

ผลของการเสริมสาหร่ายผักกาดทะเลในอาหารต่อปริมาณเม็ดเลือด รวมทั้งหมด และกิจกรรมของเม็ดเลือด ในการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม ของกุ้งขาวแวนนาไม

Effect of dietary administration of sea lettuce (*Ulva rigida*) on total haemocytes count and phagocytic activity of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

ดวงใจ พิสุทธิธาราชัย^{1*} และ ธนากร เหมะสอ¹

Duangjai Pisuttharachai^{1*} and Tanakorn Haemasaton¹

บทคัดย่อ: ผลของการเสริมสาหร่ายผักกาดทะเลในอาหารต่อปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมดและกิจกรรมของเม็ดเลือดในการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของกุ้งขาวแวนนาไม โดยทำการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมขนาด 25 กรัม ด้วยอาหารผสมสาหร่ายผักกาดทะเลที่ระดับความเข้มข้น 0 (ชุดควบคุม), 0.5, 1.0 และ 2.0 กรัม/กก.ของน้ำหนักตัว/วัน เป็นเวลานาน 7 วัน จากนั้นทำการฉีดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ที่มีปริมาณเชื้อเท่ากับ 5.26×10^3 เซลล์/มล. พบว่า กุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมสาหร่ายผักกาดทะเลที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 2.0 กรัม/กก.ของน้ำหนักตัว/วัน มีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันดีกว่าชุดควบคุม โดยค่ากิจกรรมของเม็ดเลือดในการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม ได้แก่ phagocytic activity, phagocytic index และ average number of the bead ingested per cell มีค่าสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) สำหรับผลการศึกษาปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมด พบว่า กุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมสาหร่ายผักกาดทะเลที่ทุกระดับความเข้มข้นมีค่าปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมดไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ($P > 0.05$) จากผลการทดลองสรุปได้ว่าสาหร่ายผักกาดทะเลสามารถใช้เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในการเพาะเลี้ยงกุ้งได้ และการเสริมสาหร่ายผักกาดทะเลที่ระดับความเข้มข้น 0.5 กรัม/กก.ของน้ำหนักตัว/วัน เพียงพอต่อการกระตุ้นให้เกิดการทำงานเพิ่มขึ้นของเซลล์เม็ดเลือดในการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม

คำสำคัญ: สาหร่ายผักกาดทะเล, กุ้งขาวแวนนาไม, ปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมด, กิจกรรมของเม็ดเลือดในการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม

ABSTRACT: Effect of dietary administration of sea lettuce (*Ulva rigida*) on total haemocytes count and phagocytic activity of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) was carried out. Pacific white shrimp (25 g body weight) were fed with dietary administration of sea lettuce at 0 (control), 0.5, 1.0 and 2.0 g/kg body weight/day for 7 days. After that, shrimp were injected with *Vibrio harveyi* at 5.26×10^3 CFU/ml. The results showed that shrimp fed with 0.5, 1.0 and 2.0 g/kg body weight/day of sea lettuce expressed significant higher of phagocytic activity, phagocytic index and average number of the bead ingested per cell than that control ($P < 0.05$). However, total haemocytes count among shrimp groups were not significantly different ($P > 0.05$). In conclusion, sea lettuce can be used as an immunostimulant for cultured shrimps. Feeding a dietary administration of sea lettuce at 0.5 g/kg body weight/day for 7 days was enough level to increase efficiency of phagocytic activity in shrimp.

Keywords: *Ulva rigida*, *Litopenaeus vannamei*, total haemocytes count, phagocytic activity

¹ สาขาวิทยาศาสตร์การประมงและทรัพยากรทางน้ำ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วิทยาเขตชุมพรเขตรอุดมศักดิ์ จ.ชุมพร 86160

Fishery Science and Aquatic Resources, Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Prince of Chumphon Campus 86160

* Corresponding author: duangjai.pisut06@gmail.com

บทนำ

การเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมจัดเป็นอุตสาหกรรมที่สำคัญอย่างหนึ่งของประเทศไทย มีปริมาณผลผลิตและมูลค่าจากการเพาะเลี้ยงต่อปี สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับ การเพาะเลี้ยงสัตว์ทะเลชนิดอื่น แต่ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2556 เป็นต้นมาพบว่าผลผลิตการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมมีแนวโน้มลดลง (กรมประมง, 2556) เนื่องจากการระบาดของโรคที่มีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรียสกุล *Vibrio* sp.) และไวรัส การเพิ่มความต้านทานต่อเชื้อโรคโดยการเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันกุ้งจึงเป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถป้องกันการเกิดโรคในกุ้งได้ ช่วงหลายปีที่ผ่านมาได้มีการทดลองแล้วว่าการเสริมสารลงไปในอาหาร เช่น วิตามินซี (Lee and Shiau, 2003; Qiao et al., 2011; Wu et al., 2016) วิตามินอี (Lee and Shiau, 2004) สารประกอบโพลีแซคคาไรด์ (Liu and Li, 1998; Liu et al., 1999a; Liu et al., 1999b; Liu et al., 2000; Chang et al., 2003) และสาหร่าย เช่น *Sargassum fusiforme*, *S. siliculosum*, *Undaria pinnatifida*, *Gracilaria fisheri*, (Huang et al., 2006; Kanjana et al., 2011; Niu et al., 2015; Yudiati et al., 2016) สามารถเพิ่มการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันและความต้านทานโรคของกุ้ง *Litopenaeus vannamei*, *Penaeus monodon*, *Fenneropenaeus chinensis*, *Marsupenaeus japonicus* ได้

