนึ่งซึ่งจะมีผลทำให้กุ้งมีสุขภาพแข็งแรงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับสารนี้ ซึ่งมีผลต่ออัตราการรอดตาย โดยเฉพาะกุ้งจะอ่อนแอมากหลังจากการลอกคราบและอาจตาย ถ้าปริมาณออกซิเจนอยู่ในระดับต่ำ Mangum (1989) พบว่าฮีโมโกลบินมีประสิทธิภาพต่ำสุดในการจับออกซิเจนหลังลอกคราบใหม่ๆ ซึ่งกิจกรรมนี้ต้องใช้พลังงาน

และออกซิเจนสูง เมื่อกุ้งมีออกซิเจนในร่างกายมากพอ กุ้งจะมีโอกาสรอดตายมากขึ้นในระหว่างกระบวนการลอกคราบ รวมถึงมีผลต่อการเจริญเติบโตด้วย

2. การศึกษาผลของสารเมทิลโลโปรตีนต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงของกุ้งขาวแวนนาไมในห้องปฏิบัติการ

หลังจากการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมเป็นระยะเวลา 55 วัน พบว่ากุ้งชุดควบคุมที่ได้รับอาหารปกติ เลี้ยงในน้ำที่มีปริมาณออกซิเจนปกติ มีปริมาณเม็ดเลือดรวมสูงที่สุด (25.00 ± 2.40 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) กับกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมสารเมทิลโลโปรตีน แต่เลี้ยงในสภาวะออกซิเจนต่ำ ($24.22 \pm 2.91 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) แต่เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารเมทิลโลโปรตีน ในสภาวะออกซิเจนต่ำ พบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารผสมสารเมทิลโลโปรตีนมีค่าปริมาณเม็ดเลือดรวมเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับสารนี้ (19.74 ± 3.43 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (Table 2) (Jiang *et al.*, 2005) พบว่าในสภาวะขาดแคลนออกซิเจนจะมีผลให้สุขภาพกุ้งอ่อนแอ ระบบภูมิคุ้มกันซึ่งเกี่ยวข้องโดยตรงกับการทำงานของเม็ดเลือดจะลดลงและคงที่หลังจาก 24 ชั่วโมงและกลุ่มที่ได้รับออกซิเจนเพียงพอจะไม่มีเปลี่ยนแปลงของปริมาณเม็ดเลือดรวม

ในกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมและการผลิต superoxide dismutase พบว่ากุ้งกลุ่มควบคุมที่ได้รับอาหารปกติ ในสภาวะออกซิเจนปกติ มีค่ากระบวนการกลืนกินและการผลิต superoxide dismutase สูงที่สุด เท่ากับ $24.22 \pm 1.99\%$ และ 44.68 ± 3.26 หน่วย SOD/ มิลลิลิตร โดยไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) กับกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมสารเมทิลโลโปรตีน แต่เลี้ยงในสภาวะออกซิเจนต่ำ ($23.56 \pm 3.54\%$ และ 42.25 ± 4.59 หน่วย SOD/ มิลลิลิตร) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารเมทิลโลโปรตีนและอยู่ในสภาวะออกซิเจนต่ำ พบว่า กลุ่มที่ได้รับสารเมทิลโลโปรตีน มีกิจกรรมการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมและการผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase สูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับสารนี้และเลี้ยงในสภาวะออกซิเจนต่ำ ซึ่งมีค่าเท่ากับ $19.11 \pm 2.71\%$ และ 37.03 ± 3.35 หน่วย SOD/ มิลลิลิตร แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (Table 2) สอดคล้องกับการศึกษาของ Cheng *et al.* (2002) พบว่า เมื่อเลี้ยงกุ้งที่ระดับออกซิเจนสูง (7.75 และ 4.75 มิลลิกรัมต่อลิตร) จะไม่มีการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมภายหลังสิ้นสุดการทดลอง ที่ 72 ชั่วโมง แต่เมื่อเลี้ยงกุ้งที่ระดับออกซิเจนต่ำ (2.75 และ 1.75 มิลลิกรัมต่อลิตร) กระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับการเลี้ยงในออกซิเจนสูง ภายหลังการทดลองที่ 12 ชั่วโมง กุ้งที่อยู่ในสภาวะออกซิเจนต่ำ แต่ได้รับสารเมทิลโลโปรตีนปริมาณเม็ดเลือดรวมใกล้เคียงกับกุ้งที่เลี้ยงในสภาพที่มีออกซิเจนปกติ ซึ่งจะส่งผลต่อการทำงานในกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือด การผลิต superoxide dismutase จะเพิ่มขึ้น โดยหลังจากเกิดการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือด จะมีการนำออกซิเจนเข้าสู่เซลล์และเปลี่ยนเป็นสารที่ใช้ทำลายสิ่งแปลกปลอม โดยมี superoxide dismutase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาให้เกิดสารที่สามารถทำลายสิ่งแปลกปลอมได้ ดังนั้นเมื่อเม็ดเลือดรวมเพิ่มขึ้น กระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมจะเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ superoxide dismutase เพิ่มขึ้นด้วย

