

ผลของการเสริมกรดแกมมาเอมิโนบิวทีริกในอาหารต่อความเครียดจากการขนส่งและการเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*)

Effects of Gamma-Aminobutyric Acid Supplementation in Diet on Transportation Stress and Growth Performance of Whiteleg Shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

ยุพรัตน์ อินบำรุง¹ อรพินท์ จินตสถาพร^{1*} ศรีน้อย ชุ่มคำ² และ ศุภวิทย์ ไตรวุฒานนท์³
Yuparat Inbumrung¹, Orapint Jintataporn^{1*}, Srinoy Chumkam² and Supawit Triwutanon³

¹ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

¹Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

²คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ จ. ปทุมธานี 13180

²Faculty of Agricultural Technology, Valaya Alongkorn Rajabhat University, Pathum Thani 13180, Thailand

³คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

³Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand

*Corresponding author: E-mail: ffsora@ku.ac.th

(Received: 12 May 2023; Accepted: 21 September 2023)

Abstract: The effect of 0%, 0.2%, and 0.4% gamma-aminobutyric acid (GABA) supplementation in diet on transportation stress of PL25 and growth performance of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during PL27-PL87 were investigated. The first experiment was assigned a factorial of 2x3 in complete randomized design (CRD). PL12 Shrimps were fed 3 dosages of GABA supplemented with a commercial diet of 39%CP and 7%CF and coated with pullulan at concentrations of 20 ml/kg of feed then applied to shrimp for 14 days. After that, PL25 shrimp contained in plastic bags (45x75 centimeters) were transported at 100 and 500 individuals/liter for 3 hours, and the postlarval quality was investigated. The second experiment was assigned in CRD. Shrimps transported at 100 individuals/liter were fed continuously and acclimated for 2 days then distributed in a glass aquarium and fed certainly GABA treatment diets for the other 60 days to study growth performance, while shrimp fed GABA diets during PL39 were applied stress at the end of feeding experiment by disease challenge against *Vibrio parahaemolyticus* AHPND for 12 days. The results found that shrimp quality and survival rate after transportation was higher in group of shrimp transported at density of 100 individuals/liter than 500 individuals/liter and certainly related to levels of GABA in the diets ($P<0.05$). Shrimp at PL27 - PL87 fed diet of 0.4% GABA had the highest average weights of 2.367 ± 0.110 g ($P<0.05$). Under stressful conditions of Vibriosis immersion test, the bacteria count from the hepatopancreas of shrimp fed a diet of 0.4% GABA was the lowest, and shrimp had the highest survival rate ($P<0.05$). In conclusion, GABA 0.4% supplementation in shrimp diet could promote larvae shrimp quality after transportation stress and enhance shrimp survival rates during disease challenge stress conditions, including improved growth performance during high EHP infection.

Keywords: Gamma-aminobutyric acid, Whiteleg shrimp, *Vibrio parahaemolyticus*, transport, stress

