



วารสารแก่นเกษตร
THAIJO

Content List Available at ThaiJo

Khon Kaen Agriculture Journal

Journal Home Page : <https://li01.tci-thaijo.org/index.php/agkasetkaj>



การทดสอบอาหารสำเร็จรูป ต่อสุขภาพและความไวต่อเชื้อก่อโรคของลูกกุ้งขาวแวนนาไม

Evaluation of commercial feeds on health and pathogen susceptibilities of *Penaeus vannamei* postlarvae

ณัฐินี มั่นคงวงศ์ศิริ¹, จำเริญศรี ถาวรสุวรรณ², ลัดดาวัลย์ ครองพงษ์³, วารินทร์ ธนาสมหวัง⁴, กัลยาณ ศรีธัญญลักษณ์¹ และ เจนจิตต์ คงกำเนิด^{4*}

Natthinee Munkongwongsiri¹, Jumroensri Thawonsuwan², Laddawan Krongpong³, Varin Tanasomwang⁴, Kallaya Sritunyalucksana¹ and Janejit Kongkumnerd^{4*}

¹ ทีมวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ กลุ่มวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพสัตว์น้ำแบบบูรณาการ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

¹ Aquatic Animal Health Research Team (AQHT), National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), Yothi office, Rama VI Rd., Bangkok 10400, Thailand

² ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำสงขลา กองวิจัยและพัฒนาสุขภาพสัตว์น้ำ กรมประมง อ.เมือง จ.สงขลา 90100

² Songkhla Aquatic Animal Health Research and Development Center, Aquatic Animal Health Research and Development Division, Department of Fisheries, 130/2 Pawong, Amphur Muang, Songkhla, 90100, Thailand

³ ศูนย์วิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์น้ำชลบุรี กรมประมง อ.ศรีราชา จ.ชลบุรี 20110

³ Chon buri Aquatic Animal Feed Research and Development Center, Department of Fisheries, Sriracha district, Chonburi 20110, Thailand

⁴ ราชการบริหารส่วนกลาง กรมประมง เกษตรกลาง จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

⁴ Central administration, Department of Fisheries, Kasetsart University (Bang Khen campus), Chatuchak, Bangkok 10900

บทคัดย่อ: งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการประเมินและเปรียบเทียบคุณภาพอาหารลูกกุ้งที่มีขายในท้องตลาดประเทศไทยจำนวน 4 ยี่ห้อ (F1 - F4) ต่อการเจริญเติบโตและความไวต่อเชื้อก่อโรคของลูกกุ้งหลังได้รับอาหารแต่ละชนิดเป็นเวลา 10 วัน (PL1 - PL10) โดยอาหาร F1-F3 มีค่าโปรตีนรวม ไขมัน กากและเถ้าอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานของกรมประมง ประเทศไทย ส่วนอาหาร F4 มีค่ากากสูงเกินค่ามาตรฐาน ลูกกุ้งที่ได้รับอาหารแต่ละยี่ห้อเมื่อเปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์การเข้าระยะ PL10 ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) แต่ในส่วนสุขภาพเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนของลูกกุ้งพบว่ามีความแตกต่างกันระหว่าง 4 กลุ่มโดย ลูกกุ้งกลุ่มอาหาร F1 มีการหลุดลอกของตับ และลูกกุ้งกลุ่มอาหาร F3 และ F4 มีการสะสมคล้ายเศษอาหารที่ไม่สามารถย่อยได้ในเซลล์เยื่อตับ ในขณะที่ลูกกุ้งกลุ่มอาหาร F2 มีเนื้อเยื่อตับปกติ เมื่อเปรียบเทียบความไวต่อเชื้อก่อโรคโดยการเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* ที่ก่อให้เกิดโรคตับวายเฉียบพลัน (Vp_{AHPND}) พบว่า ลูกกุ้งกลุ่มอาหาร F2 มีอัตราการรอดสูงสุดและแตกต่างกับลูกกุ้งอีก 3 กลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่ไม่พบความแตกต่างของปริมาณเชื้อ *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) ในกุ้งทั้ง 4 กลุ่มเมื่อถูกเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อ ($p > 0.05$) ผลงานวิจัยบ่งชี้ถึงอาหารลูกกุ้งที่ขายตามท้องตลาดมีความหลากหลายและส่งผลกระทบต่อสุขภาพและความไวต่อเชื้อก่อโรคของลูกกุ้งวัยอ่อน

คำสำคัญ: ลูกกุ้งขาวแวนนาไม; อาหารสำเร็จรูปลูกกุ้งวัยอ่อน; โภชนาการ; เชื้อแบคทีเรียก่อโรคตับวายเฉียบพลัน; เชื้อไมโครสปอริเดียน

ABSTRACT: The aim of this study was to assess and compare the quality of commercial postlarval (PL) feeds from 4 different sources (F1-F4) on shrimp post larval growth and their pathogen susceptibility after feeding for 10 days (PL1 – PL10). Using proximate analysis, the content of crude protein, lipid, fiber and ash of all 3 commercial feed

* Corresponding author: kjanejit@yahoo.com

(F1-F3) fell in the standard contents of Department of Fisheries, Thailand, except F4 that contained an exceed fiber inclusion in feed. There was no significant effect on PL development in all feeding groups as shown by the number of PL10 post feeding with 4 commercial feed ($p > 0.05$). In terms of larval health, histological examination of hepatopancreas (HP) revealed some differences among 4 feeding groups. Shrimp fed with F1 demonstrated characteristics of aggregated transformed microvilli (ATM), whereas those fed with F3 and F4 developed non-digestible particles accumulated in HP epithelial tubules. PL fed with F2 feed developed normal HP histology. The significantly high survival rate ($p < 0.05$) post challenged with the bacteria, *Vibrio parahaemolyticus*, causing acute hepatopancreatic necrosis disease (Vp_{AHPND}) was found in PL12 fed with F2 feed when compared to those fed with the other feeds. There was no significant difference in replication levels of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) among all 4 feeding groups ($p > 0.05$). Taken together, the results indicated the quality differences in commercial PL feed formulae in the market, affected health and pathogenic susceptibility of shrimp.

Keywords: postlarvae; commercial larvae feed; nutrition; *Vibrio parahaemolyticus*; *Enterocytozoon hepatopenaei*

บทนำ

กุ้งขาวแวนนาไม (*Penaeus vannamei*) เป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย แต่ในปัจจุบันปัญหาโรคระบาดเป็นอุปสรรคสำคัญที่สร้างความเสียหายให้กับอุตสาหกรรมกุ้งเลี้ยง ในช่วงกว่า 9 ปีที่ผ่านมา มีโรคระบาดที่สำคัญ คือ โรคตายด่วน (Early Mortality Syndrome: EMS) หรือโรคตับวายเฉียบพลัน (Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease : AHPND) ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* ชนิดที่สามารถสร้างสารพิษ (Vp_{AHPND}) ทำให้กุ้งตายเป็นจำนวนมากตั้งแต่กุ้งยังอายุน้อย โดยอวัยวะเป้าหมายของเชื้ออยู่ที่ระบบทางเดินอาหารโดยเฉพาะในส่วนของกระเพาะอาหาร และตับและตับอ่อน (FAO, 2013) การศึกษาของวารินทร์ และคณะ (2558) ถึงปัจจัยสาเหตุของโรคตายด่วนจากกุ้งจำนวน 200 บ่อ พบว่านอกจากกุ้งตายจากอาการตายด่วนแล้วยังตรวจพบเชื้อกลุ่มไมโครสปอริเดียน *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) ซึ่งเป็นเชื้อรา มีอวัยวะเป้าหมายที่ตับและตับอ่อนทั้งในลูกกุ้งและกุ้งวัยรุ่น สามารถพบได้ในกุ้งกุลาดำ กุ้งขาวแวนนาไม และกุ้งขาวญี่ปุ่น (*P. japonicas*) (Hudson et al., 2001; Chayaburakul et al., 2004; Tourtip et al., 2009) การติดเชื้อทั้ง Vp_{AHPND} และ EHP ในกุ้งขาวแวนนาไมพบกระจายในทุกพื้นที่การเลี้ยง และมีความชุกของการติดเชื้อเพิ่มมากขึ้นในปัจจุบัน เกษตรกรส่วนใหญ่พบว่าการติดเชื้อดังกล่าวทำให้กุ้งมีอัตราการเจริญเติบโตต่ำและมีการรายงานถึงความเกี่ยวข้องของการติดเชื้อ EHP ต่อการเกิดอาการชักขาว (Ha et al., 2010) เชื้อ EHP สามารถถ่ายทอดแนวราบ (horizontal transmission) ผ่านการกินเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อโดยใช้ระยะเวลา 4-7 วัน (Tangprasittipap et al., 2013) มีรายงานเชื้อ EHP แพร่กระจายไปในกุ้งขาวแวนนาไม ทั้งในลูกกุ้งในโรงเพาะฟักและในบ่อเลี้ยง (วารินทร์, 2558) โดยเกษตรกรที่ปล่อยลูกกุ้งที่ติดเชื้อ EHP ลงเลี้ยงในบ่อ จะพบกุ้งแคะแสร้งและเจริญเติบโตช้า ซึ่งความรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับการจัดการการเลี้ยง ซึ่งรวมทั้งคุณภาพลูกกุ้ง ความหนาแน่นของการเลี้ยง การเตรียมบ่อ อาหาร และคุณภาพน้ำ

