



บทความวิจัย

ผลของการเปลี่ยนแปลงปัจจัยสิ่งแวดล้อมบางประการและการติดเชื้อต่อองค์ประกอบเลือดและภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*)

Effects of some environmental changes and infections on haemato-immunological parameters of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)

นพดล สุกระกาญจน์

วท.ม. (วิทยาศาสตร์การประมง)

Noppadon Sukrakanchana

M.Sc. (Fisheries Science)

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ

Department of Biology, Faculty of Science, Thaksin University

กิจการ สุภมาตย์

Kidchakan Supamattaya

Dr.rer.nat. (Biologie)

ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

Department of Aquatic Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University

จรีพร เรืองศรี

วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ)

Jareeporn Ruangsri

M.Sc. (Biotechnology)

คณะเทคโนโลยีและการจัดการ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เขตการศึกษาสุราษฎร์ธานี

Faculty of Technology and Management, Prince of Songkla University, Suratthani Campus

คำสำคัญ : ปัจจัยสิ่งแวดล้อม, องค์ประกอบเลือดและภูมิคุ้มกัน, โรค, กุ้งกุลาดำ

Keywords : Environmental factors, Haemato-immunological parameters, Diseases, Black tiger shrimp, *Penaeus monodon*



Abstract

This research aimed to study effects of some environmental factors as stressful conditions, such as temperature, salinity, pH, dissolved oxygen content, ammonia concentration and alkalinity on some haemato-immunological parameters of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) rearing in earthen pond and under laboratory facility. Shrimp in laboratory exposed to stress conditions according to environmental changes. Artificial infections with luminous bacteria, *Vibrio harveyi*, white spot syndrome virus (WSSV) and yellow head virus (YHV) of shrimp were also carried out to assess the immunological responses of the shrimp. The investigated haemato-immunological parameters were: the total haemocyte count (THC), phenoloxidase (PO) activity, serum protein concentration, blood glucose, blood pH and clotting time. The results showed that shrimp exposed to stress agents from environmental changes and bacterial- or viral-infected shrimp exhibited significant decrease of THC, PO activity, serum protein concentration and blood glucose, compared to the controls. The decrease of such haemato-immunological parameters will increase the susceptibility of the shrimp to pathogens. Thus, shrimp always maintain a low level of alertness to pathogens and/or environmental change. In conclusion, among the investigated haemato-immunological parameters, THC, PO activity, serum protein concentration and blood glucose were the most sensitive parameters to stress and infection conditions and could be virtually incorporated in shrimp cultivation programs, as well valuable references of shrimp health status.

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของปัจจัยสิ่งแวดล้อมบางประการ ได้แก่ อุณหภูมิ ความเค็ม ความเป็นกรดด่าง ปริมาณออกซิเจนละลาย แอมโมเนีย และค่าความเป็นด่าง (alkalinity) ที่แตกต่างกันระหว่างสภาพการเลี้ยงในบ่อดิน (สภาพธรรมชาติ) และสภาพการทดลองในห้องปฏิบัติการ ที่มีผลต่อการตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ รวมทั้งเพื่อศึกษาผลของการติดเชื้อก่อโรคบางชนิด ได้แก่ แบคทีเรีย *Vibrio harveyi*, white spot syndrome virus (WSSV) และ yellow head virus (YHV) ต่อการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบเลือดและภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ ผลการศึกษาพบว่าทั้งปัจจัยความเครียด และการติดเชื้อจะมีผลโดยตรงต่อการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบเลือดและภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ โดยเฉพาะปัจจัยปริมาณเม็ดเลือดรวม (THC), ความว่องไวของเอนไซม์ phenoloxidase (PO activity), ปริมาณโปรตีนในน้ำเลือด (serum protein) และระดับน้ำตาลในเลือด โดยที่ค่าของปัจจัยเหล่านี้จะลดลงอย่างมีนัยสำคัญหลังจากที่กุ้งอยู่ในภาวะเครียด และสัมพันธ์กับความสามารถในการตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกันของกุ้ง ซึ่งจะนำไปสู่การยอมรับเชื้อก่อโรคต่างๆ ได้ หากกุ้งต้องอยู่ในสภาพแวดล้อมที่เป็นภาวะเครียดเป็นเวลานาน โดยสรุป ปัจจัยองค์ประกอบเลือดและภูมิคุ้มกันเหล่านี้สามารถใช้เป็นดัชนีที่บ่งชี้ภาวะเครียด (stress indicator) ที่เป็นผลจากปัจจัยสิ่งแวดล้อม และภาวะการติดเชื้อของกุ้งกุลาดำได้อย่างมีประสิทธิภาพ

บทนำ

อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลในประเทศไทยเป็นธุรกิจที่ให้ผลตอบแทนสูง โดยเฉพาะกุ้งกุลาดำ ได้กลายเป็นสินค้าเกษตรที่มีมูลค่าการส่งออกปีละหลายหมื่นล้านบาท มีการพัฒนาการเลี้ยงจากระบบดั้งเดิม (extensive system) ที่อาศัยภูมิปัญญาชาวบ้านมาเป็นระบบพัฒนา (intensive system) ที่ต้องอาศัยหลักวิชาการ และใช้เทคโนโลยีในกระบวนการผลิตและการจัดการ การเติบโตอย่างรวดเร็วของอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลได้ก่อให้เกิดปัญหาต่างๆ ติดตามมา ทั้งปัญหาล้างแวล้อม คุณภาพน้ำ และโดยเฉพาะปัญหาโรคระบาดซึ่งก่อให้เกิดความสูญเสียต่อเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งเมื่อเกิดปัญหาคูณภาพน้ำไม่เหมาะสม หรือเกิดโรคระบาดเกษตรกรมักจะให้ความสำคัญกับการใช้ยาปฏิชีวนะและสารเคมีต่างๆ ในการแก้ไขปัญหาดังกล่าว ซึ่งเป็นที่ทราบดีว่าการใช้ยาและสารเคมีมักก่อให้เกิดผลกระทบติดตามมาทั้งต่อตัวสัตว์น้ำ ผู้บริโภค และสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะปัญหาการตกค้างของยาและสารเคมีในสิ่งแวล้อม ผู้ประกอบการจึงพยายามค้นคว้าวิจัยเพื่อหาแนวทางที่เหมาะสมในการป้องกันและควบคุมโรค เพื่อลดการใช้ยาและสารเคมี และพบว่าความยั่งยืนของอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งทะเลในปัจจุบันขึ้นอยู่กับความสามารถในการควบคุมโรค และการจัดการสุขภาพของกุ้งของผู้ประกอบการเป็นหลัก ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งเพื่อนำมาใช้ประเมินสุขภาพของกุ้งมากขึ้น และปัจจัยทางด้านภูมิคุ้มกัน (immune parameters) ของกุ้ง ได้กลายเป็นชีวดัชนี (biomarkers) ที่มีประสิทธิภาพและมีความสัมพันธ์กับปัจจัยสิ่งแวดล้อมและการติดเชื้อของกุ้งโดยตรง