บทคัดย่อ: งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลการเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริก (GABA) 0 %, 0.2 % และ 0.4 % ในอาหารต่อคุณภาพกุ้งขาวแวนนาไม PL25 ที่ได้รับความเครียดจากการขนส่ง และการเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไม ในช่วงระยะ PL27-PL87 การทดลองที่ 1 การจัดชุดการทดลองแบบ 2x3 แฟกทอเรียล ในแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ทำการเสริม GABA 3 ระดับในอาหารสำเร็จรูปที่มีโปรตีน 39% และไขมัน 7% เคลือบด้วยสารละลายพุลลูแลน อัตราส่วน 20 มิลลิลิตรต่ออาหาร 1 กิโลกรัม นำมาเลี้ยงกุ้งระยะ PL12 นาน 14 วัน จากนั้นบรรจุกุ้งขาวแวนนาไม ระยะ PL25 ลงในถุงพลาสติกขนาด 45x75 เซนติเมตร ความหนาแน่น 100 และ 500 ตัวต่อลิตร ระยะเวลาที่ใช้การขนส่ง 3 ชั่วโมง ประเมินคุณภาพกุ้งภายหลังการขนส่งทันที การทดลองที่ 2 วางแผนแบบ CRD นำกุ้งหลังขนส่งชุด 500 ตัวต่อลิตร มาปรับสภาพ 2 วัน สุ่มลงในตู้กระจกขนาด 100 ลิตร และเลี้ยงด้วยอาหารเสริม GABA ต่อเนื่องเป็นเวลา 60 วัน เพื่อศึกษาการเติบโต และการต้านทานเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* AHPND นาน 12 วัน ผลการวิจัย พบว่า ระดับ GABA ในอาหารสัมพันธ์กับคุณภาพกุ้งและอัตราการรอดตายหลังขนส่งที่ความหนาแน่น 100 ตัวต่อลิตร สูงกว่า 500 ตัวต่อลิตร ($P < 0.05$) การเติบโตของกุ้งระยะ PL27-PL87 ที่เสริม GABA 0.4 % มีน้ำหนักเฉลี่ยสูงสุด 2.367 ± 0.110 กรัม ($P < 0.05$) และภายใต้สภาวะเครียดจากเชื้อก่อโรคในน้ำ กุ้งที่เสริมด้วย GABA 0.4 % มีปริมาณเชื้อไวรัสในตับ และตับอ่อนของกุ้งต่ำสุด และมีอัตราการรอดตายสูงกว่ากลุ่มอื่น ($P < 0.05$) ดังนั้น การเสริม GABA 0.4 % ในอาหาร ช่วยส่งเสริมคุณภาพกุ้งภายใต้ความเครียดในการขนส่ง และเพิ่มอัตราการรอดตายในสภาวะความเครียดจากเชื้อก่อโรค รวมถึงเติบโตดีขึ้นภายใต้สภาวะติดเชื้อ EHP

คำสำคัญ: กรดแกมมาอะมิโนบิวทีริก กุ้งขาวแวนนาไม *Vibrio parahaemolyticus* การขนส่ง ความเครียด

คำนำ

การเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในประเทศไทยมีการพัฒนาสายพันธุ์มาอย่างต่อเนื่อง เพื่อให้สามารถเพาะเลี้ยงได้ง่าย เจริญเติบโตได้ดีทั้งในน้ำเค็มสูงและน้ำที่มีความเค็มต่ำ สามารถเพาะเลี้ยงได้ในระบบอัตราความหนาแน่นสูง และยังให้ผลตอบแทนมูลค่าสูงแก่เกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงอีกด้วย จึงนับได้ว่าเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจหลักที่สามารถสร้างรายได้แก่เกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงได้เป็นอย่างดี เมื่อวิเคราะห์จากสถานการณ์ในปี พ.ศ. 2554 เป็นต้นมา การเลี้ยงกุ้งประสบกับปัญหาภาวะการเกิดโรคระบาด ในช่วง 10 - 14 วันแรก ที่เกษตรกรมีการลงเลี้ยงกุ้งนั้น จะพบลูกกุ้งตายอย่างรวดเร็ว และอาจมีอัตราการตายสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษาค้นคว้าสาเหตุหลักเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคตายด่วน (early mortality syndrome: EMS) หรือ โรคตับอักเสบเฉียบพลัน (acute