เป็นที่น่าสังเกตว่าเชื้อก่อโรคที่พบในกุ้ง มีอวัยวะเป้าหมายอยู่ที่ระบบทางเดินอาหารโดยเฉพาะตับและตับอ่อน ซึ่งเป็นอวัยวะที่สำคัญในกระบวนการใช้อาหารของกุ้ง อาหารกุ้งจึงเป็นปัจจัยการผลิตหนึ่งที่น่าจะมีผลต่อสุขภาพกุ้ง ทั้งการทำงานของตับและตับอ่อนและความสามารถในการต้านเชื้อ และสภาวะโดยรวมหลังการติดเชื้อ โดยเฉพาะในปัจจุบันที่อาหารกุ้งมีการปรับเปลี่ยนองค์ประกอบของวัตถุดิบในอาหาร เพื่อลดปริมาณการใช้ปลาป่นด้วยแรงกดดันจากตลาดโลก เนื่องมาจากการลดลงของสัตว์น้ำในธรรมชาติที่นำมาผลิตปลาป่น การปรับเปลี่ยนวัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งโปรตีนในอาหารกุ้งอาจส่งผลให้อาหารมีคุณภาพลดลงจนส่งผลต่อสุขภาพของสัตว์น้ำ (Tran et al., 2015; Gerotto et al. 2015; Oanh and Tacon, 2015; Sharon et al., 2016) หรืออาจทำให้กุ้งไวต่อการติดเชื้อและรุนแรงเพิ่มขึ้นหรือไม่ ซึ่งมีการศึกษาที่พบว่า การแทนที่ปลาป่นด้วยกากถั่วเหลือง มีผลกระทบต่อภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำ (Lin and Mui, 2017) และโปรตีนบางชนิดในกากถั่วเหลืองจัดเป็น antigenic proteins ซึ่งอาจก่อให้เกิดการแพ้อย่างรุนแรงในสัตว์น้ำ (Liu et al., 2020)

ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณภาพอาหารลูกกุ้งที่ใช้ทั่วไปในโรงเพาะฟัก และผลกระทบของอาหารต่อสุขภาพลูกกุ้งและความต้านทานต่อโรคโดยการทดสอบการติดเชื้อ Vp_{AHPND} และ EHP โดยทำการศึกษาค้นคว้าทางโภชนาการ การศึกษาลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนของกุ้งซึ่งจะเป็นตัวชี้วัดทางสุขภาพของลูกกุ้ง และการศึกษาความต้านทานต่อโรค

โดยการทดสอบการติดเชื้อ Vp_{AHPND} และ EHP ซึ่งผลที่ได้สามารถนำไปต่อยอดการพัฒนาคุณภาพของอาหารในท้องตลาดให้มีคุณค่าทางโภชนาการที่จะผลต่อสุขภาพลูกกุ้งที่ดีและสามารถสนับสนุนให้กุ้งมีการต้านทานต่อโรคเมื่อนำไปปล่อยเลี้ยงในฟาร์มต่อไป

วิธีการศึกษา

อาหารทดลองและการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ

อาหารสำเร็จรูปที่ใช้ทดลองเลี้ยงลูกกุ้งวัยอ่อนจาก 4 ยี่ห้อที่มีขายในท้องตลาด (F1-F4) ได้แก่ อาหารที่ผลิตในต่างประเทศจำนวน 1 ยี่ห้อ และอาหารที่ผลิตภายในประเทศจำนวน 3 ยี่ห้อ การตรวจสอบคุณภาพโดยวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการพื้นฐาน (proximate composition) ได้แก่ ปริมาณโปรตีน ไขมัน ความชื้น กาก และเถ้า ด้วยวิธี AOAC (2016) ตรวจสอบค่าเถ้าที่ละลายในกรด (acid soluble ash) ด้วยวิธี Animal feeding Stuffs- Determination of ash insoluble in hydrochloric acid based on ISO 5985:2002 ซึ่งบ่งชี้การปลอมปนในอาหารและบ่งชี้ปริมาณแร่ธาตุที่ใช้ประโยชน์ได้ ณ ห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์น้ำชลบุรี และส่งตัวอย่างอาหารไปที่บริษัทห้องปฏิบัติการกลาง ประเทศไทย จำกัด เพื่อตรวจสอบองค์ประกอบของกรดอะมิโน (amino acid profile) ด้วยวิธี In-house method based on Official Journal of the European Communities L257/16 และองค์ประกอบของกรดไขมัน (fatty acid profile) ด้วยวิธี In-house method based on AOAC (2019) 996.06 ซึ่งสามารถบ่งชี้ชนิดและคุณภาพของกรดไขมันที่มีในอาหาร โดยอาหารทดลอง F1 - F3 มีลักษณะเป็นผง และมีขนาดระหว่าง 100 – 500 ไมครอน ส่วนอาหาร F4 มีลักษณะเป็นแผ่น (Flake) เวลาให้อาหารลูกกุ้งจะทำการขยำนาน้ำผ่านผ้ากรองที่มีขนาดตาน้อยกว่า 750 ไมครอนก่อนนำไปให้ลูกกุ้งกิน

การเลี้ยงกุ้งทดลอง

เลี้ยงลูกกุ้ง PL1- PL12 ด้วยอาหารลูกกุ้งวัยอ่อนโดยแบ่งเป็น 4 ชุดการทดลองๆ ละ 3 ซ้ำ โดยใช้อาหารจากแหล่งผลิตต่างกัน แบ่งเป็น ลูกกุ้งที่ได้รับอาหารที่เมือร่วมกับอาหารกุ้งวัยอ่อนนำเข้าจากต่างประเทศ (F1) และลูกกุ้งที่ได้รับอาหารที่เมือร่วมกับอาหารกุ้งวัยอ่อนที่ผลิตภายในประเทศแตกต่างกัน 3 ยี่ห้อ (F2 – F4) นำลูกกุ้งระยะ PL1 จากโรงเพาะฟักเอกชนในจังหวัดสงขลา มาเลี้ยงที่ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำสงขลา (ศสส. สงขลา) ด้วยอาหารทดลอง 4 ยี่ห้อข้างต้น ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ ในถังพลาสติกความจุ 3,000 ลิตร บรรจุ น้ำทะเลความเค็ม 25 ppt จำนวน 12 ถัง ใส่ลูกกุ้งถังละ 10,000 ตัว ให้อาหารวันละ 6 มื้อ โดยให้อาหารที่เมือ 1 มื้อ สลับกับอาหารทดลอง 2 มื้อ ปริมาณอาหารที่ให้ปรับเพิ่มตามอายุกุ้งที่เลี้ยง เปลี่ยนถ่ายน้ำในถังเลี้ยงทุกวัน โดยควบคุมให้คุณภาพน้ำอยู่ในเกณฑ์ที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงกุ้ง ในวันที่ 10 ของการเลี้ยงจะทำการตรวจการเจริญเติบโตของลูกกุ้งโดยประเมินการเข้าระยะ PL10 ของลูกกุ้งที่ได้รับอาหารแต่ละกลุ่ม จำนวน 20 ตัว/ซ้ำ (จำนวน 3 ซ้ำต่อกลุ่ม) จากการตรวจสอบจำนวนกรีของลูกกุ้ง ซึ่งต้องมีจำนวนมากกว่า 3 กรีขึ้นไป นอกจากนี้จะทำการตรวจเชื้อก่อโรค Vp_{AHPND} และ EHP ที่ระยะ PL1 และ PL10 เพื่อให้แน่ใจว่าลูกกุ้งไม่ได้รับเชื้อก่อโรสดังกล่าวตลอดการเลี้ยงและก่อนการทดสอบกับเชื้อ