นอกจากนี้พบว่าข้อมูลทางด้านสรีรวิทยาและภูมิคุ้มกันของกุ้งที่สัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมและการเกิดโรคยังเป็นเครื่องมือสำคัญที่จะช่วยให้เกษตรกรสามารถทราบถึงสภาวะของสุขภาพกุ้งในบ่อเลี้ยงล่วงหน้า ก่อนที่จะเกิดการระบาดของโรค และสามารถใช้เป็นแนวทางในการป้องกันการเกิดโรคที่จะตามมาได้

อย่างไรก็ตามข้อมูลดังกล่าวยังมีอยู่อย่างจำกัด และส่วนใหญ่เป็นข้อมูลของกุ้งในสภาพของการทดลองในห้องปฏิบัติการ มากกว่าข้อมูลจากสภาพของบ่อเลี้ยงเป้าหมายของการวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งเน้นที่การศึกษาเปรียบเทียบผลของปัจจัยสิ่งแวดล้อมบางประการ ได้แก่ อุณหภูมิ ความเค็ม ปริมาณออกซิเจนละลาย แอมโมเนีย และค่าความเป็นด่าง (alkalinity) ที่แตกต่างกันระหว่างสภาพการเลี้ยงในบ่อดิน (สภาพธรรมชาติ) และสภาพการทดลองในห้องปฏิบัติการ ที่อาจมีผลต่อการตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ รวมทั้งการศึกษาผลของการติดเชื้อก่อโรคบางชนิด ได้แก่ แบคทีเรีย *Vibrio harveyi*, white spot syndrome virus (WSSV) และ yellow head virus (YHV) ต่อการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบเลือดและภูมิคุ้มกันของกุ้ง ได้แก่ ปริมาณเม็ดเลือดรวม (total haemocyte counts, THC), ปฏิกริยาของเอนไซม์ phenoloxidase, โปรตีนในน้ำเลือด (serum protein), ปริมาณน้ำตาลในเลือด (blood glucose), ค่าความเป็นกรด-ด่าง (blood pH) และการแข็งตัวของเลือด (clotting time)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. สัตว์ทดลองและการวางแผนการทดลอง

ใช้กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) จากฟาร์มในจังหวัดตรัง สงขลา และปัตตานี ขนาดอายุ 60 วัน (น้ำหนักเฉลี่ย 5.74 กรัม) และขนาดอายุ 120 วัน (น้ำหนักเฉลี่ย 17.24 กรัม) โดยแบ่งกุ้งออกเป็น 2 ชุด

ชุดที่ 1 สำหรับการศึกษาองค์ประกอบเลือดและภูมิคุ้มกันของกุ้งที่อยู่ในสภาพของการเลี้ยงในบ่อดิน นำกุ้งตัวอย่างมาเก็บเลือดเพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบเลือดและภูมิคุ้มกัน โดยดำเนินการทันทีภายในฟาร์ม

ชุดที่ 2 สำหรับการศึกษาองค์ประกอบเลือดและภูมิคุ้มกันของกุ้งที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการ และผลของการติดเชื้อต่อองค์ประกอบเลือดและภูมิคุ้มกัน โดยลำเลียงตัวอย่างกุ้งทั้งสองกลุ่มอายุจากฟาร์ม มาเลี้ยงในบ่อซีเมนต์ของโรงเพาะฟัก ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัย

สงขลานครินทร์ พักงัดไว้ประมาณ 2 สัปดาห์ เพื่อให้กุ้งคุ้นเคยกับสภาพการทดลอง (acclimatization) ให้อาหารปกติวันละ 3 มื้อ ก่อนดำเนินการชักนำให้มีการติดเชื้อ และเก็บเลือดเพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบเลือดและภูมิคุ้มกันของกุ้งภายใต้สภาวะการเลี้ยงในห้องปฏิบัติการต่อไป

2. การตรวจสอบภาวะการติดเชื้อของกุ้งในบ่อเลี้ยง

ตัวอย่างกุ้งจากบ่อเลี้ยงที่นำมาใช้ในการศึกษาทดลองจะต้องเป็นกุ้งสุขภาพดี ดังนั้นเพื่อให้แน่ใจว่าเป็นกุ้งปลอดเชื้อก่อนโรครจะต้องมีการตรวจสอบการติดเชื้อ โดยนำกุ้งตัวอย่างมาตรวจสอบการติดเชื้อ 3 ชนิด ได้แก่ แบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio*, ไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV) และไวรัสหัวเหลือง (YHV) ณ ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การตรวจสอบการติดเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* จะเก็บตัวอย่างตับ (hepatopancreas) ของกุ้งกลาดำมาซึ่งน้ำหนัก และเชยเชียบอาหาร Thiosulphate citrate bile salt agar (TCBS) ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการคัดเลือกแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นับจำนวนเชื้อที่เจริญบนอาหารคำนวณปริมาณเชื้อต่อกรัมของน้ำหนักตับ โดยกุ้งสุขภาพดีจะต้องมีปริมาณเชื้อไม่เกิน 10⁴ โคโลนีต่อกรัมของตับ (Brock and Main, 1994)

การตรวจสอบการติดเชื้อ WSSV และ YHV จะใช้เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) และ Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) ตามลำดับ ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Takahashi และคณะ (1996) และ Tang และ Lightner (1999) โดยกุ้งที่นำมาทดลองจะต้องปลอดเชื้อ WSSV และ YHV จากการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR

3. การชักนำการติดเชื้อในกุ้งสำหรับชุดทดลองในห้องปฏิบัติการ

กุ้งกลาดำชุดทดลองในห้องปฏิบัติการจะถูกชักนำให้เกิดการติดเชื้อก่อโรค 3 ชนิด คือ แบคทีเรียเรืองแสง (*Vibrio harveyi*), white spot syndrome virus

(WSSV) หรือ yellow head virus (YHV) เพื่อศึกษาผลของการติดเชื้อต่อการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบเลือดและภูมิคุ้มกัน ชักนำให้มีการติดเชื้อมีวิธีการดังนี้