สาหร่ายผักกาดทะเล (*Ulva rigida*) เป็นสาหร่ายสีเขียวขนาดใหญ่ในครอบครัว Ulvaceae มีใบหยักคล้ายใบผักกาดสาหร่ายสีเขียวสกุลนี้มีองค์ประกอบของ sulphated polysaccharides หรือที่เรียกว่า ulvan อยู่ทั้งผนังเซลล์เป็นจำนวนมาก (Ray, 2006) ซึ่งมีรายงานว่าสาร ulvan มีคุณสมบัติเป็นสาร antioxidant (Qi et al., 2006; Morelli and Chiellini, 2010), immune modulator, antitumor (Kaeffer et al., 1999), anticoagulant (Zhang et al., 2008), antiviral และ anti-inflammatory (Tabarsa et al., 2012) ปัจจุบันยังไม่มีรายงานการศึกษาผลของการใช้สาหร่ายผักกาดทะเล (*U. rigida*) ในรูปแบบผงแห้งต่อกิจกรรมของเม็ดเลือดในการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม

(phagocytic activity) ในกุ้งขาวแวนนาไม ซึ่งกระบวนการ phagocytosis จัดเป็นกระบวนการหลักในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันโดยการทำงานของเซลล์ (cellular defense mechanism) เพื่อทำลายเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (Gabriel et al., 2009) และถูกนำมาใช้เป็นพารามิเตอร์ในการตรวจวัดระบบภูมิคุ้มกันในกุ้ง *F. indicus*, *P. monodon*, *P. merguensis* และ *M. japonicus* (Lee et al., 2003; Ghaednia et al., 2011; Grasián et al., 2012; Bi et al., 2015) การทดลองครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงระดับความเข้มข้นของสาหร่ายผักกาดทะเลในอาหารต่อปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมด (total haemocytes count) และกิจกรรมของเม็ดเลือดในการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของกุ้งขาวแวนนาไม

วิธีการศึกษา

การเตรียมอาหารทดลอง

สาหร่ายผักกาดทะเลที่ใช้ในการทดลองนำมาจากศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งจันทบุรี เป็นสาหร่ายตากแห้งนำมาบดจนเป็นผงละเอียดด้วยเครื่องบดอาหาร แล้วนำมาคลุกกับอาหารเม็ดสำเร็จรูปสำหรับเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมขนาดเบอร์ 4 ที่ระดับความเข้มข้น 0 (ชุดควบคุม), 0.5, 1.0 และ 2.0 กรัม/กก.ของน้ำหนักตัว/วัน จากนั้นเคลือบทับด้วยน้ำมันปลาหมึกเพื่อให้สาหร่ายติดกับเม็ดอาหาร ผึ่งลมให้แห้งแล้วเก็บอาหารไว้ในตู้เย็นจะทำการเตรียมอาหารทดลองทุกวันที่ 1 ครั้งในตอนเช้า

การเตรียมสัตว์ทดลอง

นำกุ้งขาวแวนนาไมอายุ 4 เดือน จำนวน 100 ตัว มาเลี้ยงในถังไฟเบอร์กลาสขนาด 2,000 ลิตร บรรจุน้ำทะเลที่ระดับความเค็ม 30 ppt ปริมาตร 1,500 ลิตร ให้อากาศตลอดเวลาเพื่อปรับสภาพกุ้งทดลองให้คุ้นเคยกับสภาพแวดล้อมใหม่เป็นเวลานาน 14 วัน โดยให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปสำหรับเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมขนาดเบอร์ 4 วันละ 3 เวลา เวลาประมาณ 07.00, 12.00 และ 18.00 น. ในอัตรา 3% ของน้ำหนักตัว เปลี่ยนถ่ายน้ำและดูดตะกอนทุก 2 วัน

การทดลองเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมด้วยอาหารผสมสาหร่ายผักกาดทะเล