การศึกษาลักษณะพยาธิสภาพของตับและตับอ่อนของลูกกุ้ง

การศึกษาลักษณะพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนกุ้งตามวิธีการของ Bell และ Lightner, 1988 โดยนำตัวอย่างลูกกุ้งปกติหลังเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน กลุ่มการทดลองละ 20 ตัวแช่ในน้ำยา Davidson's fixative ที่ทิ้งไว้ในน้ำยานาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างลงแช่ใน 70% ethanol และนำเข้าเครื่อง automatic tissue processor จากนั้นทำการ embed ตัวอย่างกุ้งด้วย paraffin ก่อนนำตัวอย่างกุ้งไปตัดด้วยเครื่อง microtome ที่ความหนา 4 ไมครอน และย้อมด้วยสี hematoxylin & eosin แล้วนำตัวอย่างไปศึกษาความผิดปกติของเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การทดสอบความไวในการติดเชื้อ Vp_{AHPND}

เก็บตัวอย่างลูกกุ้งเพื่อตรวจการติดเชื้อ Vp_{AHPND} ด้วยเทคนิค PCR ก่อนเริ่มการทดสอบ หลังจากนั้นเริ่มทดสอบการติดเชื้อ Vp_{AHPND} กับลูกกุ้งระยะ PL12 ที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลอง 4 ยี่ห้อโดยแต่ละกลุ่มการทดลอง มีจำนวน 6 ซ้ำ ซ้ำละ 30 ตัว แบ่งเป็นชุดทดสอบเชื้อจำนวน 3 ซ้ำ และชุดควบคุมที่ไม่ใช่เชื้อจำนวน 3 ซ้ำ การทดสอบความไวในการติดเชื้อ Vp_{AHPND} ในตู้กระจกขนาด (30x50x30 cm) โดยวิธีการแช่เชื้อที่ระดับความเข้มข้นที่ทำให้กุ้งตาย 50% (10^4 CFU/mL) นาน 6 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนถ่ายน้ำเป็นน้ำ

ทะเลความเค็ม 20 ppt ปริมาตร 30 l โดยตรวจสอบปริมาณตั้งต้นของเชื้อแบคทีเรีย Vp_{AHPND} ที่ใช้ด้วยวิธี spread plate บนอาหาร Thiosulfate citrate bile salt sucrose agar (TCBS) สำหรับชุดควบคุมจะทำการแช่กุ้งในน้ำทะเลที่ไม่มีเชื้อ บันทึกอัตรการตาย วันละ 2 ครั้ง (เวลา 9.00 น. และ 15.00 น.) เป็นระยะเวลา 7 วัน

การทดสอบความไวในการติดเชื้อ EHP

การทดสอบความไวของลูกกุ้ง PL12 ที่ได้รับอาหารต่างกัน 4 ยี่ห้อ (F1-F4) ต่อการติดเชื้อ EHP โดยนำกุ้งติดเชื้อ EHP จากฟาร์มเลี้ยงกุ้งจังหวัดจันทบุรี และตรวจยืนยันการติดเชื้อ EHP ด้วยเทคนิค PCR ก่อนนำมาใช้ทดสอบความไวในการติดเชื้อ EHP ดำเนินการทดสอบโดยวิธีการเลี้ยงร่วม (cohabitation) ในถังเลี้ยงพลาสติกขนาด 500 ลิตร ใส่ความเค็ม 20 ppt ปริมาตร 350 ลิตร จำนวน 6 ถัง ซึ่งจะแบ่งเป็น 2 ชุดการทดลองคือ ชุดควบคุม (non-challenge group, N) เลี้ยงลูกกุ้งในถังที่ไม่มีกุ้งติดเชื้อ EHP จำนวน 3 ถัง และชุดทดลอง (EHP challenge group, E) เลี้ยงลูกกุ้งร่วมกับกุ้งติดเชื้อ EHP จำนวน 3 ถัง โดยใส่กุ้งติดเชื้อ EHP จำนวน 10 ตัว ต่อถัง ในแต่ละถังจะนำกุ้งทั้ง 4 กลุ่มทดลอง จำนวนกลุ่มละ 50 ตัว ใส่ตะกร้าแยกและนำลงเลี้ยงในถังเดียวกัน ดังแสดงใน **Figure 1** เลี้ยงลูกกุ้งเป็นระยะเวลา 16 วัน โดยจะเก็บตัวอย่างลูกกุ้งเพื่อตรวจสอบการติดเชื้อ EHP ด้วยเทคนิค Nested PCR และตรวจสอบปริมาณเชื้อ EHP ด้วยเทคนิค Real time PCR

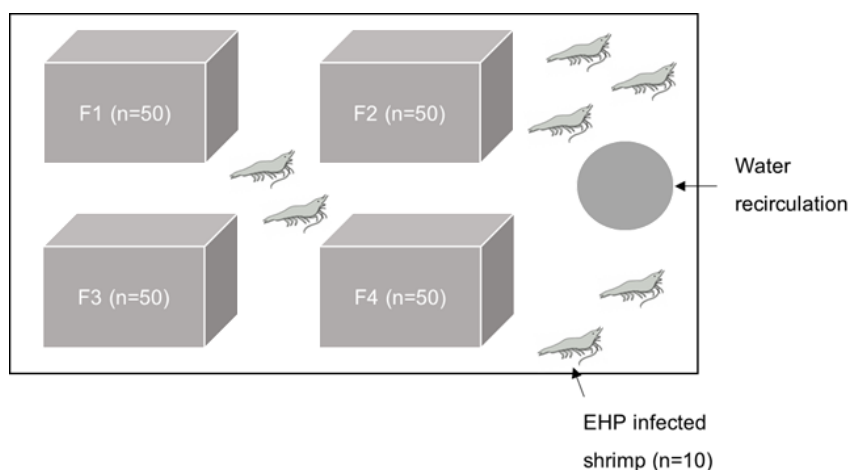


Figure 1 EHP cohabitation model

การตรวจเชื้อ Vp_{AHPND} และ EHP

เก็บตัวอย่างลูกกุ้งทั้งก่อนและหลังการทดสอบความไวในการติดเชื้อก่อโรคทั้ง 2 ชนิด โดยสุ่มเก็บกลุ่มละ 10 ตัว กลุ่มละ 3 ซ้ำ เนื่องจากลูกกุ้งมีขนาดเล็กจึง pool 2 ตัวเป็น 1 ตัวอย่าง ใส่ในหลอดเก็บตัวอย่างขนาด 1.5 ml ที่บรรจุน้ำยา DNA lysis buffer (50 mM Tris pH 9, 0.1M EDTA pH 8, 50 mM NaCl, 2% SDS, 100 µg/ml proteinase K) หลังจากนั้นสกัด DNA โดยใช้ชุดสกัด QIAamp® DNA Mini Kits (Qiagen) แล้ววัดความเข้มข้นและคุณภาพของ DNA ด้วยเครื่อง spectrophotometer (Nanodrop 200c, Thermo scientific) ก่อนนำไปตรวจการติดเชื้อด้วยเทคนิค PCR และ Real time PCR

การตรวจเชื้อด้วยวิธี nested PCR ของแบคทีเรียก่อโรค AHPND (Vp_{AHPND}) ตามวิธีการของ Dangtip et al. (2015) และตรวจเชื้อ EHP โดยใช้เทคนิค SWP-PCR (Jaroenlak et al., 2016) โดยชุด primers ที่ใช้ในการตรวจและขนาดของ PCR amplicon แสดงไว้ใน **Table 1** ในการตรวจเชื้อทั้ง Vp_{AHPND} และ EHP จะเตรียมน้ำยา PCR สำหรับแต่ละขั้นตอนของ first PCR และ nested PCR ที่ปริมาตร 12.5 µl ซึ่งจะประกอบด้วย 1X OneTaq Hot Start Master Mix (NEB) และ 0.2 µM ของ primer ที่ใช้ในการตรวจเชื้อในแต่ละขั้นตอน ในขั้นตอน first PCR แต่ละตัวอย่างใช้ total DNA เท่ากับ 100 ng และใช้ DNA ตัวอย่างจาก first PCR 1 µl

ในขั้นตอน nested PCR หลังจากนั้นตรวจสอบ PCR amplicons ด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis และย้อมด้วยสี ethidium bromide ก่อนส่องภายใต้ UV ด้วย เครื่อง Gel documentation (Gel Doc™ EZ Imager, BIORAD)