แบคทีเรีย นำเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียเรืองแสง *Vibrio harveyi* ที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar (TSA) ผสมเกลือแกง 1.5% ที่อุณหภูมิ 35 °C ประมาณ 20-24 ชั่วโมง มาละลายในน้ำเกลือ 1.5% และปรับให้สารละลายเชื้อ (bacterial suspension) มีความเข้มข้นของเชื้อ ประมาณ 10⁶ เซลล์/มิลลิลิตร (cells/ml) นำมาฉีดเข้าบริเวณกล้ามเนื้อกุ้งปล้องที่ 6 ปริมาตรตัวละ 0.1 มิลลิลิตร (ml) จำนวน 50 ตัว ส่วนชุดควบคุมฉีดด้วยน้ำเกลือ 1.5% ในปริมาตรเท่ากัน

ไวรัส เชื้อไวรัสที่นำมาใช้ในการทดลองครั้งนี้คือ white spot syndrome virus (WSSV) และ yellow head virus (YHV) ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ นำสารละลายเชื้อไวรัสที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C มาเจือจางด้วย phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 โดยเจือจางเชื้อไวรัส WSSV และ YHV ให้มีความเข้มข้นที่ระดับ 1:10⁶ และ 1:10⁵ ตามลำดับ แล้วนำเชื้อไวรัสที่เจือจางแล้วมาฉีดเข้ากุ้งทดลอง จำนวน 50 ตัว ตัวละ 0.1 ml ส่วนชุดควบคุมฉีดด้วย PBS ในปริมาตรเท่ากัน

หลังจากการฉีดเชื้อเป็นเวลา 3, 7 และ 14 วัน ทำการตรวจสอบระดับของการติดเชื้อก่อโรคชนิดต่างๆ ในกุ้งทดลองตามวิธีการข้างต้น เพื่อให้แน่ใจว่ากุ้งมีการติดเชื้อ จึงทำการเก็บตัวอย่างเลือด เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบเลือดและภูมิคุ้มกันต่อไป

4. การวิเคราะห์องค์ประกอบเลือดและภูมิคุ้มกัน

- ปริมาณเม็ดเลือดทั้งหมด (total haemocyte count, THC)

วิเคราะห์ปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งตามวิธีการของกิจการและสิทธิ (2538) โดยดูดเลือดกุ้งจากบริเวณโคนขาเดิน โดยใช้เข็มขนาด 25G นำเลือดที่ได้จากกุ้งแต่ละตัวมาเจือจางด้วยสารละลายของสีย้อม

trypan blue เข้มข้น 1% ในสารละลายกลีโกล 1.5% ในอัตราส่วน 1:100 นับปริมาณเม็ดเลือดทั้งหมดโดยใช้ haemocytometer คำนวณปริมาณเม็ดเลือดที่นับได้ในหน่วยเซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร (cells/mm³)

- ปฏิริยาของเอนไซม์ phenoloxidase

วิเคราะห์ปฏิริยาของเอนไซม์ phenoloxidase ในเลือดกุ้งกุลาดำ โดยดูดเลือดกุ้งผสมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ K-199 ที่มี 4% L-cysteine เป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (anticoagulant) ผสมอยู่ จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,500 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 2 นาที นำเฉพาะส่วนของเม็ดเลือดมาเติม cacodylate buffer (pH 7.4) ปริมาตร 1 ml นำไปแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) แล้วทำให้เซลล์แตกโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที แยกเฉพาะสารละลายส่วนไซ (haemocyte lysate, HLS) นำ HLS มาวิเคราะห์ปฏิริยาของเอนไซม์ phenoloxidase ตามวิธีการของ Smith และ Soderhall (1983) คำนวณค่า activity ของเอนไซม์ phenoloxidase ซึ่งมีหน่วยเป็น unit/min โดยที่ 1 unit คือความสามารถของเอนไซม์ phenoloxidase ที่สามารถเปลี่ยน L-DOPA ไปเป็น dopamine ซึ่งวัดได้จากการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้น 0.001 หน่วย

- ปริมาณโปรตีนในน้ำเลือด (serum protein)

วิเคราะห์โปรตีนในน้ำเลือดตามวิธีการของ Lowry และคณะ (1951) และคำนวณความเข้มข้นของโปรตีนในตัวอย่าง โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของโปรตีนมาตรฐาน (standard albumin) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ความเข้มข้นของโปรตีนจะรายงานในหน่วยมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (mg/ml)

- ปริมาณน้ำตาลในเลือด (blood glucose)

วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในเลือดตามวิธีการของ Hyvarinen และ Nikkila (1962) และคำนวณความเข้มข้นของกลูโคสในตัวอย่าง โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของกลูโคสมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

กัน ความเข้มข้นของน้ำตาลในเลือดจะรายงานในหน่วยมิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ (mg%)

- ความเป็นกรด-ด่างของน้ำเลือด (blood pH)

วัดค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำเลือดกุ้งแต่ละตัวโดยใช้เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (micro pH meter)

- การแข็งตัวของเลือด (clotting time)

การหาค่า clotting time ของเลือดกุ้งกุลาดำจะทำการเก็บตัวอย่างเลือดกุ้งปริมาตรประมาณ 300 ไมโครลิตร โดยไม่ผสม anticoagulant บรรจุเลือดลงในหลอด microcentrifuge tube และจับเวลาทันทีที่ตรวจสอบการแข็งตัวของเลือดโดยสังเกตการเปลี่ยนสภาพไปเป็นวุ้น (gelation) ของเลือดในหลอดทุกๆ 20 วินาที จนครบ 2 นาที บันทึกเวลาที่เลือดแข็งตัว

5. การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

แต่ละครั้งที่ทำการเก็บตัวอย่างกุ้งทั้งในบ่อดินและชุดทดลองในห้องปฏิบัติการ จะเก็บตัวอย่างน้ำเพื่อนำมาวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพและเคมี ได้แก่ อุณหภูมิ ความเค็ม ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ปริมาณออกซิเจนละลาย ค่าความเป็นด่าง (alkalinity) และแอมโมเนียตามวิธีการของ Boyd และ Tucker (1992) เพื่อใช้เป็นดัชนีกำหนดการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมของกุ้งที่นำมาเลี้ยงภายใต้สภาพการทดลอง

6. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยขององค์ประกอบเลือดและภูมิคุ้มกันในแต่ละชุดการทดลองจะใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-Way ANOVA)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

1. การศึกษาองค์ประกอบเลือดและภูมิคุ้มกันของกุ้งที่เลี้ยงในบ่อดินและห้องปฏิบัติการ

ผลการศึกษาอิทธิพลของการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมในการเลี้ยง โดยเฉพาะปัจจัยคุณภาพน้ำทั้งทางกายภาพและเคมีที่อาจส่งผลกระทบต่อภาวะเครียดของกุ้งกุลาดำ