ในกระบวนการ phenoloxidase activating system กุ้งในกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมสารเมทิลโลโปรตีน ในสภาวะออกซิเจนต่ำ มีค่าปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase เท่ากับ 296.58 ± 28.73 หน่วย/นาที่/มิลลิกรัมโปรตีน ส่วนกลุ่มควบคุมที่ได้รับอาหารปกติ ในสภาวะออกซิเจนปกติเท่ากับ 287.04 ± 12.40 หน่วย/นาที่/มิลลิกรัมโปรตีน ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) และทั้ง 2 ชุดการทดลองนี้มีค่ามากกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับสารเมทิลโลโปรตีน ในสภาวะออกซิเจนต่ำซึ่งมีค่าเพียง 265.48 ± 17.05 หน่วย/นาที่/มิลลิกรัมโปรตีน แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (Table 2) สอดคล้องกับการศึกษาของ Cheng *et al.* (2002) พบว่า ในสภาวะออกซิเจนเพียงพอ กุ้งจะ

ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมเอนไซม์ phenoloxidase แต่เมื่อเลี้ยงกุ้งในสภาวะที่ออกซิเจนลดต่ำลงที่ 4.75, 2.75 และ 1.75 มิลลิกรัมต่อลิตร กุ้งจะมีกิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

Table 2 The immune parameters of *L. vannamei* of 55 days of feeding with metalloprotein

| parameter | 0 g metalloprotein /kg of the feed, normal oxygen | 1 g metalloprotein /kg of the feed, low oxygen | 0 g metalloprotein /kg of the feed, low oxygen |
|--|---|--|--|
| THC ($\times 10^6$ cells/ml) | 25.00 \pm 2.40 ^a | 24.22 \pm 2.91 ^a | 19.74 \pm 3.43 ^b |
| % phagocytosis | 24.22 \pm 1.99 ^a | 23.56 \pm 3.54 ^a | 19.11 \pm 2.71 ^b |
| Phenoloxidase activity (unit/min/ mg.protein) | 287.04 \pm 12.40 ^a | 296.58 \pm 28.73 ^a | 265.48 \pm 17.05 ^b |
| SOD activity (SOD unit/ml) | 44.68 \pm 3.26 ^a | 42.25 \pm 4.59 ^a | 37.03 \pm 3.35 ^b |
| bactericidal activity | 1:4 | 1:8 | 1:4 |

Average values with different letters in the same row are statistically significantly different ($P < 0.05$)

phenoloxidase เป็นเอนไซม์ในรูป active form ในกระบวนการ prophenoloxidase activating system เป็นกระบวนการที่สำคัญในการทำลายสิ่งแปลกปลอมและควบคุมการกระจายของเชื้อโรค โดยเริ่มจากการเกิดกระบวนการ degranulation จะหลั่งเอนไซม์ prophenoloxidase ซึ่งอยู่ในรูปที่ไม่สามารถทำงานได้ (inactive form) และถูกกระตุ้นให้เปลี่ยนเป็นเอนไซม์ phenoloxidase ซึ่งออกซิไดส์สารกลุ่มฟีนอลให้เป็นควิโนนและเกิดเมลานินซึ่งสามารถฆ่าเชื้อโรคและควบคุมการกระจายของเชื้อโรคได้ Moullac *et al.* (1998) พบว่า ปฏิกริยาของเอนไซม์ prophenoloxidase ในสัตว์กลุ่ม crustacean ลดลงเมื่ออยู่ในสภาวะเครียด ช่วงของการลอกคราบ (intermolt) และช่วงก่อนการลอกคราบ (premolts) สารเมทัลโลโปรตีนเป็นแหล่งของทองแดง ซึ่งเป็นองค์ประกอบของฮีโมไซยานิน ซึ่งมีหน้าที่ลำเลียงออกซิเจน กุ้งจะลำเลียงออกซิเจนได้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น ทำให้ทนต่อออกซิเจนที่ต่ำและระยะเวลาสั้นขึ้น ทำให้ลดปัจจัยความเครียด กุ้งจะมีภูมิคุ้มกันดีขึ้น เมื่ออยู่ในสภาวะออกซิเจนต่ำนานๆ กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้งพบว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารผสมสารเมทัลโลโปรตีน ในสภาวะออกซิเจนต่ำ มีค่าอัตราการเจาะจางต่ำที่สุดของซีรัมที่สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรีย 50 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 1:8 ซึ่งแตกต่างจากชุดที่ไม่ได้รับสารเมทัลโลโปรตีนซึ่งมีค่าเท่ากับ 1:4 ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า การเพิ่มขึ้นของระดับภูมิคุ้มกันกุ้งจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหรือระดับออกซิเจนที่อยู่ในตัวกุ้งเพราะกุ้งในกลุ่มที่ได้รับออกซิเจนปกติและกลุ่มที่ได้รับสารเมทัลโลโปรตีน จะมีปริมาณเม็ดเลือดรวม กระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดและการผลิต superoxide dismutase สูงกว่ากลุ่มที่ได้รับออกซิเจนต่ำ และที่ไม่ได้รับอาหารผสมสารเมทัลโลโปรตีน แสดงว่าสารเมทัลโลโปรตีนสามารถรักษาระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งเมื่ออยู่ในสภาวะออกซิเจนต่ำได้ ซึ่งสภาพเช่นนี้เกิดขึ้นในบ่อเลี้ยงกุ้งในช่วงท้ายๆของการเลี้ยง