การศึกษา EHP copy numbers ด้วยเทคนิค real time PCR ตามวิธีการของ Munkongwongsiri et al., 2021 โดยใช้น้ำยา SYBR Green-qPCR analysis มีปริมาตรรวมต่อตัวอย่างเท่ากับ 20 µl ประกอบด้วย 1X SYBR Green PCR Master mix, ตัวอย่าง DNA 100 ng, 0.2 µM of SWP-1F และ SWP-2R primer สำหรับการสร้าง standard curve จะดำเนินการโดยใช้ EHP-SWP plasmid ที่ความเข้มข้น 0 - 10⁶ (0, 100, 10³, 10⁵, 10⁶) copies/µl ปริมาณ copy ของ EHP จะถูกแปลผลโดย ABI Prism 7500 Sequence detection software (AB Applied Biosystems Easter City, CA)

Table 1 PCR primers used, their amplicon sizes and purpose in this study

Primer name	Sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)	Purpose
VP _{AHPND} toxin genes (First step PCR)			PCR detection of Vp _{AHPND}
AP4_F1	5'-ATGAGTAACAATATAAAACATGAAAC-3'	1,269 bp	
AP4_R1	5'-ACGATTTTCGACGTTCCCCAA-3'		
VP _{AHPND} toxin genes (Nested step PCR)			
AP4_F2	5'-TTGAGAATACGGGACGTGGG-3'	230 bp	
AP4_R2	5'-GTTAGTCATGTGAGCACCTTC-3'		
SWP-PCR (First step)			PCR detection of EHP
SWP_1F	5'-TTGCAGAGTGTGTTAAGGGTTT-3'	514 bp	
SWP_1R	5'-CACGATGTGTCTTTGCAATTTTC-3'		
SWP-PCR (Nested step)			
SWP_2F	5'-TTGGCGGCACAATTCTCAAACA-3'	148 bp	
SWP_2R	5'-GCTGTTTGTCTCCAAGTATTGGA-3'		

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำผลข้อมูลที่ได้ในแต่ละการทดลองมาตรวจสอบการกระจายตัวของข้อมูล หากมีการกระจายแบบปกติ (normal distribution) จะนำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของแต่ละกลุ่มการทดลองด้วย one way ANOVA analysis และ Duncan's multiple range test หากข้อมูลไม่ได้มีการแจกแจงแบบปกติ จะใช้วิธีวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแต่ละกลุ่มทดลองด้วยวิธี Kruskal-Wallis test โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics 22

ผลการศึกษา

คุณค่าทางโภชนาการของอาหารที่แตกต่างกันทั้ง 4 แหล่ง

อาหารลูกกุ้งวัยอ่อนจาก 4 แหล่งผลิต มีปริมาณโปรตีน ไขมัน กาก และเถ้าแตกต่างกัน ดังแสดงใน Table 2 อาหาร F1 มีปริมาณโปรตีนสูงสุด และแตกต่างกับอีก 3 กลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในขณะที่อาหาร F2 มีปริมาณไขมันสูงสุด และแตกต่างกับอีก 3 กลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และพบว่าอาหาร F4 มีปริมาณกาก และเถ้าสูงสุด และแตกต่างกับอีก 3 กลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

Table 2 Nutrition value of 4 postlarval feed brands

Feed brands	Nutrition value (g/100 g feed)			
	Crude protein	Fat	Fiber	Ash
F1	61.34±0.09 ^a	10.37±0.20 ^{bc}	3.06±0.04 ^b	14.53±0.08 ^b
F2	56.78±0.42 ^b	13.28±0.09 ^a	1.14±0.11 ^d	9.88±0.03 ^d
F3	45.48±0.17 ^d	10.82±0.36 ^b	1.76±0.06 ^c	10.47±0.01 ^c
F4	49.75±0.13 ^c	8.27±0.27 ^d	4.66±0.03 ^a	15.34±0.02 ^a

Note: The different superscript letters in the same column represent significant difference ($p < 0.05$)

ผลการวิเคราะห์กรดอะมิโนรวมและกรดอะมิโนจำเป็นในอาหารทดลองทั้ง 4 ยี่ห้อ แสดงใน **Table 3** พบว่าอาหาร F2 มีปริมาณกรดอะมิโนรวมสูงสุด รองลงมาคืออาหาร F3, F4 และ F1 ตามลำดับ เช่นเดียวกับกรดอะมิโนที่จำเป็น (essential amino acids: EAA) ที่พบในอาหาร F2 มีค่าสูงสุด รองลงมาคืออาหารจากแหล่ง F3, F1 และ F4 ตามลำดับ

Table 3 Total amino acid and essential amino acid components of 4 postlarval feed brands

Amino acid profiles	g/100 g feed				Requirement in Penaeid shrimp (ref.)
	F1	F2	F3	F4	
Alanine	1.80	3.11	2.62	0.90	
Arginine*	2.43	3.36	3.52	3.34	2.5% (Chen et al., 1992)
Aspartic acid	3.42	4.77	3.52	3.24	
Cystine	0.32	0.45	0.36	0.28	
Glutamic acid	2.90	4.38	5.15	2.90	
Glycine	1.80	2.84	2.20	12.22	
Histidine*	1.01	1.17	1.05	0.80	0.42 - 1.17% (Millamena et al., 1999)
Hydroxyproline	0.54	0.54	0.36	0.36	
Isoleucine*	1.26	1.56	1.46	0.76	0.52 - 2.02% (Millamena et al., 1999)
Leucine*	2.34	2.95	2.73	1.64	0.95 - 2.95% (Millamena et al., 1999)
Lysine*	3.28	4.56	3.13	3.10	1.6 - 2.1% (NRC, 2011).
Methionine*	0.65	1.63	0.68	0.68	0.7 - 0.9% (NRC, 2011).
Phenylalanine*	1.63	1.86	1.72	1.20	0.62 - 2.12% (Millamena et al., 1999)
Proline	3.70	3.92	4.72	1.95	
Serine	1.36	1.85	1.71	1.10	
Threonine*	1.24	1.75	1.38	1.14	1.4% (Millamena et al., 1997)
Tryptophan*	0.60	0.66	0.51	0.51	0.2% (Millamena et al., 1999)
Tyrosine	1.05	1.36	1.11	0.88	
Valine*	1.42	1.99	1.80	0.77	
Glutamine	3.44	4.13	3.40	2.75	
Taurine	0.08	0.51	0.06	0.37	
Total amino acids	36.27	49.35	43.19	40.89	
Total EAA*	15.86	21.49	17.98	13.94	

ผลการวิเคราะห์กรดไขมันรวม (total fatty acids) ในอาหารทดลองทั้ง 4 ยี่ห้อ แสดงไว้ใน **Table 4** พบว่าอาหาร F2 มีปริมาณ 4.91 g/100 g feed ซึ่งมีความน้อยที่สุด อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาปริมาณ n-3 PUFA ซึ่งเป็นกรดไขมันที่จำเป็นพบว่าอาหาร F3 มีปริมาณต่ำสุด เมื่อเปรียบเทียบกับอีก 3 แหล่ง ที่มีค่าใกล้เคียงกัน สำหรับสัดส่วนของกรดไขมัน n-3/n-6 PUFA มีค่าสูงสุดในอาหาร F2 รองลงมาได้แก่ อาหาร F1 สำหรับอาหาร F3 และ F4 มีค่าใกล้เคียงกัน

Table 4 Fatty acid profiles of 4 postlarval feed brands

Fatty acid profiles	g/100 g feed				Requirement in Penaeid shrimp (ref.)
	F1	F2	F3	F4	
<u>Polyunsaturated Fatty Acids</u>					
Linoleic acid	0.81	0.34	0.98	1.67	
Linolenic acid	0.21	0.12	0.08	0.20	
Arachidonic acid; ARA	0.06	0.03	0.06	0.16	
Eicosapentaenoic acid; EPA	0.45	0.38	0.33	0.22	0.5% (Gonzalez-Félix et al., 2003)
Docosahexaenoic acid; DHA	0.58	0.57	0.33	0.72	0.5% (Gonzalez-Félix et al., 2003)
Total fatty acid	6.36	4.91	6.38	6.57	
n-3 PUFA	1.24	1.07	0.74	1.14	1% (Kanazawa et al., 1979)
n-6 PUFA	0.89	0.39	1.04	1.87	
SFA	2.69	1.68	3.27	2.43	
MUFA	1.54	1.77	1.33	1.13	
PUFA	2.13	1.46	1.78	3.01	
HUFA	1.03	0.95	0.66	0.94	
n-3/n-6 PUFA	1.39	2.74	0.71	0.61	2.5 Glencross et al. (2002)
DHA/EPA	1.29	1.50	1.00	3.27	