โดยทำการวิเคราะห์องค์ประกอบเลือดและภูมิคุ้มกัน (haemato-immunological parameters) ในเชิงเปรียบเทียบระหว่างกุ้งที่เลี้ยงในสภาพธรรมชาติ (บ่อดิน) และกุ้งที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการซึ่งเป็นกุ้งชุดเดียวกัน เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยคุณภาพน้ำที่เปลี่ยนแปลงไปจากสภาพธรรมชาติที่อาจมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบเลือดและภูมิคุ้มกัน พบว่าปัจจัยคุณภาพน้ำ ได้แก่ อุณหภูมิที่ลดลง ความเค็มของน้ำที่เพิ่มขึ้น ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และความต้องการด่าง (alkalinity) ที่ลดลง หรือปริมาณแอมโมเนีย และออกซิเจนละลายในน้ำที่เพิ่มขึ้นในสภาพของการเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ (ตารางที่ 1) จะส่งผลโดยตรงต่อการเปลี่ยนแปลงขององค์

ประกอบเลือดและภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำทั้งสองกลุ่มอายุ คือ 60 และ 120 วัน อย่างน้อย 3 ปัจจัย ได้แก่ ปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้ง (THC) ปรากฏิยาของเอนไซม์ phenoloxidase และปริมาณน้ำตาลในเลือด (blood glucose) เมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งที่เลี้ยงในบ่อดิน และพบว่าไม่มีความแตกต่างกันของทุกค่าองค์ประกอบเลือดและภูมิคุ้มกันระหว่างกุ้งกุลาดำที่อายุ 60 และ 120 วัน (ตารางที่ 2) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาของกิจการและคณะ (2543a) ที่พบว่าปริมาณเม็ดเลือดรวม ปรากฏิยาของเอนไซม์ phenoloxidase ปริมาณโปรตีนในซีรัม และปริมาณน้ำตาลในเลือดของกุ้งกุลาดำ ไม่ขึ้นอยู่กับเพศ และขนาดของกุ้ง ยกเว้นวงจรการลอกคราบ

ตารางที่ 1 คุณภาพน้ำของบ่อดินและห้องปฏิบัติการ

ปัจจัยคุณภาพน้ำ	บ่อดิน	ห้องปฏิบัติการ
Temperature (°C)	28 - 30	27 - 28
Salinity (ppt)	5 - 7	10 - 15
pH	8.64 - 9.17	8.12 - 8.53
Alkalinity (ppm)	82 - 93	68 - 73
Ammonia-N (ppm)	0.6 - 1.2	1.43 - 1.76
Dissolved oxygen (ppm)	5.34 - 6.83	7.82 - 8.94

ตารางที่ 2 องค์ประกอบเลือดและภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในบ่อดินและห้องปฏิบัติการ

องค์ประกอบเลือดและภูมิคุ้มกัน	กุ้งที่เลี้ยงในบ่อดิน		กุ้งที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการ	
	อายุ 60 วัน (n=40)	อายุ 120 วัน (n=40)	อายุ 60 วัน (n=40)	อายุ 120 วัน (n=40)
THC (10^4 cells/mm ³)	5.53 ± 1.79 ^a	4.55 ± 0.65 ^a	2.89 ± 1.17 ^b	3.54 ± 0.86 ^b
PO activity (unit/min/mg-protein)	125.8 ± 26.0 ^a	150.0 ± 25.4 ^a	35.6 ± 6.8 ^b	43.8 ± 18.6 ^b
Serum protein (mg/ml)	109.5 ± 14.5 ^a	112.9 ± 12.8 ^a	125.4 ± 14.8 ^a	126.5 ± 15.2 ^a
Blood glucose (mg%)	33.7 ± 5.5 ^a	42.1 ± 8.75 ^a	72.1 ± 8.2 ^b	65.2 ± 9.0 ^b
Blood pH	7.22 ± 0.10 ^a	7.23 ± 0.09 ^a	7.30 ± 0.09 ^a	7.21 ± 0.07 ^a
Clotting time (second)	20	20	20	20

Values (mean ± S.D.) followed by the same letter in a row do not differ significantly at $P = 0.05$



การศึกษาการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบเลือด และภูมิคุ้มกันได้มีรายงานในกุ้งกลุ่ม penaeid หลายชนิด เช่น *Penaeus stylirostris* ที่อยู่ในสภาวะที่มีออกซิเจนละลายต่ำ (Le Moullac *et al.*, 1998) หรือระหว่างการลอกคราบ (Le Moullac *et al.*, 1997) หรือในกุ้งญี่ปุ่น *P. japonicus* (Hennig *et al.*, 1998) และกุ้งกุลาดำ *P. monodon* (Sritunyalucksana *et al.*, 1999) มีการศึกษาการกระตุ้นปัจจัยทางด้านภูมิคุ้มกันที่สัมพันธ์กับการติดเชื้อไวรัส หรือหลังจากการให้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน รวมถึงในกุ้ง *Litopenaeus setiferus* ที่มีรายงานเกี่ยวกับผลของความเครียด (stress) ต่อองค์ประกอบเลือด และปัจจัยทางภูมิคุ้มกัน (Sanchez *et al.*, 2001) และรายงานส่วนใหญ่พบว่าปัจจัยทางด้านภูมิคุ้มกันที่อ่อนไหวต่อการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อมมากที่สุด คือ ปริมาณเม็ดเลือดรวม (THC) เช่นเดียวกับผลจากการศึกษาครั้งนี้พบว่ากุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการจะมี THC ลดลงถึง 22 - 47% เมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งที่เลี้ยงในบ่อดิน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในกุ้ง *Farfantepenaeus paulensis* ที่พบว่า การเปลี่ยนแปลงของความเค็มจะทำให้กุ้งมีปริมาณเม็ดเลือดรวมลดลงถึง 40% ภายในเวลา 2 สัปดาห์ (Perazzolo, *et al.*, 2002) หรือ THC ของกุ้ง *L. setiferus* จะลดลงถึง 43% หลังจากนำมาเลี้ยงที่อุณหภูมิ 27°C เป็นเวลา 7 วัน เมื่อเทียบกับ THC ของกุ้งที่จับมาใหม่ ๆ (Sanchez *et al.*, 2001) กิจการและคณะ (2543b) ได้รายงานปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°C จะมีค่าสูงกว่าที่อุณหภูมิ 25°C ประมาณ 35% แต่จากรายงานการศึกษาผลของแอมโมเนียที่ระดับความเข้มข้น ต่าง ๆ ตั้งแต่ 0, 1.10, 5.24, 11.10 และ 21.60 mg/l ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของ THC ในกุ้งขาว *L. vannamei* อย่างมีนัยสำคัญ (Liu and Chen, 2004)