hepatopancreatic necrosis disease: AHPND) ส่งผลให้บริเวณตับและตับอ่อนของลูกกุ้งลีบฝ่อ สีขาวซีด เนื่องจากสูญเสียเม็ดสีในตับ ปริมาณเม็ดไขมันภายในตับและตับอ่อนน้อยผิดปกติ กุ้งมีอาการว่ายน้ำเชื่องช้า กินอาหารลดลงหรือไม่กินอาหาร และตายอย่างรวดเร็วในเวลาต่อมา (Nuangsaeng et al., 2016) แบคทีเรียชนิดนี้ เจริญเติบโตได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 9.5 - 45 องศาเซลเซียส มักกินอาหารจำพวกสารอินทรีย์ที่เกิดจากการขับถ่ายของเสียของกุ้งที่มีการสะสมอยู่ภายในบ่อเพาะเลี้ยง หากมีการจัดการในการเพาะเลี้ยงกุ้งที่ไม่เหมาะสมมักเกิดการสะสมของสารอินทรีย์อยู่เป็นจำนวนมาก (Sonthi, 2015) ซึ่งเป็นแหล่งอาหารของเชื้อก่อโรค แบคทีเรีย ไวรัส และโปรโตซัว เช่น แบคทีเรียพวก *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. vulnificus*, *Aeromonas hydrophila* เป็นต้น ส่งผลให้เชื้อเพิ่มปริมาณได้อย่างรวดเร็ว และอาจมีปัจจัยสำคัญที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรค เช่น การจัดการด้านคุณภาพของลูกพันธุ์ ด้านอาหาร สภาพแวดล้อมและ

สุขภาพของโรงเพาะฟักที่ยังไม่ได้มาตรฐาน อันก่อให้เกิดเชื้อมหาโรคได้ การตายของลูกกุ้งนี้ถือเป็นต้นทุนแฝงอันก่อให้เกิดความเสียหายแก่เกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงเป็นอย่างมาก และยังส่งผลกระทบต่อภาพรวมของประเทศด้านโอกาสทางการแข่งขันในตลาดโลกด้วย ซึ่งในปัจจุบันถึงแม้จะมีการศึกษาเกี่ยวกับโรคตายด่วนนี้อย่างแพร่หลาย ยังไม่พบวิธีที่สามารถกำจัดหรือป้องกันโรคนี้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ มีเพียงแนวทางปฏิบัติเบื้องต้น เช่น การจัดการฟาร์มอย่างมีมาตรฐานถูกสุขลักษณะ การควบคุมคุณภาพน้ำรวมถึงการลดการปนเปื้อนของเชื้อก่อโรคในน้ำ การเลือกใช้อุณหภูมิที่มีคุณภาพและปลอดโรค ช่วยลดความเสี่ยงในการเกิดโรคได้อีกทาง โดยต้องมีการจัดการป้องกันโรคระหว่างการเลี้ยงควบคู่ไปด้วย (Limsuwan *et al.*, 2006) การปรับขนาดและอายุลูกกุ้งให้มากกว่าระยะ โพลาร์วา 12 ก่อนลงเลี้ยงในบ่อเพื่อให้มีอัตราการรอดและการเจริญเติบโตที่ดี เนื่องจากกุ้งมีพัฒนาการของระบบเหงือกและตับสมบูรณ์ สามารถปรับสมดุลของแร่ธาตุและน้ำในร่างกายจากการเปลี่ยนแปลงความเค็มได้ (Department of Fisheries, 2018) การปรับลดความเสี่ยงการเกิดโรคของลูกกุ้งที่เพาะเลี้ยงในอัตราความหนาแน่นสูง โดยทำการเติมหรือเคลือบสารบางชนิดลงในอาหารกุ้ง เช่น วิตามินซี แอสต้าแซนทีน กรดแกมมาอะมิโนบิวทีริก และสมุนไพรไทย เป็นต้น สารที่นำมาเติมหรือเคลือบนี้จะพบสารประกอบที่สำคัญ จำพวกสารประกอบฟีนอลิก เช่น กลุ่ม ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) แทนนิน (tannin) ซาโปนิน (saponin) และ กรดฟีนอลิก (phenolic acid) เป็นต้น สามารถต้านอนุมูลอิสระที่เกิดภายในตัวกุ้งได้เป็นอย่างดี (Bahorun *et al.*, 1996; Froehlicher *et al.*, 2009) ช่วยลดการทำลายเซลล์ ลดสภาวะความเครียดที่ทำให้กุ้งอ่อนแอ กระตุ้นภูมิคุ้มกันให้ทำงานอย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น และยังสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียและยีสต์ได้ มีผลเช่นเดียวกับการใช้สารสกัดจากพืช เช่น พื้ทะเลลายใจ กระเทียม กระเจี๊ยบ ขาเขียว เป็นต้น ที่สามารถต้านทานเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และไวรัสได้ และให้การเจริญเติบโตของกุ้งดีขึ้น (Chirawithayaboon *et al.*, 2020; Tummarongkongsatit,