ผลการเจริญเติบโตของลูกกุ้งหลังได้รับอาหารเป็นระยะเวลา 10 วัน

ผลการประเมินการเข้าระยะ PL10 ของลูกกุ้งที่ได้รับอาหารแตกต่างกัน 4 แหล่ง พบว่า ลูกกุ้งที่ได้รับอาหาร F4 มีเปอร์เซ็นต์การเข้าระยะ PL10 สูงที่สุด เท่ากับ $100.00 \pm 0.00\%$ รองลงมาได้แก่ ลูกกุ้งที่ได้รับอาหาร F2 และ F3 เท่ากับ $96.67 \pm 5.77\%$ และ $93.33 \pm 11.55\%$ ตามลำดับ ส่วนลูกกุ้งที่ได้รับอาหาร F1 มีเปอร์เซ็นต์การเข้าระยะ PL10 ต่ำที่สุด เท่ากับ $91.67 \pm 2.89\%$ แต่อย่างไรก็ตามเปอร์เซ็นต์การเข้าระยะของลูกกุ้งทั้ง 4 กลุ่มไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.467$)

ผลการตรวจเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนของลูกกุ้ง PL10 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร 4 แหล่ง

พยาธิสภาพเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนของลูกกุ้ง PL10 ที่ได้รับอาหารทั้ง 4 แหล่ง มีลักษณะปกติ โดยมีลักษณะของเซลล์เยื่อหุ้มที่สมบูรณ์ สามารถแยกความแตกต่างของ B-cell, F-cell และ R-cell ได้อย่างชัดเจน ตลอดจนการสะสมไขมันและสารอาหารเป็นปกติและไม่แตกต่างกันระหว่าง 4 กลุ่มการทดลอง (Figure 2) อย่างไรก็ตาม พบเซลล์เยื่อหุ้มที่หดตัว (Atrophy) คิดเป็นจำนวน 5-10% ของตัวอย่างกุ้งทั้ง 4 กลุ่ม (Figure 3A) และมีความแตกต่างของเนื้อเยื่อตับในลูกกุ้ง PL10 ที่ได้รับอาหาร F1 โดยพบการเกิด Aggregated transformed microvilli (ATM) ในลูกกุ้งคิดเป็นจำนวน 45% ของตัวอย่างลูกกุ้งที่ตรวจ แต่ยังไม่ส่งผลกระทบต่อเซลล์เยื่อหุ้มที่สมบูรณ์ (Figure 3B) นอกจากนี้ในลูกกุ้งที่ได้รับอาหาร F3 และ F4 มีการสะสมของสิ่งตกค้างที่กุ้งไม่สามารถย่อยได้ สีสน้ำตาลทั้งในท่อตับและตับอ่อนและในเซลล์เยื่อหุ้มที่หดตัว โดยเฉพาะในลูกกุ้งกลุ่ม F4 ที่พบในทุกตัวอย่าง (Figure 3C – 3D)

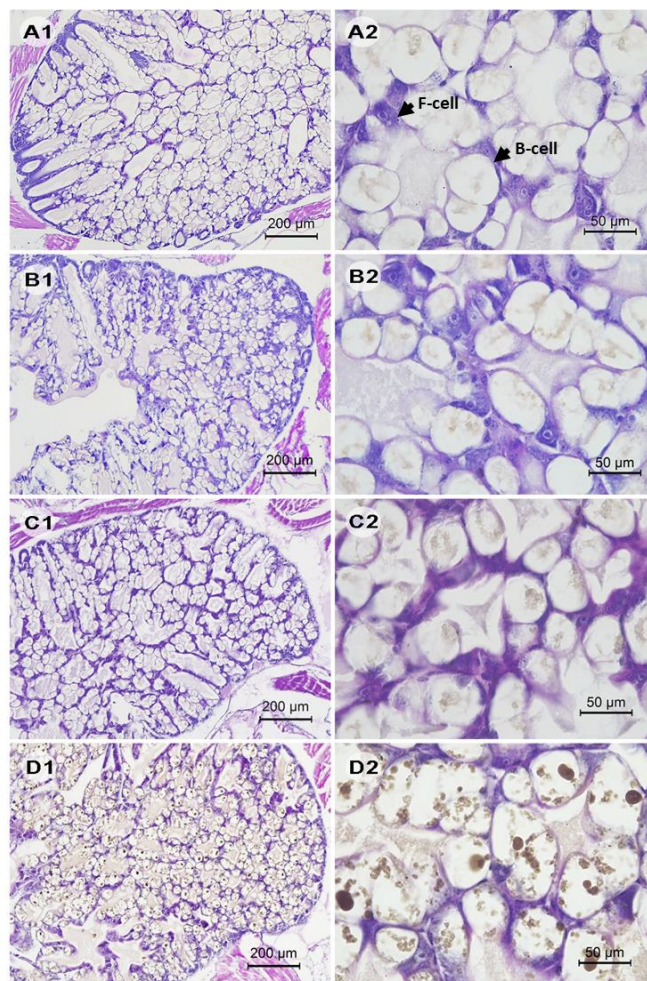


Figure 2 Photomicrograph of H&E stained hepatopancreatic epithelial cells of postlarvae fed by 4 different postlarval feed brands (A = F1, B = F2, C = F3 and D = F4). Most of PL's hepatopancreas from all feeding groups presenting normal characteristics of each HP cell types (Column A and B = 10x and 40x magnification, respectively)

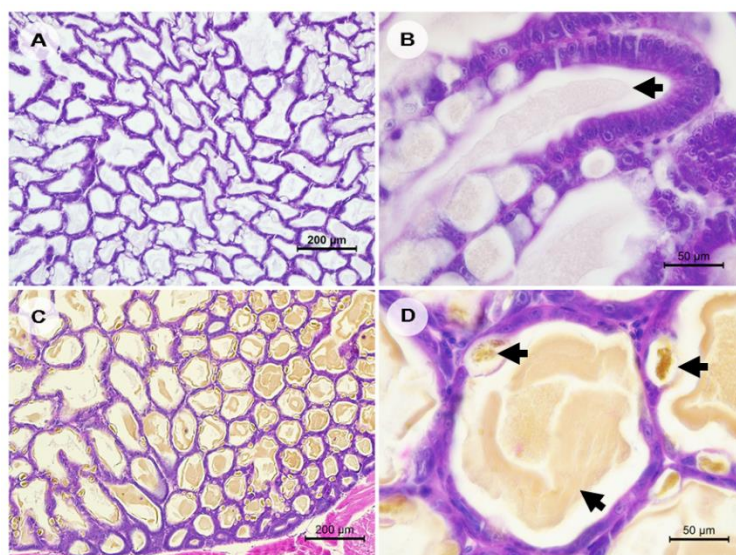


Figure 3 Photomicrograph of hepatopancreatic epithelial pathology of postlarvae fed by 4 different postlarval feed brands. (A) Atrophic HP epithelium of overall area, (B) Aggregated transform microvilli (ATM) in HP lumen (arrow), (C and D) Non-digestible particle in B-cell and HP lumen (arrow) at 4x and 10x magnification.