เซลล์เม็ดเลือดกุ้งจะมีบทบาทโดยตรงเกี่ยวข้องกับการตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ (cellular immune reaction) ของกุ้ง รวมทั้งเป็นบริเวณที่จะมีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารน้ำ

อื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกัน (Gross *et al.*, 2001) ดังนั้นการลดลงของ THC เป็นระยะเวลานานของกุ้งที่เลี้ยงเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยสิ่งแวดล้อม จะทำให้กุ้งมีความต้านทานโรคลดลง และยอมรับเชื้อก่อโรคได้ง่ายขึ้น

ผลจากการศึกษาครั้งนี้พบว่ากุ้งที่นำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการยังมีปฏิกิริยาของเอนไซม์ phenoloxidase ลดลงประมาณ 70% ทั้งนี้สัมพันธ์กับปริมาณเม็ดเลือดที่ลดลง เนื่องจากมีรายงานชัดเจนว่ามากกว่า 90% ของเอนไซม์ phenoloxidase จะพบอยู่ในเม็ดเลือดกุ้ง และประมาณ 10% พบในส่วนของน้ำเลือด (Perazzolo and Barracco, 1997) ดังนั้นเมื่อกุ้งมีปริมาณเม็ดเลือดลดลง จึงส่งผลให้ความว่องไวหรือปริมาณของเอนไซม์ phenoloxidase ลดลงด้วย อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานว่าปัจจัยสิ่งแวดล้อมจะมีผลโดยตรงต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase นอกจากรายงานของ Liu and Chen (2004) ที่พบว่ากุ้งขาว *L. vannamei* ที่อยู่ในน้ำที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียสูงกว่า 5.24 mg/ml หลังจาก 7 วัน จะมี phenoloxidase activity ลดลง ประมาณ 20% ในขณะที่ปริมาณเม็ดเลือดรวมไม่เปลี่ยนแปลงระบบ proPO ของกุ้งจะเกี่ยวข้องกับการแตกของเซลล์เม็ดเลือด (degranulation) จากการกระตุ้นด้วยสารประกอบของผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ต่างๆ หลังจากการติดเชื้อ แต่การวัดความว่องไวของเอนไซม์ phenoloxidase ในหลอดทดลองจะกระตุ้นโดยใช้ trypsin

ระดับน้ำตาลในเลือด (blood glucose) สามารถใช้เป็นดัชนีที่บ่งบอกถึงสภาวะเครียดของกุ้งได้ดี จากการศึกษานี้พบว่าปริมาณน้ำตาลในเลือดของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการจะมีค่าสูงกว่ากุ้งที่เลี้ยงในบ่อดินประมาณ 55 - 114% สอดคล้องกับรายงานของกิจการและคณะ (2543d) ที่พบว่ากุ้งที่เลี้ยงในสภาวะเครียดในห้องปฏิบัติการจะมีระดับของน้ำตาลในเลือดสูงขึ้นประมาณ 40% ทั้งนี้เป็นผลโดยตรงมาจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม นอกจากนี้ยังมีรายงานในกุ้งกุลาดำที่อยู่

ในภาวะที่มีออกซิเจนละลายในน้ำค่อนข้างต่ำจะมีปริมาณน้ำตาลในเลือดสูงขึ้น (Hall and van Ham, 1998)

ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่า การเปลี่ยนแปลงของปัจจัยสิ่งแวดล้อมไม่มีผลต่อปริมาณโปรตีนในน้ำเลือด ค่าความเป็นกรด-ด่าง และเวลาที่ใช้ในการแข็งตัวของเลือด กุ้งกุลาดำ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาในกุ้งกุลาดำของกิจการและคณะ (2543b) ที่พบว่าโปรตีนในน้ำเลือด และ pH ของน้ำเลือดมีค่าเฉลี่ยที่ไม่แตกต่างกันระหว่างกุ้งที่เลี้ยงในบ่อดิน และกุ้งที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ทั้งนี้เนื่องจากในสภาพปกติระบบสรีรวิทยาของสิ่งมีชีวิตจะมีการปรับตัวเพื่อรักษาสมาดุลของ pH ในเลือดให้คงที่ อย่างไรก็ตามยังมีบางรายงานที่ยืนยันว่าปัจจัยสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะความเค็มที่ลดลง หรือปริมาณแอมโมเนียที่เพิ่มขึ้น รวมทั้งภาวะเครียดอื่นๆ มีผลทำให้ปริมาณโปรตีนในเลือดกุ้งลดลงได้ (Chen *et al.*, 1994; Chen and Cheng, 1995; Perazzolo *et al.*, 2002) นอกจากนี้จากการศึกษาในกุ้ง western rock lobster ยังพบว่าปัจจัยความเครียดมีส่วนสำคัญที่ทำให้เวลาที่ใช้ในการแข็งตัวของเลือด (clotting time) ลดลงทั้งๆ ที่กุ้งกลุ่มดังกล่าวมี THC ลดลง (Jussila *et al.*, 2001) ซึ่งอาจจะมีความเป็นไปได้ที่ clotting time ของกุ้งอาจจะสัมพันธ์กับปัจจัยอื่น ๆ นอกเหนือจาก clotting proteins ที่ถูกปล่อยออกมาพร้อมกับการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือด

2. การศึกษาผลของการติดเชื้อต่อองค์ประกอบเลือดและภูมิคุ้มกัน

จากการศึกษาผลของการติดเชื้อก่อโรคที่สำคัญ 3 ชนิด ได้แก่ แบคทีเรีย *V. harveyi*, ไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV) และไวรัสหัวเหลือง (YHV) ต่อองค์ประกอบเลือดและภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำทั้งสองกลุ่มอายุ (60 และ 120 วัน) ในห้องปฏิบัติการ พบว่ากุ้งกุลาดำทั้งสองกลุ่มอายุมีการตอบสนองต่อการติดเชื้อทั้งสามชนิดเป็นไปในทิศทางเดียวกัน กล่าวคือทุกองค์ประกอบเลือดและภูมิคุ้มกันที่ตรวจวัดมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกุ้งในกลุ่มควบคุม ยกเว้นความเป็นกรดต่าง (pH) ของ

เลือดกุ้งที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลง นอกจากนี้ยังพบว่าเวลาที่ใช้ในการแข็งตัวของเลือด (blood clotting) ของกุ้งที่ติดเชื้อทั้งสามชนิดยังเพิ่มขึ้นอีกด้วย