ทำการคัดเลือกกุ้งขาวแวนนาไมที่แข็งแรงและมีขนาดใกล้เคียงกันน้ำหนักเฉลี่ย 25 กรัม มาเลี้ยงในถังไฟเบอร์กลาสขนาด 500 ลิตร บรรจุน้ำทะเลที่ระดับความเค็ม 30 ppt ปริมาตร 400 ลิตร ถึงละ 10 ตัว จำนวน 4 ถัง ทำการเลี้ยงกุ้งขาว แวนนาไมด้วยอาหารเม็ดสำเร็จรูปที่ผสมสาหร่ายผักกาดทะเล ที่ระดับความเข้มข้น 0 (ชุดควบคุม), 0.5, 1.0 และ 2.0 กรัม/กก.ของน้ำหนักตัว/วัน โดยให้อาหารวันละ 3 เวลา เวลาประมาณ 07.00, 12.00 และ 18.00 น. ในอัตรา 3% ของน้ำหนักตัว เป็นระยะเวลา 7 วัน จากนั้นทำการฉีดเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ที่มีปริมาณเชื้อเท่ากับ 5.26×10^3 เซลล์/มล. เข้าทางกลัมน้ำด้านข้างลำตัว ปริมาตร 0.1 มล./ตัว ทั้งไว้ 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการสุ่มกุ้งขาวแวนนาไมจำนวน 3 ตัว/ถัง (กุ้งขาว แวนนาไม 1 ตัวคิดเป็น 1 ซ้ำ) มาทำการเก็บเลือดกุ้งเพื่อศึกษาปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมดและกิจกรรมของเม็ดเลือดในการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม ระหว่างการเลี้ยง จะทำการตรวจวัด ความเค็ม ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ และอุณหภูมิของน้ำในถังเลี้ยงทุกวันก่อนให้อาหารมื้อแรก สำหรับค่าอัลคาไลน์ ความเป็นกรด-ด่าง แอมโมเนีย และไนไตรท์ จะทำการตรวจวัดทุก 3 วัน สำหรับเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ที่ใช้ในการทดสอบ นำมาจากสถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำชายฝั่งจังหวัดสงขลา เชื้อแบคทีเรียที่นำมาใช้ในการทดลองทุกครั้ง จะเชื้อบริสุทธิ์ลงในอาหาร Tryptic soy agar ที่มี NaCl 3% บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18-24 ชั่วโมง

การศึกษาปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมดและกิจกรรมของเม็ดเลือดในการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม

ทำการเก็บตัวอย่างเลือดกุ้งจากบริเวณ ventral sinus ปริมาตร 0.5 มล. ด้วยเข็มฉีดยาที่บรรจุ K-199 pH 7.4 ที่เติม L-cysteine 5% เป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (anticoagulant) ในอัตราส่วน 1:1 จะได้ปริมาตร 1 มล. ผสมให้เข้ากันจากนั้นถ่ายลงในหลอดทดลอง (eppendorf tube) นำเลือดที่ได้ไปวิเคราะห์

ปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมด โดยใช้ hemocytometer และคำนวณปริมาณเม็ดเลือดเป็นจำนวนเซลล์/มล. สำหรับการศึกษากิจกรรมของเม็ดเลือดในการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมดัดแปลงมาจากวิธีการของ Itami et al. (1994) โดยนำเลือดที่ได้ไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,500 รอบ/นาที นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C จากนั้นดูดส่วนใสทิ้งแล้วล้างส่วนตะกอน (เม็ดเลือดกุ้ง) ด้วย phosphate buffered saline (PBS) 1 มล. โดยใช้ไมโครปิเปตผสมให้เข้ากันแล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,500 รอบ/นาที นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C ทำการล้าง 2 ครั้ง นำเม็ดเลือดกุ้งที่ได้มานับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดและปรับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดให้มีปริมาณเท่ากับ 1×10^6 เซลล์/200 ไมโครลิตร จากนั้นเตรียมแผ่นปิดสไลด์ (cover glass) วางลงบนจานเพาะเชื้อ (petri dish) ดูดเม็ดเลือดกุ้งใส่ลงบนแผ่นปิดสไลด์ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ปิดฝาจานเพาะเชื้อทันที แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างเม็ดเลือดกุ้งบนแผ่นปิดสไลด์ด้วย PBS 3 ครั้งๆ ละ 1 มล. โดยใช้ไมโครปิเปตดูด PBS แล้วปล่อยให้ไหลผ่านแผ่นปิดสไลด์พร้อมยกจานเพาะเชื้อให้เอียงประมาณ 45 องศา ดูด PBS ที่ไหลผ่านแผ่นปิดสไลด์ในจานเพาะเชื้อทิ้ง เติมเม็ด latex bead 200 ไมโครลิตร ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 1×10^7 เซลล์/200 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นปิดสไลด์ บ่มที่อุณหภูมิห้องอีก 2 ชั่วโมง แล้วล้างออกด้วย PBS 3 ครั้งๆ ละ 1 มล. จากนั้นย้อมสีด้วย dip quick ทำการนับจำนวนเม็ดเลือดกุ้งจำนวน 200 เซลล์/1 ตัวอย่าง แล้วนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาค่าดังนี้