ผลการทดสอบความไวในการติดเชื้อ Vp_{AHPND}

เมื่อนำลูกกุ้ง PL12 ที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลอง 4 แหล่งผลิต มาทดสอบการติดเชื้อก่อโรคด้วยไวรัสเฉียบพลัน (Vp_{AHPND}) โดยวิธีการแช่ที่ระดับเชื้อ $2.60 \pm 0.37 \times 10^4$ CFU/ml นาน 6 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนถ่ายน้ำ พบว่ากุ้งเริ่มตายที่ 21 ชั่วโมงหลังการแช่เชื้อ อัตราการรอดตายสะสมหลังแช่เชื้อ 7 วัน ของกุ้งชุดที่เลี้ยงด้วยอาหาร F2 มีอัตราการรอดตายสูงสุด 83.3% ต่างจากชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) รองลงมาได้แก่ลูกกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหาร F1, F4 และ F3 มีอัตราการรอดตายสะสมที่ 71.1%, 70.0% และ 65.6 % ตามลำดับ (Figure 4)

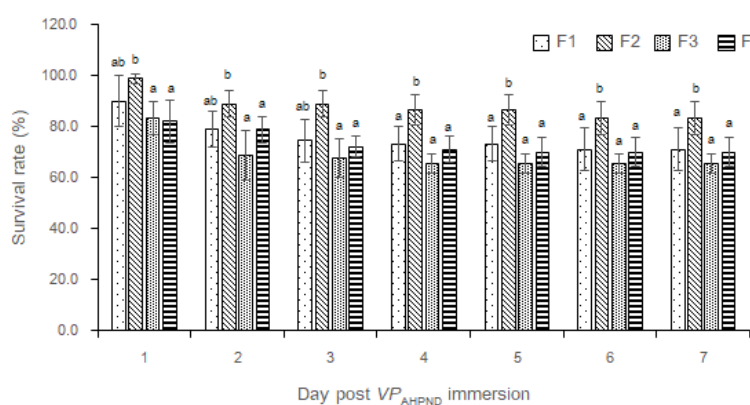


Figure 4 Survival rate of postlarvae 12 fed by 4 different postlarval feed brands after immersion challenge test by Vp_{AHPND} . The different superscript letters in the same day represent significant differences ($p < 0.05$).

การทดสอบความไวต่อการติดเชื้อ EHP

เนื่องจากในระหว่างการเลี้ยงกุ้งมีอุบัติเหตุปั๊มให้อากาศดับ ทำให้สูญเสียจากการทดลองไป 1 ถัง ผลที่ได้หลังจากทดสอบการติดเชื้อ EHP โดยการเลี้ยงร่วม (co-habitation) เป็นระยะเวลา 16 วัน ผลการตรวจสอบปริมาณเชื้อ EHP ในลูกกุ้งที่ได้รับอาหารทดลอง

แต่ละกลุ่มด้วยเทคนิค real time PCR ผลการตรวจแสดงดัง **Figure 5** โดยพบว่าจำนวนของเชื้อ EHP ในแต่ละตัวอย่างกึ่งภายในกลุ่มของแต่ละกลุ่มมีความแตกต่างกันอย่างมาก และไม่ได้มีการกระจายแบบปกติ กึ่งกลุ่มที่ได้รับอาหารแหล่ง F2 มีปริมาณ EHP น้อยที่สุด ($1.44 \pm 2.26 \times 10^3$ copies/ng DNA) รองลงมาคือกึ่งที่ได้รับอาหาร F1 ($2.24 \pm 3.25 \times 10^3$ copies/ng DNA) F3 ($4.05 \pm 5.02 \times 10^3$ copies/ng DNA) และกึ่งที่ได้รับอาหารแหล่ง F4 มีการติดเชื้อสูงที่สุด ($6.57 \pm 8.77 \times 10^3$ copies/ng DNA) เมื่อทำการทดสอบความแตกต่างระหว่างปริมาณเชื้อที่แต่ละกลุ่มทดลองได้รับ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p = 0.179$)

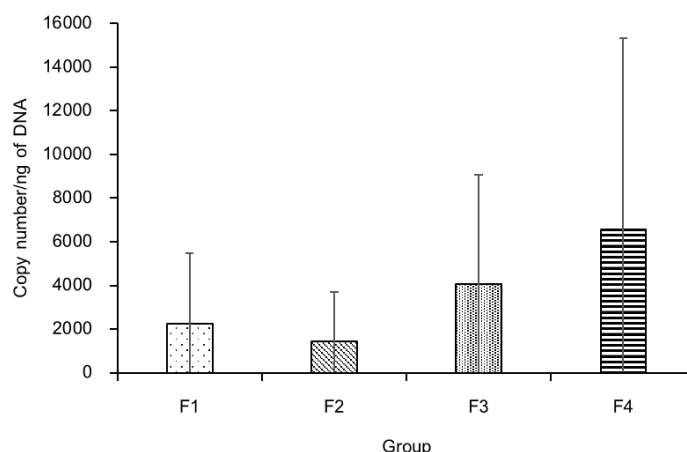


Figure 5 Mean $\pm$ SD of the quantity of EHP (copy number per ng DNA) in postlarvae fed by 4 different postlarval feed brands after cohabitation with EHP infected shrimp for 16 days

วิจารณ์

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าอาหารลูกกุ้งวัยอ่อนที่จำหน่ายในท้องตลาด มีคุณค่าทางโภชนาการพื้นฐานแตกต่างกัน โดยมีโปรตีน 45-61% และไขมัน 8-13% กาก 1-4% และเถ้า 9-15% ลูกกุ้งขาวแวนนาไม่มีความต้องการโปรตีนสำหรับการเจริญเติบโตอยู่ในช่วง 30-60% (Coursin et al., 1993; Xie et al., 2020) จากข้อมูลของ NRC (2011) ได้แนะนำระดับความต้องการโปรตีนของลูกกุ้งขาวแวนนาไม่ไว้ที่ 40-45% นอกจากนี้ปริมาณไขมันในอาหารระหว่าง 11.8 – 12.4% ทำให้ลูกกุ้งมีอัตราการรอดและความแข็งแรงดี (Xie et al., 2019) ตามมาตรฐานอาหารลูกกุ้งเพื่อขอขึ้นทะเบียนอาหารสัตว์น้ำกับกรมประมงระบุว่า อาหารลูกกุ้งระยะ PL5 - PL15 ต้องมีองค์ประกอบของโปรตีนไม่น้อยกว่า 40% ไขมันไม่น้อยกว่า 6% และกากไม่มากกว่า 3% (กรมประมง, มปป.). ดังนั้นอาหารลูกกุ้งทุกยี่ห้อที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีระดับคุณค่าทางอาหารที่เพียงพอต่อความต้องการของลูกกุ้ง ยกเว้นอาหาร F4 มีค่ากากมากเกินไปมาตรฐานของกรมประมง

อาหารลูกกุ้ง F1 แม้มีปริมาณโปรตีนรวมสูงที่สุดที่ 61% แต่กลับพบว่าปริมาณกรดอะมิโนที่ต่ำกว่าอาหารอีก 3 กลุ่มอย่างชัดเจน แสดงให้เห็นว่าการตรวจเพียงปริมาณโปรตีนรวมอาจไม่สามารถบ่งชี้ถึงคุณภาพของวัตถุดิบอาหารที่ใช้ซึ่งจะส่งผลต่อคุณภาพอาหารโดยรวมที่ผลิตออกมาได้ องค์ประกอบของกรดอะมิโนนั้น มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของลูกกุ้งโดยตรง NRC (2011) ระบุว่า ลูกกุ้งวัยอ่อนมีความต้องการทั้งกรดอะมิโนชนิดจำเป็น 10 ชนิด และกรดอะมิโนชนิดไม่จำเป็น (non-essential amino acid) ที่มีคุณสมบัติในการเพิ่มการกินอาหารในกุ้งทะเล (*P. japonicus*) ได้แก่ glycine taurine และ serine ส่วนชนิดที่มีคุณสมบัติในการเพิ่มความอยากกินอาหาร (palatability) ได้แก่ aspartic acid, glutamic acid, proline, และ betaine (Deshimaru and Yone, 1978) สำหรับอาหารทั้ง 4 ยี่ห้อที่ใช้เลี้ยงลูกกุ้งในการทดลองนี้ พบว่าอาหาร F2 มีค่ากรดอะมิโนจำเป็นทุกตัว ยกเว้น Arginine สูงกว่าอาหารอีก 3 ยี่ห้อ โดยเฉพาะในกรดอะมิโน Methionine และ Threonine ที่พบว่าในอาหาร F1, F3 และ F4 มีค่าต่ำกว่าเกณฑ์ (Millamena et al., 1997; NRC, 2011) แสดงให้เห็นถึงวัตถุดิบที่ใช้แตกต่างกัน แม้จะให้ปริมาณโปรตีนรวมที่อยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน แต่กลับขาดกรดอะมิโนบางตัวไป