จากผลการศึกษา Lee and Shiau (2002) พบว่า เมื่อให้อาหารผสมทองแดงกับกุ้ง *Penaeus monodon* ที่ระดับ 10-30 มิลลิกรัมทองแดงต่ออาหาร 1 กิโลกรัมกุ้งจะมีน้ำหนักตัว, ประสิทธิภาพการกินอาหาร, ปริมาณเม็ดเลือดรวมและอัตราการผลิต superoxide anion ดีกว่ากุ้งที่ได้รับอาหารผสมทองแดงที่ระดับมากกว่า 40 มิลลิกรัมทองแดงต่ออาหาร 1 กิโลกรัมและกลุ่มที่ไม่ได้รับอาหารผสมทองแดง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

Table 3 The water parameters of *L. vannamei* after 55 days of feeding with metalloprotein

| | | treatments | | | | | |
|-------------------|-----------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|------------------------|---------------------------|
| | | normal feed,normal oxygen | | metalloprotein,low oxygen | | normal feed,low oxygen | |
| คุณสมบัติของน้ำ | | range | average | range | average | range | average |
| water temperature | | | | | | | |
| (°C) | morning | 28.3-29.3 | 28.9±0.3 ^a | 28.6-29.3 | 28.6±0.4 ^a | 29.0-29.5 | 29.3±0.1 ^a |
| | afternoon | 28.8-30.1 | 29.5±1.2 ^a | 28.2-30.1 | 29.5±1.5 ^a | 28.2-30.3 | 28.9±1.1 ^a |
| pH | | | | | | | |
| | morning | 7.9-8.3 | 7.9±0.4 ^a | 8.1-8.5 | 8.4±0.1 ^a | 8.2-8.6 | 8.5±0.1 ^a |
| | afternoon | 8.0-8.5 | 8.3±0.4 ^a | 8.1-8.5 | 8.3±0.2 ^a | 8.3-8.5 | 8.4±0.1 ^a |
| dissolved oxygen | | | | | | | |
| (ml/l) | morning | 6.2-7.8 | 6.9±0.5 ^a | 3.0-3.9 | 3.5±1.0 ^a | 3.2-4.1 | 3.6±0.8 ^a |
| | afternoon | 5.9-7.8 | 6.8±1.0 ^a | 3.4-4.2 | 3.8±0.4 ^a | 3.5-4.1 | 3.7±0.3 ^a |
| salinity (ppt) | | 25.2-25.9 | 25.5±0.4 ^a | 25.3-25.9 | 25.5±0.1 ^a | 24.9-25.4 | 25.2±0.5 ^a |
| Conductivity | | | | | | | |
| (ml sement/cm) | | 42.0-47.4 | 42.6±1.0 ^a | 39.4-40.0 | 39.8±0.4 ^a | 39.1-40.2 | 39.8±0.5 ^a |
| alkalinity | | | | | | | |
| (mg/l) | | 85.3-139.2 | 97.8±27.0 ^a | 89.7-118.5 | 101.2±15.3 ^a | 91.1-119.9 | 109.3±12.6 ^a |
| hardness | | | | | | | |
| (mg/l) | | 4070.9-5850.3 | 19.7±1467.3 ^a | 4279.1-5473.0 | 4010±1098.7 ^a | 4339.7-5601.4 | 124.2±1002.6 ^a |
| total ammonia | | | | | | | |
| (mg/l) | | 0.2-0.8 | 0.5±0.1 ^a | 0.1-0.6 | 0.6±0.1 ^a | 0.3-0.6 | 0.4±0.1 ^a |
| nitrite | | | | | | | |
| (mg/l) | | 0.02-0.04 | 0.02±0.007 ^a | 0.02-0.03 | 0.02±0.009 ^a | 0.01-0.03 | 0.02±0.01 ^a |