Phagocytic activity (%) = (จำนวนเซลล์เม็ดเลือดที่มีการกินเม็ด latex bead / จำนวนเซลล์เม็ดเลือดทั้งหมดที่สังเกต) x 100 (Weeks-Perkins et al., 1995)

Phagocytic index = (จำนวนเซลล์เม็ดเลือดที่มีการกินเม็ด latex bead / จำนวนเซลล์เม็ดเลือดทั้งหมดที่สังเกต) x (จำนวนเม็ด latex bead ที่ถูกกิน / จำนวนเซลล์เม็ดเลือดทั้งหมดที่สังเกต) x 100 (Itami et al. 1994)

Average number of the bead ingested per cell (ABPC) = (จำนวนเม็ด latex bead ที่ถูกกิน / จำนวนเซลล์เม็ดเลือดที่มีการกินเม็ด latex bead) (Itami et al., 1994)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) นำข้อมูลที่ได้ในแต่ละพารามิเตอร์มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยในแต่ละชุดการทดลองด้วยวิธี DMRT ด้วยโปรแกรม The SAS system for windows version 6.12 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ผลการศึกษาปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมด

กุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมสาหร่ายผักกาดทะเลที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 2.0 กรัม/กก.ของน้ำหนักตัว/วัน เป็นเวลานาน 7 วัน หลังจากได้รับเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ที่มีปริมาณเชื้อเท่ากับ 5.26×10^3 เซลล์/มล. นาน 24 ชั่วโมง มีค่าปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมดเท่ากับ $(12.92 \pm 6.01) \times 10^5$, $(7.30 \pm 1.61) \times 10^5$ และ $(7.21 \pm 3.52) \times 10^5$ เซลล์/มล. ตามลำดับ เมื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าค่าที่ได้มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ($P>0.05$) ซึ่งเป็นกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงด้วยอาหารไม่ผสมสาหร่ายผักกาดทะเลและได้รับเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* มีค่าเท่ากับ $(13.39 \pm 4.00) \times 10^5$ เซลล์/มล. (Figure 1) ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการทดลองของ Esquer-Miranda (2016) รายงานว่ากุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับสารสกัดจากสาหร่าย

U. lactuca โดยวิธีการแช่ที่ระดับความเข้มข้น 150 และ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 3 ชั่วโมง จากนั้นได้รับเชื้อ *V. alginolyticus* ที่มีปริมาณเชื้อเท่ากับ 1×10^6 เซลล์/มล. นาน 120 ชั่วโมง มีปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมดไม่แตกต่างจากชุดควบคุม จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสาหร่ายผักกาดทะเลไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณเม็ดเลือดของกุ้งขาวแวนนาไม ปัจจัยที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมดในระบบเลือดของกุ้งนั้น น่าเป็นผลมาจากการได้รับเชื้อแบคทีเรีย ซึ่ง Bachère et al. (2004) รายงานว่าปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมดของกุ้งจะมีการเปลี่ยนแปลงภายหลังได้รับเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. โดยระยะแรกปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมดจะลดลงหลังได้รับเชื้อแบคทีเรียนาน 12 ชั่วโมง จากนั้นภายใน 24-48 ชั่วโมงของการติดเชื้อ ปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมดจะเพิ่มขึ้นจนถึงระดับปกติ เช่นเดียวกับ Sunjian et al. (2014) รายงานว่า เม็ดเลือดทั้ง 3 ชนิด (hyalinocytes, semigranulocytes และ granulocytes) ของปู *Eriocheir sinensis* หลังได้รับเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* และ *Bacillus subtilis* นาน 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6 และ 8 ชั่วโมง จะมีปริมาณลดลงและเพิ่มขึ้นกลับสู่ระดับปกติอย่างรวดเร็วในการทดลองครั้งนี้ทุกชุดการทดลองได้รับเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* จึงทำให้การเปลี่ยนแปลงปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมดเป็นไปในทิศทางเดียวกัน มีผลทำให้ค่าปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมดในทุกชุดการทดลองมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ

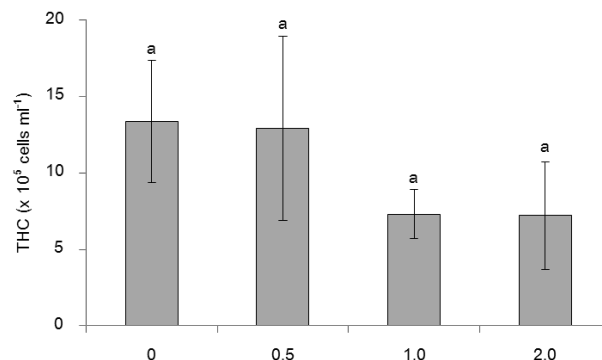


Figure 1 Total haemocytos count (THC) of *L. vannamei* fed dietary administration of sea lettuce (*U. rigida*) at 0, 0.5, 1.0 and 2.0 g/kg body weight/day after *V. harveyi* infection.