2007) นอกจากนี้ มีการเสริมด้วยกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกในอาหารกุ้งขาวแวนนาไม เพื่อลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรค และสามารถทดแทนยาปฏิชีวนะได้

กรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกมีคุณสมบัติเป็นสารธรรมชาติ ส่วนใหญ่พบได้ในพืชและสามารถสังเคราะห์ขึ้นมาจากจุลินทรีย์ได้ (Jannoey *et al.*, 2010; Jorgensen, 2005) มีความปลอดภัย ไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อตัวกุ้ง ทั้งระยะโพลาร์วาจนถึงตัวเต็มวัย อีกทั้งมีความปลอดภัยต่อสภาพแวดล้อม และผู้บริโภคทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาท และมีคุณสมบัติของสารสำคัญจำพวกฟลาโวนอยด์ ในการช่วยลดสารอนุมูลอิสระที่เป็นพิษ โดยยับยั้งความผิดปกติของสารสื่อประสาทอันเกิดจากความเครียด ช่วยกระตุ้นต่อมไร้ท่อให้ผลิตฮอร์โมนที่ทำหน้าที่ช่วยในการเจริญเติบโตเพิ่มมากขึ้น กระตุ้นความอยากอาหาร และส่งเสริมการกินอาหาร (Wu *et al.*, 2016) การนำสารอาหารไปใช้สะสมในเนื้อเยื่อหรือเซลล์ต่าง ๆ ของสัตว์น้ำ การปรับ microbiome ในลำไส้ ควบคุมสภาวะต่าง ๆ ภายในร่างกายให้ปกติคั้งที่ ส่งผลให้เกิดการสร้างและซ่อมแซมส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย ทั้งยังช่วยให้ตับมีสุขภาพที่ดีขึ้น ป้องกันการสะสมไขมัน สามารถป้องกันการเพิ่มระดับแอมโมเนียในกระแสเลือดอย่างเฉียบพลัน (Liang *et al.*, 2022; Xie *et al.*, 2017) ควบคุมพลังงานให้สมดุลอยู่เสมอ (van den Pol, 2003) ส่งผลให้ลูกกุ้งสามารถทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงความเค็มและความทนทานต่อฟอร์มาลินอย่างฉับพลันได้ (Xie *et al.*, 2017) เมื่อนำมาเคลือบอาหารกุ้งขาวแวนนาไม ระยะโพลาร์วา จนถึงอาหารระยะกุ้งวัยรุ่น สามารถช่วยเพิ่มอัตราการเจริญเติบโต บำรุงหรือลดการทำลายตับและตับอ่อนเมื่อเกิดความเครียด ส่งผลให้ตับและตับอ่อนมีคุณภาพที่ดีขึ้น ทนต่อสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลง ลดสารอนุมูลอิสระ กระตุ้นให้กุ้งเกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง เป็นการเตรียมความพร้อมในการรับมือกับเชื้อก่อโรคที่จะบุกรุกเข้ามาในระหว่างการเลี้ยง (Ngo *et al.*, 2019) และสามารถทดแทนการให้ยาปฏิชีวนะได้ (Bae *et al.*, 2022) โดยพบว่าสารไตรเทอร์ปีนไกลโคไซด์ (triterpene glycosides) ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียแกรม

ลบและยีสต์ได้ (Abdel-Naime *et al.*, 2019)