ในส่วนระดับความต้องการไขมันในอาหารลูกกุ้งวัยอ่อนนั้น มีความต้องการมากกว่ากุ้งในระยะวัยรุ่นและเต็มวัย โดยพิจารณาจากอัตราการเจริญเติบโตและการตอบสนองต่อพลังงานในขบวนการเมตาบอลิซึมของสัตว์น้ำ Jones et al. (1979) cited after NRC (2011) พบว่ากุ้ง *P. japonicus* วัยอ่อน มีความสามารถจำกัดในการสังเคราะห์กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว (n-3 และ n-6 PUFA) ให้เป็นกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวสายยาว (n-3, n-6 LC-PUFA) ได้ โดยเฉพาะกรดไขมันชนิด EPA และ DHA โดยกรดไขมันชนิด DHA มีรายงานว่ามีความสำคัญต่อการเจริญเติบโต และมีงานวิจัยที่ระบุว่าลูกกุ้งระยะ postlarva ได้รับอาหารที่มี DHA 1.2% มีผลทำให้การเจริญเติบโตที่ดี ซึ่งปริมาณ DHA ในอาหารลูกกุ้งนั้นมากกว่ากุ้งวัยรุ่นถึง 5 เท่า (Wang et al., 2017) แสดงถึงความต้องการ DHA ที่สูงกว่ากุ้งวัยรุ่น นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า ควรจะมีปริมาณของ EPA และ DHA รวมกันไม่เกิน 1% ของอาหาร สำหรับกุ้ง *P. japonicus* ในขณะที่ลูกกุ้งกลุ่ม penaeid มีความต้องการ n -3 PUFA ในอาหารอย่างน้อย 1% (Kanazawa et al., 1979) ซึ่งปริมาณที่เหมาะสมของ EPA และ DHA ต่อลูกกุ้งกุลาดำอยู่ระหว่าง 0.5 – 1.0% ของอาหาร (Chen and Tsai, 1986) และควรมีค่าอัตราส่วนของ DHA/EPA เท่ากับ 1 ซึ่งในอาหารทดลองลูกกุ้งทั้ง 4 ยี่ห้อพบว่า มีปริมาณ DHA, EPA ปริมาณ DHA และ EPA รวม และปริมาณ n -3 PUFA ใกล้เคียงกันและอยู่ในระดับที่เหมาะสม สอดคล้องกับผลการเจริญเติบโตของลูกกุ้งโดยตรวจสอบจากการเข้าระยะ PL10 พบว่าลูกกุ้งที่ได้รับอาหารแตกต่างกันทั้ง 4 กลุ่ม มีปริมาณลูกกุ้งที่เข้าระยะ PL10 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

การศึกษาสุขภาพของลูกกุ้งจากเนื้อเยื่อตับและตับอ่อน พบว่าลูกกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารทั้ง 4 สูตรมีลักษณะเนื้อเยื่อโดยรวมเป็นปกติ อย่างไรก็ดี พบว่าลูกกุ้งที่ได้รับอาหาร F1 มีการพัฒนาลักษณะ ATM ในตับและตับอ่อน ในขณะที่อาหารชนิดอื่นไม่มี ATM ซึ่งมีการรายงานว่าลักษณะ ATM มีความสัมพันธ์กับการเกิดอาการกุ้งซีขาว (Sriurairatana et al., 2014) อย่างไรก็ตามไม่พบการเกิดซีขาวระหว่างการเลี้ยงด้วยอาหาร F1 ตลอด 10 วันของการให้อาหาร ดังนั้นจึงมีข้อสังเกตว่าการเลี้ยงลูกกุ้งด้วยอาหารสูตรนี้ต่อไป อาจทำให้กุ้งพัฒนาอาการซีขาวและทำให้การเจริญเติบโตลดลงหรือไม่ ส่วนลูกกุ้งกลุ่มที่ได้รับอาหาร F3 และ F4 พบลักษณะคล้ายอาหารหลงเหลือหรือ debris อยู่ในเซลล์และตับและตับอ่อนจำนวนมาก โดยเฉพาะกลุ่ม F4 ที่พบในทุกตัวอย่างลูกกุ้ง ซึ่งอาจความเป็นไปได้ว่าลูกกุ้งไม่สามารถย่อยและดูดซึมบางองค์ประกอบของอาหาร F3 และ F4 ได้ ซึ่งสอดคล้องกับค่ากากของอาหาร F4 ที่สูงเกินค่ามาตรฐานของกรมประมง

จากผลของคุณภาพอาหารต่อการติดเชื้อมีโรคตับวายเฉียบพลัน (Vp_{AHPND}) พบว่าอาหารลูกกุ้งจากแหล่งผลิตต่างกันส่งผลให้อัตรารอดตายของลูกกุ้งหลังได้รับเชื้อ Vp_{AHPND} ต่างกัน โดยลูกกุ้ง PL12 ที่เลี้ยงด้วยอาหารจากแหล่ง F2 มีอัตราการรอดตายหลังการแช่เชื้อ Vp_{AHPND} สูงกว่าและแตกต่างกับกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารอีก 3 แหล่งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อพิจารณาข้อมูลโภชนาการของอาหารแหล่ง F2 พบว่ามีคุณค่าทางโภชนาการหลายค่าที่สูงกว่าอาหารอีก 3 แหล่ง ได้แก่ กรดอะมิโนรวม กรดอะมิโนจำเป็นรวมซึ่งอาจมีส่วนสำคัญที่ทำให้ลูกกุ้งชุดนี้มีความต้านทานเชื้อ Vp_{AHPND} ดีกว่าลูกกุ้งที่ได้รับอาหารชุดอื่นๆ

การเปรียบเทียบความไวของลูกกุ้งต่อการติดเชื้อ EHP หลังได้รับอาหาร 4 สูตร พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ทั้งจำนวนกุ้งติดเชื้อ และปริมาณเชื้อเฉลี่ยต่อตัวของกุ้งแต่ละกลุ่ม ซึ่งกลไกการติดเชื้อ EHP ที่เป็นการติดเชื้อแบบเรื้อรัง ในขณะที่การติดเชื้อแบบที่เรีย Vp_{AHPND} เป็นการติดเชื้อแบบเฉียบพลันรุนแรง (acute infection) จึงทำให้ผลที่ได้มีความแตกต่างอย่างเห็นได้ชัดระหว่างกลุ่มทดลอง อาหารลูกกุ้งวัยอ่อนจึงไม่ใช่สาเหตุโดยตรงที่แน่ชัดหรือสาเหตุหลักที่ทำให้ลูกกุ้งมีความไวต่อการติดเชื้อ EHP มากขึ้นทั้งภายในโรงเพาะฟักหรือหลังปล่อยลงเลี้ยงในฟาร์ม

สรุป

การพัฒนาอาหารลูกกุ้งให้อยู่ในเกณฑ์ที่เหมาะสม จะสามารถส่งเสริมให้กุ้งมีสุขภาพที่ดีและมีอัตราการสูง เมื่อได้รับเชื้อก่อโรคที่รุนแรง การศึกษาผลกระทบของอาหารสำเร็จรูปลูกกุ้งวัยอ่อนจำนวน 4 ยี่ห้อต่อสุขภาพและความไวต่อการติดเชื้อมีโรค ผลการศึกษาพบว่าลูกกุ้งที่ได้รับอาหารทั้ง 4 ยี่ห้อมีการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) แต่มีความไวต่อการติดเชื้อมีโรค Vp_{AHPND} ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ค่าจาก proximate analysis พบว่าคุณค่าทางโภชนาการของอาหารสำเร็จรูปสำหรับลูกกุ้งขาวแวนนาไมทั้ง 4 ยี่ห้อมีความแตกต่างกัน โดยเฉพาะรูปแบบกรดอะมิโนและกรดไขมันอย่างเห็นได้ชัด ผลการทดลองดังกล่าวบ่งชี้ว่าการวิเคราะห์ด้วย proximate analysis อย่างเดียวอาจไม่เพียงพอต่อการประเมินคุณภาพและคุณค่าทางโภชนาการของอาหารลูกกุ้งแวนนาไม

คำขอบคุณ

ทางคณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณสำนักพัฒนาการวิจัยเพื่อการเกษตร (องค์การมหาชน) สำหรับทุนวิจัยภายใต้ชื่อโครงการผลกระทบของคุณภาพอาหารต่อสุขภาพและความไวในการติดเชื้อ EHP และ *Vp_{AHPND}* ในกุ้งขาวแวนนาไม (*Penaeus vannamei*) รหัสโครงการ PRP6105021750