ผลการศึกษากิจกรรมของเม็ดเลือดในการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม

จากการศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม โดยการทดสอบกิจกรรมของเม็ดเลือดในการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม (Figure 2) พบว่า กุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมสาหร่ายผักกาดทะเลที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 2.0 กรัม/กก.ของน้ำหนักตัว/วัน เป็นเวลานาน 7 วัน หลังจากได้รับเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* มีค่า phagocytic activity เท่ากับ 87.83 ± 4.28 , 86.00 ± 3.06 และ 90.50 ± 1.25 % ตามลำดับ ซึ่งมีค่าสูงกว่าชุดควบคุม (74.16 ± 5.77 %) ที่เป็นกุ้งขาว แวนนาไมที่ได้รับอาหารไม่ผสมสาหร่ายผักกาดทะเลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (Figure 3A) นอกจากนี้ค่า phagocytic index ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมสาหร่ายผักกาดทะเลที่ทุกระดับความเข้มข้นมีค่ามากกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เช่นกัน (Figure 3B) และเมื่อพิจารณาค่าจำนวนเม็ด latex bead ที่ถูกกินต่อหนึ่งเซลล์ (ABPC) พบว่า เม็ดเลือดของกุ้งที่ได้รับอาหารผสมสาหร่ายผักกาดทะเลที่ระดับความเข้มข้น 2.0 กรัม/กก.ของน้ำหนักตัว/วัน มีความสามารถในการจับกินเม็ด latex bead ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ เม็ดเลือดของกุ้งที่ได้รับอาหารผสมสาหร่ายผักกาดทะเลที่ระดับความเข้มข้น 1.0 และ 0.5 กรัม/กก.ของน้ำหนักตัว/วัน ตามลำดับ และค่า ABPC ที่ได้ของทุกระดับความเข้มข้นมีค่าแตกต่างกันอย่างมี

นัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ($P < 0.05$) (Figure 3C)

จากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่า สาหร่ายผักกาดทะเลในรูปแบบผงแห้งสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไมให้มีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันโดยการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมให้ดีขึ้นได้ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Castro et al. (2004) รายงานว่าสารสกัดจากสาหร่ายผักกาดทะเล *U. rigida* สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในปลาตาเดียว (*Psetta maxima* L.) ให้มีประสิทธิภาพการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมเพิ่มขึ้นได้ สำหรับกลไกการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของสาหร่ายผักกาดทะเล น่าเป็นผลมาจาก sulphated polysaccharides บนผนังเซลล์ของสาหร่ายสกุลนี้ ซึ่งมีรายงานว่า sulphated polysaccharides จากผนังเซลล์ของสาหร่าย *U. rigida* สามารถชักนำให้เกิดการหลั่งสาร chemokines ซึ่งทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของเซลล์ให้มาชุมนุมในบริเวณที่ต้องการกำจัดสิ่งแปลกปลอมมากขึ้น หรือชักนำให้เกิดการหลั่งสารที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาว เช่น interleukin (IL)-6 signal transducer และ IL-12 receptor β -1 เพิ่มมากขึ้น (Lerio et al., 2007) นอกจากนี้ Shao et al. (2013) ยังรายงานว่า sulphated polysaccharides จาก *U. fasciata* ยังมีคุณสมบัติเป็นสาร antioxidant ที่ดีอีกด้วย ซึ่งส่งผลทำให้สัตว์มีสุขภาพที่ดีและแข็งแรงขึ้น