โดยที่กุ้งอายุ 60 วัน ที่ติดเชื้อ *V. harveyi*, WSSV และ YHV มีปริมาณของเม็ดเลือดรวมลดลง 35%, 70% และ 50% ตามลำดับ PO activity ลดลง 34%, 89% และ 84% ตามลำดับ โปรตีนในน้ำเลือดลดลง 12%, 22% และ 15% ตามลำดับ ปริมาณน้ำตาลในเลือดลดลง 63%, 71% และ 65% ตามลำดับ และเวลาที่ใช้ในการแข็งตัวของเลือดของกุ้งทดลองส่วนใหญ่เพิ่มขึ้นเป็น 40 วินาที ในขณะที่กุ้งปกติส่วนใหญ่มีค่า clotting time 20 วินาที ส่วนกุ้งอายุ 120 วัน ที่ติดเชื้อ *V. harveyi*, WSSV และ YHV มีปริมาณของเม็ดเลือดรวมลดลง 28%, 58% และ 67% ตามลำดับ PO activity ลดลง 27%, 37% และ 33% ตามลำดับ โปรตีนในน้ำเลือดลดลง 18%, 32% และ 21% ตามลำดับ ปริมาณน้ำตาลในเลือดลดลง 74%, 58% และ 48% ตามลำดับ และเวลาที่ใช้ในการแข็งตัวของเลือดของกุ้งทดลองส่วนใหญ่เพิ่มขึ้นเป็น 120 วินาที ในขณะที่กุ้งปกติส่วนใหญ่มีค่า clotting time 20 วินาที (ตารางที่ 3 และ 4)

ผลการศึกษาพบว่า การติดเชื้อโดยเฉพาะเชื้อไวรัส WSSV และ YHV จะสัมพันธ์กับการลดลงของปริมาณเม็ดเลือดรวม และ PO activity ในสัดส่วนที่สูงมากเมื่อเทียบกับกุ้งปกติ สอดคล้องกับรายงานของกิจการและคณะ (2543d) ที่พบว่ากุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง หรือไวรัสตัวแดงดวงขาวจะมีปริมาณเม็ดเลือดรวม และ PO activity ลดลงสูงสุดถึง 82% และ 68% ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากการที่ไวรัสหัวเหลืองจะเข้าไปเพิ่มจำนวนในเซลล์เม็ดเลือดโดยตรง เป็นผลให้เกิดการตายของเซลล์เม็ดเลือด ในขณะที่มีหลักฐานว่า WSSV สามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อในเนื้อเยื่อที่ทำหน้าที่ผลิตเม็ดเลือด (haematopoietic tissue) ของกุ้ง (Supamattaya *et al.*, 1994; Supamattaya, *et al.*, 1998)

ตารางที่ 3 องค์ประกอบเลือดและภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำอายุ 60 วัน ที่ถูกชักนำให้มีการติดเชื้อในห้องปฏิบัติการ

องค์ประกอบเลือดและภูมิคุ้มกัน	กุ้งที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการ อายุ 60 วัน			
	กลุ่มควบคุม	กลุ่มติดเชื้อ <i>V. harveyi</i>	กลุ่มติดเชื้อ WSSV	กลุ่มติดเชื้อ YHV
THC (10^4 cells/mm ³)	5.93 ± 1.79 ^a	3.87 ± 1.92 ^b	1.77 ± 0.84 ^b	2.95 ± 2.23 ^b
PO activity (unit/min/mg-protein)	45.6 ± 5.6 ^a	30.0 ± 3.7 ^b	5.2 ± 1.3 ^b	7.1 ± 1.6 ^b
Serum protein (mg/ml)	125.4 ± 14.84 ^a	110.5 ± 15.7 ^b	97.8 ± 17.7 ^b	107.1 ± 14.3 ^b
Blood glucose (mg%)	72.11 ± 8.21 ^a	26.96 ± 2.19 ^b	20.58 ± 8.2 ^b	25.56 ± 7.99 ^b
Blood pH	7.30 ± 0.09 ^a	7.36 ± 0.12 ^a	7.27 ± 0.15 ^a	7.27 ± 0.08 ^a
Clotting time (second)	20	40	40	40

Values (mean ± S.D.) followed by the same letter in a row do not differ significantly at $P = 0.05$

ตารางที่ 4 องค์ประกอบเลือดและภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำอายุ 120 วัน ที่ถูกชักนำให้มีการติดเชื้อในห้องปฏิบัติการ

องค์ประกอบเลือดและภูมิคุ้มกัน	กุ้งที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการ อายุ 120 วัน			
	กลุ่มควบคุม	กลุ่มติดเชื้อ <i>V. harveyi</i>	กลุ่มติดเชื้อ WSSV	กลุ่มติดเชื้อ YHV
THC (10^4 cells/mm ³)	4.05 ± 2.58 ^a	2.93 ± 1.81 ^b	1.72 ± 0.13 ^b	1.32 ± 0.94 ^b
PO activity (unit/min/mg-protein)	53.87 ± 8.64 ^a	39.36 ± 5.80 ^b	33.67 ± 9.08 ^b	36.32 ± 4.94 ^b
Serum protein (mg/ml)	137.46 ± 16.09 ^a	112.56 ± 13.72 ^b	92.79 ± 17.75 ^b	109.08 ± 14.32 ^b
Blood glucose (mg%)	65.12 ± 9.02 ^a	16.95 ± 2.57 ^b	27.10 ± 5.33 ^b	34.02 ± 3.62 ^b
Blood pH	7.21 ± 0.07 ^a	7.25 ± 0.07 ^a	7.11 ± 0.14 ^a	7.20 ± 0.28 ^a
Clotting time (second)	20	120	120	120

Values (mean ± S.D.) followed by the same letter in a row do not differ significantly at $P = 0.05$

จากการศึกษาในกุ้งขาว *L. vannamei* พบว่าการติดเชื้อ Taura syndrome virus มีผลทำให้ปริมาณเม็ดเลือดรวมลดลงถึง 79% (Song *et al.*, 2003) หรือการศึกษาในกุ้งกุลาดำ *P. monodon* และกุ้งญี่ปุ่น *P. japonicus* ที่ติดเชื้อ WSSV ก็ให้ผลการศึกษาในลักษณะเดียวกัน (Hennig *et al.* 1998; Chang *et al.*, 1999) ซึ่งพบว่าการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือด

(haemocyte lysis) การสร้างเซลล์ทดแทนในเนื้อเยื่อที่มีการติดเชื้อ การเกิดโนดูล (nodule formation) หรือการขัดขวางกระบวนการสร้างเซลล์เม็ดเลือด (haematopoiesis) ระหว่างการติดเชื้อจะสัมพันธ์กับการลดลงของ THC โดยตรง (Song *et al.*, 2003) นอกจากนี้การศึกษาก่อนหน้านี้ยังพบว่าเปอร์เซ็นต์การลดลงของปริมาณเม็ดเลือดและ PO activity ของกุ้งอายุ 120