เอกสารอ้างอิง

- กรมประมง. มปป. หลักเกณฑ์ประกอบการพิจารณาการขอขึ้นทะเบียนอาหารสัตว์น้ำ กรมประมง. แหล่งข้อมูล: https://www4.fisheries.go.th/local/file_document/20210225152446_new.pdf. ค้นเมื่อ 21 สิงหาคม 2565.
- วารินทร์ ธนาสมหวัง. 2557. การศึกษาระบาดวิทยา ปัจจัยสาเหตุ และแนวทางการแก้ไขปัญหาโรคตายด่วน ในกุ้งทะเลของประเทศไทย. กรุงเทพฯ:กรมประมง.
- Bell, T.A., and D.V. Lightner. 1988. A handbook of normal penaeid shrimp histology. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA.
- AOAC. 2016. Official Methods of Analysis of AOAC International. 20th ed., Virginia.
- AOAC. 2019. Official Methods of Analysis of AOAC International. 21th ed., Virginia.
- Chayaburakul, K., G. Nash, P. Pratanpipat, S. Sriurairatana, and B. Withyachumnarnkul. 2004. Multiple pathogens found in growth-retarded black tiger shrimp *Penaeus monodon* cultivated in Thailand. Diseases of Aquatic Organisms. 60: 89-96.
- Chen, H.Y., and R.H. Tsai. 1986. The dietary effectiveness of Artemia nauplii and microencapsulated food for postlarval *Penaeus monodon*. In: Chuang, J.L., Shiau, S.Y. (Eds.), Research and Development of Aquatic Animal Feed in Taiwan. I.F.S.T. Monograph Series No. 5, vol. 1. Fisheries Society of Taiwan. Taipei, 73 – 79.
- Chen H.Y., Y.T. Len, and I Roelants. 1992. Quantification of arginine requirements of juvenile marine shrimp *Penaeus monodon* using microencapsulated arginine. Marine Biology. 114: 229-233.
- Cousin, M., G. Cuzon, E. Blanchet, F Ruelle, and AQUACOP. 1993. Protein requirements following an optimum dietary energy to protein ratio for *Litopenaeus vannamei* juveniles. In Fish Nutrition in Practice. Proceedings of the Aquaculture Feed Processing and Nutrition Workshop (ed. S. J. Kaushik and P. Luquet), 599-606. Paris: INRA.
- Dangtip, S., R. Sirikharin, P. Sanguanrut, S. Thitamadee, K. Sritunyalucksana, S. Taengchaiyaphum, R. Mavichak, P. Proespraiwong, and T.W. Flegel. 2016. AP4 method for two-tube nested PCR detection of AHPND isolates of *Vibrio parahaemolyticus*. Aquaculture Reports. 2: 158-162.
- Deshimaru, O., and Y. Yone. 1978. Effect of dietary supplements on the feeding behavior of prawn. Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish. 44(8): 903-905.
- FAO. 2013. Report of the FAO/MARD Technical Workshop on Early Mortality Syndrome (EMS) or Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome (AHPNS) of Cultured Shrimp (under TCP/VIE/3304). Hanoi, Viet Nam, on 25–27 June 2013. FAO Fisheries and Aquaculture Report. 1053, 54 pp.
- Gerotto, A., P.V. Mantoan, H.H. Gaeta, and A. Augusto. 2015. The Effect of Three commercial feeds used in aquaculture hatcheries on physiology of the prawn *Macrobrachium amazonicum* (DECAPODA, PALAEMONIDAE). Boletim do Instituto de Pesca. 41(4): 1013–1024.
- Ha, N.T.H., D.T. Ha, N.T. Thuy, and V.T.K. Lien. 2010. *Enterocytozoon hepatopenaei* has been detected parasitizing tiger shrimp (*Penaeus monodon*) cultured in Vietnam and showing white feces syndrome (In Vietnamese

- with English abstract). Journal of Agriculture and Rural Development: Science Technology. 12: 45–50 (translation from Vietnamese).
- Hudson, D.A., N.B. Hudson, and S.B. Pyecroft. 2001. Mortalities of *Penaeus japonicus* prawns associated with microsporidean infection. Australian veterinary journal. 79: 504-505.
- ISO 5985:2002. Animal feeding Stuffs- Determination of ash insoluble in hydrochloric acid. 2nd edition.
- Jaroenlak, P., P.Sanguanrut, B. A. Williams, G. D. Stentiford, T. W. Flegel, K. Sritunyalucksana, and O. Itsathitphaisarn. 2016. A nested PCR assay to avoid false positive detection of the microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in environmental samples in shrimp farms. PloS one. 11(11): e0166320.
- Kanazawa, A., S. Teshima, and S.Tokiwa. 1979. Biosynthesis of fatty acids from palmitic acid in the prawn, *Penaeus japonicus*. Mem. Fac. Fish., Kagoshima Univ. 28: 17–20.
- Lin, Y.H. and J.J. Mui. 2017. Comparison of dietary inclusion of commercial and fermented soybean meal on oxidative status and non-specific immune responses in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Fish and Shellfish Immunology. 63: 208-212.
- Liu T., G. Zhang, Y. Feng, C. Kong, C.L. Ayisia, X. Huang, and X. Hua. 2019. Dietary soybean antigen impairs growth and health through stress-induced non-specific immune responses in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Fish and Shellfish Immunology. 84: 124–129.
- Millamena O.M., M.N. Bautista, O.S. Reyes, and A. Kanazawa. 1997. Threonine requirement of juvenile marine shrimp *Penaeus monodon*. Aquaculture. 151: 9-14.
- Millamena O.M., M.B. Teruel, A. Kanazawa, and S. Teshima. 1999. Quantitative dietary requirements of postlarval tiger shrimp, *Penaeus monodon*, for histidine, isoleucine, leucine, phenylalanine and tryptophan. Aquaculture. 179: 169-179.
- Munkongwongsiri, N., D.J. Aldama-Cano, R. Suebsing, D. Thaiue, T. Prasartset, O. Itsathitphaisarn, and K. Sritunyalucksana. 2021. Microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) spores are inactivated in 1 min at 75 °C. Aquaculture. 533: 736178.
- NRC. 2011. Nutrient requirements of fish and shrimp. National Academies Press, Washington D. C., USA.
- Oanh T.D.H., and P. Tacon. 2015. Yeast parietal fractions enhance the immune response of shrimp towards AHPND infections. AQUA Culture Asia Pacific Magazine. 11 (2): 26-30.
- Official Journal of the European Communities L257/16. Determination of Amino acids. (OJ L 257/16, 19.9.89)
- Sharon, G., S. Fridman, N. Reiss-Hevlin, T. Sinai, P. Boisot, and D. Zilberg. 2016. Effects of different commercial diets on growth performance, health and resistance to *Tetrahymena* sp. infection in guppies, *Poecilia reticulata* (Peters). Aquaculture Research. 47. 2276–2286.
- Sriurairatana S., V. Boonyawiwat, W. Gangnonngiw, C. Laosutthipong, J. Hiranchan, and T. Flegel. 2014. White Feces Syndrome of Shrimp Arises from Transformation, Sloughing and Aggregation of Hepatopancreatic Microvilli into Vermiform Bodies Superficially Resembling Gregarines. Plos One. 9(6): e99170.
- Tangprasittipap A., J. Srisala, S. Chouwdee, M. Somboon, N. Chuchird, C. Limsuwan, T. Srisuvan, T. W. Flegel, and K. Sritunyalucksana. 2013. The microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* is not the cause of white feces syndrome in whiteleg shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. BMC Veterinary Research. 9(139): 1-10.

- Tran, L.H., P.N. Hoang, O.H. Bui, T.D. Nguyen, A.M.H. Wu, S. Ceulemans, and P.Coutteau. 2015. Reduce the Impact of EMS/AHPND: evidence from an experimental challenge with *Penaeus vannamei*. AQUAFEED. 7(1): 10-14.
- Tourtip, S., S. Wongtripop, G.D. Stentiford, K.S. Bateman, S. Sriurairatana, J. Chavadej, K. Sritunyalucksana, and B. Withyachumnarnkul. 2009. *Enterocytozoon hepatopenaei* sp. nov. (Microsporida: Enterocytozoonidae), a parasite of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Decapoda: Penaeidae): Fine structure and phylogenetic relationships. Journal of Invertebrate Pathology. 102: 21-29.
- Xie, S., D. Wei, W. Fang, M. Wan, T. Guo, Y. Liu, P. Yin, L. Tian, and J. Niu. 2019. Optimal dietary lipid requirement of postlarval white shrimp, *Litopenaeus vannamei* in relation to growth performance, stress tolerance and immune response. Aquaculture nutrition. 25(6): 1231-1240.
- Xie, S., D. Wei, W. Fang, P. Yin, Y. Liu, J. Niu, and L. Tian. 2020. Survival and protein synthesis of post-larval White Shrimp, *Litopenaeus vannamei* were affected by dietary protein level. Animal Feed Science and Technology. 263: 114462.