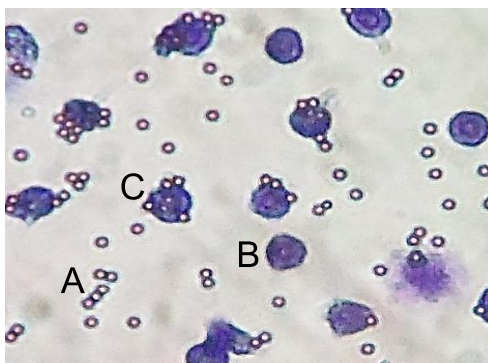


Figure 2 A: Latex bead, B: Haemocyte, C: Haemocyte ingesting beads

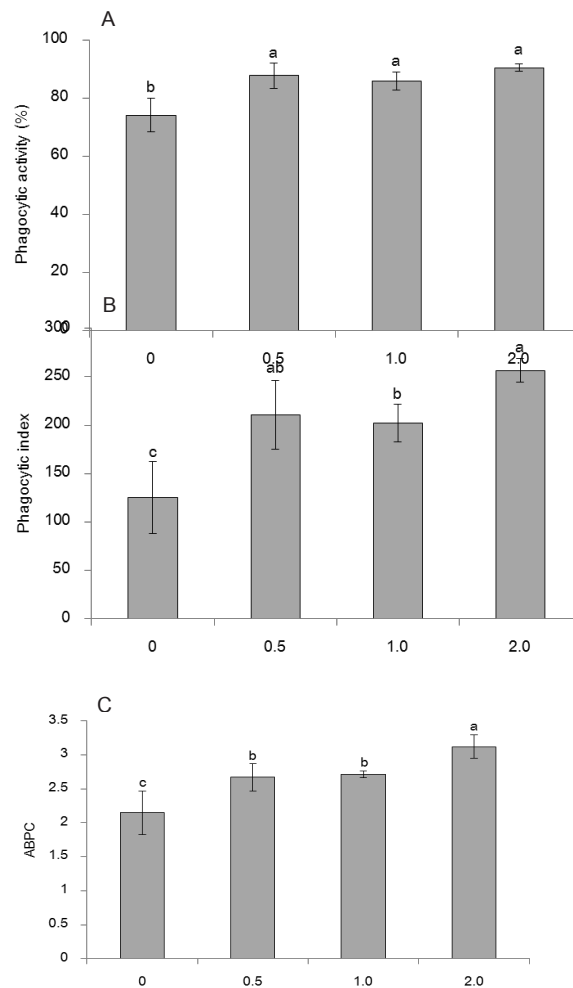


Figure 3 Phagocytic activity (A), phagocytic index (B) and average number of the bead ingested per cell (ABPC) (C) of *L. vannamei* fed dietary administration of sea lettuce (*U. rigida*) at 0, 0.5, 1.0 and 2.0 g/kg body weight/day after *V. harveyi* infection.

คุณภาพน้ำระหว่างการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม

ค่าคุณภาพน้ำระหว่างการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม ทุกชุดการทดลองมีค่าอุณหภูมิของน้ำเท่ากับ 27 °C ความเค็มของน้ำเท่ากับ 32 ppt ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำอยู่ในช่วง 7.35-7.50 มก./ลิตร ความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 8.00 ความเป็นด่างอยู่ในช่วง 136.00-170.00 มก./ลิตร ปริมาณแอมโมเนียอยู่ในช่วง 0.01-0.02 มก./ลิตร และปริมาณไนไตรท์อยู่ในช่วง 0.10-0.25 มก./ลิตร ซึ่งคุณภาพน้ำทุกค่ามีความเหมาะสมอยู่ในเกณฑ์ตามที่ Brock and Main (1994) ได้รายงานค่าคุณภาพน้ำที่เหมาะสมในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม

ไว้ดังนี้ อุณหภูมิของน้ำควรอยู่ในช่วง 26-30 °C ความเค็มของน้ำควรอยู่ในช่วง 5-35 ppt ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำควรมีค่ามากกว่า 3.00 มก./ลิตร ความเป็นกรดเป็นด่างควรอยู่ในช่วง 7.00-9.00 ความเป็นด่างควรอยู่ในช่วง 50.00-150.00 มก./ลิตร ปริมาณแอมโมเนียควรน้อยกว่า 1.00 มก./ลิตร และปริมาณไนไตรท์ควรน้อยกว่า 0.10 มก./ลิตร สำหรับค่าปริมาณไนไตรท์ในบางชุดการทดลองมีค่ามากกว่า 0.10 มก./ลิตร แต่ค่าดังกล่าวไม่มีความเป็นพิษต่อกุ้ง เนื่องจากน้ำที่ใช้เลี้ยงมีระดับความเค็มสูง (นงนุช และกฤษดา, 2553) (Table 1)

Table 1 Water qualities of *L. vannamei* fed dietary administration of sea lettuce (*U. rigida*) at 0, 0.5, 1.0 and 2.0 g/kg body weight/day

Water qualities	0	0.5	1.0	2.0
Temperature (°C)	27.00 ± 0.00	27.00 ± 0.00	27.00 ± 0.00	27.00 ± 0.00
Salinity (ppt)	32.00 ± 0.00	32.00 ± 0.00	32.00 ± 0.00	32.00 ± 0.00
Dissolved oxygen (mg/l)	7.40 ± 0.01	7.50 ± 0.00	7.35 ± 0.00	7.47 ± 0.07
pH	8.00 ± 0.00	8.00 ± 0.00	8.00 ± 0.00	8.00 ± 0.00
Alkalinity (mg/l)	144.50 ± 8.50	153.00 ± 0.00	170.00 ± 0.00	170.00 ± 0.00
Ammonia (mg/l)	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.01
Nitrite (mg/l)	0.25 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00

สรุป

สาหร่ายผักกาดทะเล *U. rigida* ในรูปแบบผงแห้งสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งโดยการเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเม็ดเลือดในการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมให้ดีขึ้นได้ จากผลการศึกษารังนี้พบว่า การเสริมสาหร่ายผักกาดทะเล *U. rigida* ในรูปแบบผงแห้งลงไปให้อาหารที่ระดับความเข้มข้น 0.5 กรัม/กก.ของน้ำหนักตัว/วัน เลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมเป็นเวลา 7 วัน ก็เพียงพอต่อการกระตุ้นให้เกิดการทำงานเพิ่มมากขึ้นของเซลล์เม็ดเลือดกุ้งในการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม

เอกสารอ้างอิง

กรมประมง. 2556. สถิติการประมง. แหล่งข้อมูล: <https://goo.gl/7A8zPm>. ค้นเมื่อ 28 กันยายน 2559.