วัน อยู่ในสัดส่วนที่ต่ำกว่าของกุ้งอายุ 60 วัน จึงมีความเป็นไปได้ที่ภูมิคุ้มกันที่เกี่ยวข้องกับเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งขนาดใหญ่จะมีความสามารถในการตอบสนองต่อการติดเชื้อทั้งสามชนิดได้ดีกว่ากุ้งขนาดเล็ก

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าระหว่างการติดเชื้อทั้งสามชนิด กุ้งกุลาดำจะมีปริมาณของโปรตีนในน้ำเลือดลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งสัมพันธ์กับการต้องใช้เวลานานขึ้นในการแข็งตัวของเลือด ทั้งนี้เนื่องจากโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการแข็งตัวของเลือด (clottable proteins) จะถูกปลดปล่อยออกมาขณะที่มีการแตกของเม็ดเลือดเนื่องจากการถูกกระตุ้นด้วยเชื้อก่อโรคระหว่างการติดเชื้อ ดังนั้นเมื่อปริมาณของเม็ดเลือดลดลงก็จะส่งผลต่อปริมาณของโปรตีนในเลือดด้วย สอดคล้องกับการศึกษาในกุ้งขาว *L. vannamei* ที่พบว่า การติดเชื้อ Taura syndrome virus (TSV) มีผลทำให้ปริมาณโปรตีนในเลือดลดลง 56% และ clottable proteins ลดลงถึง 80% และเลือดของกุ้งที่ติดเชื้อยังมีการแข็งตัวค่อนข้างช้า (poor coagulate) อีกด้วย (Song *et al.*, 2003) กุ้งขนาดใหญ่ (120 วัน) ต้องใช้เวลาในการแข็งตัวของเลือดนานกว่าในกุ้งขนาดเล็ก (60 กรัม) ซึ่งอาจเป็นผลมาจากกุ้งขนาดใหญ่ที่ติดเชื้อมีเปอร์เซ็นต์การลดลงของปริมาณโปรตีนในเลือดในสัดส่วนที่สูงกว่า นอกจากนี้พบว่า การติดเชื้อยังมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำตาลในเลือดของกุ้งโดยตรง เช่นเดียวกับปัจจัยสิ่งแวดล้อมอื่นๆ อย่างไรก็ตามการชักนำให้ติดเชื้อโดยวิธีการฉีดอาจจะมีผลกระทบต่อเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบเลือดและภูมิคุ้มกันของกุ้งในช่วงสั้นๆ ทั้งนี้ ความรุนแรงของผลกระทบขึ้นอยู่กับปริมาณของเม็ดเลือดกุ้งที่ถูกทำลายไประหว่างการติดเชื้อ

สรุปผลการศึกษา

การเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมในการเลี้ยง โดยเฉพาะปัจจัยคุณภาพน้ำในสภาพของการเลี้ยงในบ่อดิน และในห้องปฏิบัติการซึ่งเป็นสภาวะที่ก่อให้เกิดความเครียด รวมทั้งภาวะการติดเชื้อก่อโรคราบบางชนิด จะมีผลโดยตรง

ต่อการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบเลือดและภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ โดยเฉพาะปัจจัยปริมาณของเม็ดเลือดรวม (THC), ความว่องไวของเอนไซม์ phenoloxidase (PO activity), ปริมาณโปรตีนในน้ำเลือด และระดับน้ำตาลในเลือด สามารถใช้เป็นดัชนีที่บ่งชี้สภาวะเครียด (stress indicator) ที่เป็นผลจากปัจจัยสิ่งแวดล้อม และภาวะการติดเชื้อของกุ้งกุลาดำได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยที่ค่าของปัจจัยเหล่านี้จะลดลงอย่างมีนัยสำคัญหลังจากที่กุ้งอยู่ในภาวะเครียด และสัมพันธ์กับความสามารถในการตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกันของกุ้ง ซึ่งจะนำไปสู่การยอมรับเชื้อก่อโรคต่างๆ ได้ หากกุ้งต้องอยู่ในสภาพแวดล้อมที่เป็นภาวะเครียดเป็นเวลานาน อย่างไรก็ตาม การใช้ปัจจัยองค์ประกอบเลือดและภูมิคุ้มกันเพื่อตรวจสอบสุขภาพของกุ้ง (health status) ไม่สามารถใช้ปัจจัยใดปัจจัยหนึ่งเพียงปัจจัยเดียวได้ จำเป็นจะต้องใช้หลายๆ ปัจจัยประกอบกัน และในอนาคตยังคงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาและพัฒนาวิธีการอื่นๆ ที่มีความถูกต้องแม่นยำ เช่น อัตราการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้ง (phagocytic index) โดยวิธีการวัดการผลิต reactive oxygen intermediates (ROIs) หรือปริมาณของ beta-glucan binding protein (BGBP) ในน้ำเลือดกุ้ง เพื่อใช้เป็นดัชนีในการประเมินสุขภาพต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- กิจการ สุภมาตย์ และ สิทธิ บุญยรัตผลิน. 2538. การศึกษาภูมิคุ้มกันโรคและแนวทางการใช้วัคซีนป้องกันโรคติดเชื้อแบคทีเรียและไวรัสในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) รายงานการวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. หน้า 1-17.
- กิจการ สุภมาตย์, จีรพร เรืองศรี, สุกญา ศิริรัฐนิคม และ นเรศ ช้วนยุค. 2543a. ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ: VII. การศึกษาองค์ประกอบเลือดและระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำบนพื้นฐานของเพศ (sex) และขนาด (size) และวงจรลอกคราบ (molting cycle). ว. สงขลานครินทร์ วทท. 22 (ฉบับพิเศษ): 623-632.