Average values with different letters in the same row are statistically significantly different (P<0.05)

สรุป

กุ้งในชุดการทดลองที่ได้รับอาหารปกติและเลี้ยงในสภาวะออกซิเจนเพียงพอจะมีการเจริญเติบโตดีที่สุด และมีอัตราการรอดตายสูงสุดด้วย เมื่อพิจารณาการศึกษาทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง พบว่าปริมาณ เม็ดเลือดรวม, กระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมและการผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase มีค่าสูงกว่ากุ้ง ในชุดการทดลองที่เลี้ยงในสภาวะออกซิเจนต่ำ เนื่องจากกุ้งขาวเลี้ยงในสภาวะออกซิเจนปกติตลอดเวลา กุ้งจะมี สุขภาพดี กินอาหารในปริมาณปกติ และมีภูมิคุ้มกันที่ดีที่สุด แต่เมื่อพิจารณาค่ากิจกรรมเอนไซม์ phenoloxidase และกิจกรรมการทำลายแบคทีเรียในน้ำเลือด พบว่ากุ้งที่ได้รับสารเมทัลโลโปรตีนแต่เลี้ยงในสภาวะออกซิเจนต่ำ มี ค่าดีที่สุด ในสภาพบ่อเลี้ยงกุ้งปริมาณออกซิเจนจะลดลงในช่วงเดือนสุดท้าย เนื่องจากมีปริมาณการสะสมและ การย่อยสลายสารอินทรีย์โดยจุลินทรีย์ ทำให้การเจริญเติบโต การรอดตายและภูมิคุ้มกันลดต่ำลง ถ้าให้สาร

เมทิลโดโปรตีน การเจริญเติบโต การรอดตายและระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งที่อยู่ในสภาวะออกซิเจนต่ำจะมีค่าใกล้เคียงกับกุ้งที่เลี้ยงในสภาวะออกซิเจนปกติ ทำให้กุ้งสามารถต้านทานโรคได้ดีกว่ากุ้งที่ไม่ได้รับสารนี้และอยู่ในสภาวะออกซิเจนต่ำ

เอกสารอ้างอิง

- กิจการ ศุภมาตย์, อุษณีย์ เอกปณิธานพงศ์, Toshiaki Itami และ จิราพร เกษรจันทร์. 2543. ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ: I. เทคนิคในการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันโรคและองค์ประกอบเลือดในกุ้งกุลาดำ. ว. **สงขลานครินทร์. ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22 (ฉบับพิเศษ) : 567-580**
- ชลอ ลิ้มสุวรรณ และ พรเลิศ จันทรีรัชกุล. 2547. **อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย**. สนับสนุนการจัดการพิมพ์โดยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เพื่อเฉลิมพระเกียรติพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวภูมิพลอดุลยเดชเนื่องในวโรกาสพระราชพิธีมหามงคลเฉลิมพระชนมพรรษา 5 ธันวาคม พ.ศ. 2547. บริษัทเมจิک พับลิเคชันจำกัด. 206 น.
- บุญรัตน์ ประทุมชาติ. 2553. **ออกซิเจนขุมพลังของกุ้งขาวขุมทรัพย์ของผู้เลี้ยง**. ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา. ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากบริษัท ชีสเคม แอครีคัลเจอร์รัล จำกัด
- อนันต์ชัย เชื้ออนรรรม. 2542. **หลักการวางแผนการทดลอง**. ภาควิชาสถิติ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 350 น.
- Dallinger, R. 1997. The flow of copper through a terrestrial food chain. III. Selection of an optimum copper diet by isopods. *Oecologia* 30: 273-277.
- Itami, T., Y. Takahashi, E. Tsushihira, H. Igasu and M. Kondo. 1994. Enhancement of disease resistance of kuruma prawn *Penaeus japonicus* and increase in phagocytic activity of prawn hemocytes after oral administration of β -1,3-glucan (Scizophyllan), pp. 142-151. *In* Proceeding of the Third Asian Fisheries Forum Singapore 26-30 October 1992.
- Mangum, C.P. 1989. Oxygen transport in the blood, pp. 373-430. *In* L.H. Mantel (Ed). *The Biology of Crustacean. Internal Anatomy and Physiological Regulation* vol.5. Academic Press, New York.
- Moullac, G.L., C. Soyeux, D. Ansquer, J. Avarre and P. Levy and P. Levy. 1998. The effect of hypoxic stress on the immune response and resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Fish & shellfish Immunol.* 8: 621 – 629
- Soderhall, K. and L. Hall. 1984. Lipopolysaccharide induced activation of prophenoloxidase activating system in crayfish hemocyte lysate. *Biochem. Biophys Acta.* 797: 99-104