นงนุช ตั้งเกริกไอฟาร และ กฤษดา ทองเทียม. 2553. ผลของความเค็มและไนโตรเจนต่อค่าออกซิเจนละลายของเลือด และการดูดซึมไนโตรเจนเข้าสู่กระแสเลือดของกุ้งขาวแวนนาไม. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา. 15: 20-28.

Bachère, E., Y. Gueguen, M. Gonzalez, J. de Lorgeril, J. Garnier, and B. Romestand. 2004. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. Immunol Rev. 198: 149-168.

Bi, W.J., D.X. Li, Y.H. Xu, S. Xu, J. Li, X.F. Zhao, and J.X. Wang. 2015. Scavenger receptor B protects shrimp from bacteria by enhancing phagocytosis and regulating expression of antimicrobial peptides. Dev. Comp. Immunol. 15: 10-21.

Brock, J.A., and K.L. Main. 1994. A Guide to the Common Problems and Diseases of Cultured *Penaeus vannamei*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA.

Castro, R., I. Zarra, and J. Lamas. 2004. Water-soluble seaweed extracts modulate the respiratory burst activity of turbot phagocytes. Aquaculture. 229: 67-78.

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

Esquer-Miranda, E., M. Nieves-Soto, M.E. Rivas-Vega, A. Miranda-Baeza, and P. Piña-Valdez. 2016. Effects of methanolic macroalgae extracts from *Caulerpa sertularioides* and *Ulva lactuca* on *Litopenaeus vannamei* survival in the presence of *Vibrio* bacteria. Fish Shellfish Immunol. 51: 346-350.

Gabriel, A.-G., S.-M. Jesus Genaro, C.-C. Angel Isidro, L.-G. Antonio, and A. Felipe. 2009. Penaeid Shrimp Immune System. Thai J. Vet. Med. 39: 205-215.

Ghaednia, B., M.R. Mehrabi, M. Mirbakhsh, V. Yeganeh, P. Hoseinkhezri, G. Garibi, and A. Ghaffar Jabbari. 2011. Effect of hot-water extract of brown seaweed *Sargassum glaucescens* via immersion route on immune responses of *Fenneropenaeus indicus*. Iran J. Fish. Sci. 10: 616-630.

Grasian, I., S. Madasamy, M. Thangapandi, R. Srinivasan, and P. Arunachalam. 2012. The effect of fucoidan from brown seaweed *Sargassum wightii* on WSSV resistance and immune activity in shrimp *Penaeus monodon* (Fab). Fish Shellfish Immunol. 32: 551-564.

Huang, X., H. Zhou, and Z. Hui. 2006. The effect of *Sargassum fusiforme* polysaccharide extracts on vibriosis resistance and immune activity of the shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. Fish Shellfish Immunol. 20: 750-757.

Itami, T., Y. Takahashi, E. Tsuchihira, H. Igusa, 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 (Schizophyllan). In: pp. 375-378. Proceedings of the 3rd Asian Fisheries Forum, October 26-30, 1992, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines.