- กิจการ สุขมาตย์, จีรพร เรืองศรี, สุกญา คีรีรัฐนิคม และ
นเรศ ช้วนยุค. 2543b. ระบบภูมิคุ้มกันโรคใน
กุ้งกุลาดำ: V. ผลของอุณหภูมิ ปริมาณ
ออกซิเจนละลายน้ำ และความเป็นกรด-ด่างของ
น้ำต่อระบบภูมิคุ้มกันโรคและองค์ประกอบเลือด
ในกุ้งกุลาดำ. ว. สงขลานครินทร์ วทท. 22
(ฉบับพิเศษ): 605-614.
- กิจการ สุขมาตย์, จีรพร เรืองศรี, สุกญา คีรีรัฐนิคม และ
นรินทร์ สงจันทร์. 2543c. ระบบภูมิคุ้มกันโรคใน
กุ้งกุลาดำ: IV. การศึกษาค่าปกติของระบบ
ภูมิคุ้มกันและองค์ประกอบเลือดในกุ้งกุลาดำ.
ว. สงขลานครินทร์ วทท. 22 (ฉบับพิเศษ):
597-603.
- กิจการ สุขมาตย์, จีรพร เรืองศรี, สุกญา คีรีรัฐนิคม และ
นเรศ ช้วนยุค. 2543d. ระบบภูมิคุ้มกันโรคใน
กุ้งกุลาดำ: VI. ผลของโรคติดเชื้อต่อระบบ
ภูมิคุ้มกันและองค์ประกอบเลือดในกุ้งกุลาดำ.
ว. สงขลานครินทร์ วทท. 22 (ฉบับพิเศษ):
597-603.
- Boyd, C. E. and Tucker, C. S. 1992. Water Quality
and Pond Soil Analyses for Aquaculture.
Alabama Agriculture Experiment Station,
Auburn University, Alabama. 183 p.
- Brock, J. A. and Main, K. L. 1994. A guide to the
common problems and diseases of cultured
Penaeus vannamei. The Oceanic Institute
Makapuu Point, Honolulu, Hawaii. 242 p.
- Chang, C. F., Su, M. S. and Chen, H. Y. 1999. A
rapid method to quantify total haemocyte
count of *Penaeus monodon* using ATP
analysis. Fish Pathol. 34: 211-212.
- Chen, J. C. and Cheng, S. Y. 1995. Hemolymph
oxygen content, oxyhemocyanin, protein
levels and ammonia excretion in the
shrimp *Penaeus monodon* exposed to
ambient nitrite. J. Comp. Physiol. 164B:
530-535.
- Chen, J. C., Chen, C. T. and Cheng, S. Y. 1994. Nitrogen excretion and changes of
hemocyanin, protein and free amino acid
levels in the hemolymph of *Penaeus
monodon* exposed to different
concentrations of ambient ammonia-N at
different salinity levels. Mar. Ecol., Prog.
Ser. 110: 85-94.
- Gross, P. S., Bartlett, T. C. Browdy, C. L. Chapman,
R. W., War, G. W. 2001. Immune gene
discovery by expressed sequence tag analysis
of hemocytes and hepatopancreas in the
Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*,
and the Atlantic white shrimp, *L. setiferus*.
Dev. Comp. Immunol. 25: 565-577.
- Hall, M. R. and van Ham, E. H. 1998. The effects
of different types of stress on blood glucose
in the giant tiger prawn *Penaeus monodon*.
J. World. Aquacult. Soc. 29(3): 290-299.
- Hennig, O., Itami, T., Maeda, M., Kondo, M.,
Natsukari, Y., Takahashi, Y. 1998. Analyses of hemolymph immunoparameters
in kuruma shrimp infected with penaeid
rod-shaped DNA virus. Fish Pathol.
33(4): 389-393.
- Hyvarinen, A. and Nikkila, E. 1962. Specific
determination of blood glucose with o-
toluidine. Clin. Chem. Acta. 7 : 140-143.
- Jussila, J. McBride, S., Jago, J., Evans, L. H. 2001. Hemolymph clotting time as an indicator
of stress in western rock lobster
(*Panulirus cygnus* George). Aquaculture
199: 185-193.

- Le Moullac, G., Le Groumellec, M., Ansquer, D., Froissard, S. and Levy, P. 1997. Haematological and phenoloxidase activity changes in the shrimp *Penaeus stylirostris* in relation with the moult cycle: Protection against vibriosis. Fish & Shellfish Immunol. 7(4): 227-234.
- Le Moullac, G., Soyeze, C., Saulnier, D., Ansquer, D., Avarre, J. and Levy, P. 1998. Effect of hypoxic stress on the immune response and the resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris*. Fish & Shellfish Immunol. 8(8): 621-629.
- Liu, C. H. and Chen, J. C. 2004. Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*. Fish & Shellfish Immunol. 16: 321-334.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J. Farr, A. L. and Randell, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
- Perazzolo, L. M. and Barracco, M. A. 1997. The prophenoloxidase activating system of the shrimp *Penaeus paulensis* and associated factors. Dev. Comp. Immunol. 21(5): 385-395.
- Perazzolo, L. M., Gargioni, R., Ogliari, P. and Barracco, M. A. A. 2002. Evaluation of some hemato-immunological parameters in the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* submitted to environmental and physiological stress. Aquaculture 214: 19-33.
- Sanchez, A., Pascual, C., Sanchez, A. Vargas-Albores, F., Le Moullac, G., Rosas, C. 2001. Hemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of acclimation. Aquaculture 198: 13-28.
- Smith, V. J. and Soderhall, K. 1983. β -1, 3- glucan activation of crustacean hemocytes *in vitro* and *in vivo*. Biol. Bull. 164: 299-314.
- Sritunyalucksana, K., Sithisarn, P. Withayachumnarnkul, B. and Flegel, T. W. 1999. Activation of prophenoloxidase, agglutinin and antibacterial activity in haemolymph of the black tiger prawn, *Penaeus monodon*, by immunostimulants. Fish & Shellfish Immunol. 9: 21-30.
- Song, Y. L., Yu, C. I, Lien, T. W., Huang, C. C. and Lin, M. N. 2003. Haemolymph parameters of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) infected with Taura syndrome virus. Fish & Shellfish Immunol. 14: 317-331.
- Supamattaya, K., Hoffmann, R. W., Boonyaratpalin, S. and Kanchanaphum, P. 1998. Experimental transmission of white spot syndrome virus (WSSV) from black tiger shrimp *Penaeus monodon* to the sand crab *Portunus pelagicus*, mud crab *Scylla serrata* and krill *Acetes* sp. Dis. Aquat. Org. 32: 79-85.
- Supamattaya, K., Kasornchandra, J. and Boonyaratpalin, S. 1994. Comparative study of simple methods for the diagnosis of yellow head baculovirus in the black tiger

- shrimp (*Penaeus monodon*). Songklanakain J. Sci. Technol. 16(1): 37-48.
- Takahashi, Y., Itami, T., Maeda, M., Suzuki, N., Kasornchandra, J., Supamattaya, K., Khongpradit, R., Boonyaratpalin, S., Kondo, M., Kawai, K., Kusuda, R., Hirono, I. and Aoki, T. 1996. Polymerase chain reaction (PCR) of bacilliform virus (RV-PJ) DNA in *Penaeus japonicus* Bate and systemic ectodermal and mesodermal baculovirus (SEMBV) in *Penaeus monodon* Fabricius. J. Fish Dis. 19: 399-403.
- Tang, K. F. J. and Lightner, D. V. 1999. A yellow head virus gene probe: nucleotide sequence and application for *in situ* hybridization. Dis. Aquat. Org. 35: 93-98.