- Kaeffer, B., C. Benard, M. Lahaye, H.M. Blottiere, and C. Cherbut. 1999. Biological properties of ulvan, a new source of green seaweed sulfated polysaccharides, on cultured normal and cancerous colonic epithelial cells. *Planta Medica*. 65: 527-531.
- Kanjana, K., T. Radtanatip, S. Asuvapongpatana, B. Withyachumnarnkul, and K. Wongprasert. 2011. Solvent extracts of the red seaweed *Gracilaria fisheri* prevent *Vibrio harveyi* infections in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish Shellfish Immunol*. 30: 389-396.
- Lee, M.-H., and S.-Y. Shiau. 2003. Increase of dietary vitamin C improves haemocyte respiratory burst response and growth of juvenile grass shrimp, *Penaeus monodon*, fed with high dietary copper. *Fish Shellfish Immunol*. 14: 305-315.
- Lee, M.-H., and S.-Y. Shiau. 2004. Vitamin E requirements of juvenile grass shrimp, *Penaeus monodon*, and effects on non-specific immune responses. *Fish Shellfish Immunol*. 16: 475-485.
- Lee, Y.-K., P.-F. Chew, B.-S. Soh, and L.Y. Tham. 2003. Enhancing phagocytic activity of hemocytes and disease resistance in the prawn *Penaeus merguensis* by feeding *Spirulina platensis*. *J. Appl. Phycol*. 15: 279-287.
- Leiro, J.M., R. Castro, J.A. Arranz, and J. Lamas. 2007. Immunomodulating activities of acidic sulphated polysaccharides obtained from the seaweed *Ulva rigida* C. Agardh. *Int Immunopharmacol*. 7: 879-888.
- Liu, H., and G.-Y. Li. 1998. The effect of immunopolysaccharide as a food additive on the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. *Oceanol. Limnol. Sin*. 29: 113-118.
- Liu, S.-Q., X.-L. Jiang, H.-J. Mou, and H.-S. Guan. 1999a. The effects of immunity polysaccharide on some enzyme activities of *Penaeus japonicus* serum. *Journal of Fishery Sciences of China*. 6: 107-108.
- Liu, S.-Q., X.-L. Jiang, H.-J. Mou, H.-M. Wang, and H.-S. Guan. 1999b. Effects of immunopolysaccharide on LSZ, ALP, ACP and POD activity of *Penaeus chinensis* serum. *Oceanol. Limnol. Sin*. 30: 278-283.
- Liu, Y., X.-L. Jiang, Q. Lu, and H.-S. Guan. 2000. Effects of mannuronate polysaccharide on enzymes of *Penaeus chinensis* related with immune and hemolysis. *J. Fish. China*. 24: 549-553.
- Morelli, A., and F. Chiellini. 2010. Ulvan as a new type of bio-material from renewable resources: Functionalization and hydrogel preparation. *Macromol. Chem. Phys*. 211: 821-832.
- Niu, J., X. Chen, L. Xue, S.-G. Jiang, H.-Z. Lin, Y.-J. Liu, Z. Huang, J. Wang, Y. Wang, and L.-X. Tian. 2015. Effects of different levels of dietary wakame (*Undaria pinnatifida*) on growth, immunity and intestinal structure of juvenile *Penaeus monodon*. *Aquaculture*. 435: 78-85.
- Qi, H., Q. Zhang, T. Zhao, R. Hu, K. Zhang, and Z. Li. 2006. In vitro antioxidant activity of acetylated and benzoylated derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta). *Bioorg. Med. Chem. Lett*. 16: 2441-2445.
- Qiao, J., Z. Du, Y. Zhang, H. Du, L. Guo, M. Zhong, J. Cao, and Z. Wang. 2011. Proteomic identification of the Related immune-enhancing proteins in shrimp *Litopenaeus vannamei* stimulated with vitamin C and Chinese herbs. *Fish Shellfish Immunol*. 31: 736-745.
- Ray, B. 2006. Polysaccharides from *Enteromorpha compressa*: Isolation, purification and structural features. *Carbohydr. Polym*. 6: 408-416.
- Shao, P., X. Chen, and P. Sun. 2013. In vitro antioxidant and antitumor activities of different sulfated polysaccharides isolated from three algae. *Int. J. Biol. Macromol*. 62: 155-161.
- Sunjian, L., X. Jiehao, Z. Jing, Y. Na, L. Binjie, L. Song, C. Yuyin, and X. Haisheng. 2014. Classification and phagocytosis of circulating haemocytes in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) and the effect of extrinsic stimulation on circulating haemocytes in vivo. *Fish Shellfish Immunol*. 39: 415-422.
- Tabarsaa, M., S.-J. Lee, and S.G. You. 2012. Structural analysis of immunostimulating sulfated polysaccharides from *Ulva Pertusa*. *Carbohydr. Res*. 361: 141-147.
- Weeks-Perkins, B.A., N. Chansue, and D. Wong-Verelle. 1995. Assays of immune function in shrimp phagocytes: Techniques used as indicators of pesticide exposure. In: pp. 223-231. Stolen J.S., Fletcher T.C., Smith S.A., Zelikoff J.T., Kaattari S.L., Anderson R.S., Soderhall K., Weeks-Perkins B.A. (Eds.), *Techniques in Fish Immunology-4*. SOS Publications, Fair Haven, NJ, USA.
- Wu, Y.-S., S.-Y. Liao, C.-T. Huang, and F.-H. Nan. 2016. Beta 1,3 / 1,6-glucan and vitamin C immunostimulate the non-specific immune response of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Fish Shellfish Immunol*. 57: 269-277.
- Yudiati, E., A. Isnansetyo, Murwantoko, Ayuningtyas, Triyanto, and C.R. Handayani. 2016. Innate immune-stimulating and immune genes up-regulating activities of three types of alginate from *Sargassum siliquosum* in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol*. 54: 46-53.
- Zhang, H.J., W.J. Mao, F. Fang, H.Y. Li, H.H. Sun, Y. Ghen, and X.H. Qi. 2008. Chemical characteristics and anticoagulant activities of a sulfated polysaccharide and its fragments from *Monostroma latissimum*. *Carbohydrate Polymers*. 71: 428-434.