การศึกษาค้นคว้านี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาผลของการเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริก ในระดับที่แตกต่างกันในอาหาร ต่อความสมบูรณ์ของกุ้งขาวแวนนาไม ระยะ PL25 ที่ได้รับความเครียดจากการขนส่งที่อัตราความหนาแน่นแตกต่างกัน และศึกษาผลการเจริญเติบโต อัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไม ในระหว่างการเลี้ยงกุ้งระยะ PL27 - PL87 ที่ได้รับการเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกที่ระดับแตกต่างกันในอาหาร เพื่อเป็นแนวทางในการใช้กรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกปรับปรุงคุณภาพกุ้งขาวแวนนาไมในการเลี้ยงของเกษตรกรต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

สัตว์ทดลอง

ลูกกุ้งขาวแวนนาไม ระยะโพสลาว่า (PL12) ฟาร์มเอกชน อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ที่ผ่านการตรวจวิเคราะห์คุณภาพตามวิธีซีรึมพีไบโอเทคทดสอบด้วยวิธีทางอนุชีววิทยา เพื่อยืนยันการปลอดโรคที่สำคัญในกุ้งขาวแวนนาไม ได้แก่ โรคตายด่วน (acute hepatopancreatic necrosis syndrome: AHPNS), โรคตัวแดงดวงขาว (white spot syndrome virus: WSSV) และทดสอบการติดเชื้อไมโครสปอริเดีย (*Enterocytozoon hepatopenaei*: EHP) ทำการสุ่มลูกกุ้งขาวแวนนาไม จำนวน 20,000 ตัวต่อบ่อ จำนวน 9 บ่อ ขนาดบ่อ 2x2x1 เมตร ปริมาตร 2,000 ลูกบาศก์เมตร ให้อาหารเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกที่ระดับ 0, 0.2 และ 0.4 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารสำเร็จรูป วันละ 6 ครั้ง ทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำและดูดตะกอนของเสียทุกวัน ก่อนการขนส่ง 14 วัน (PL12 - PL25)

อาหารทดลอง

อาหารกุ้งขาวแวนนาไม ระยะโพสลาว่า เป็นอาหารสำเร็จรูปชนิดเกล็ดจม สำหรับลูกกุ้งวัยอ่อนระยะที่ 1 ขนาด 1.2 - 2.5 เซนติเมตร เจริญการค้า ที่มีความเข้มข้นโภชนะระดับโปรตีนไม่น้อยกว่า 39 % และไขมันไม่น้อยกว่า 7 %

กรดแกมมาอะมิโนบิวทีริก เป็นสมุนไพรผสมของพืชจำพวก hawthorn, กลุ่ม valerian และพืชชนิดอื่น ๆ เช่น hops, พืชในวงศ์กุยชา และสะระแหน่ (lemon balm)

ทำการเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกที่ระดับ 0, 0.2 และ 0.4 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารกุ้งขาวแวนนาไม แล้วเคลือบด้วยสารละลายพุลลูแลนในอัตราส่วน 20 มิลลิกรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม ผึ่งลมให้แห้ง

การทดลองที่ 1 เปรียบเทียบผลของการเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกที่ระดับแตกต่างกันในอาหาร ต่อความสมบูรณ์ของลูกกุ้งขาวแวนนาไม ระยะโพสลาว่า 25 ที่ได้รับความเครียดจากการขนส่งด้วยอัตราความหนาแน่นที่แตกต่างกัน

การจัดชุดการทดลองแบบ 2x3 แฟกทอเรียล ในแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ โดยทำการศึกษา 2 ปัจจัย ได้แก่ อัตราความหนาแน่นในการขนส่งต่างกัน 2 ระดับ คือ 100 และ 500 ตัวต่อน้ำ 1 ลิตร และ ระดับการเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกในอาหารสำเร็จรูป 3 ระดับ คือ 0, 0.2 และ 0.4 %

ทำการเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกที่ระดับ 0, 0.2 และ 0.4 % ในอาหารกุ้งขาวแวนนาไม แล้วเคลือบด้วยสารละลายพุลลูแลน (pullulan®) ในอัตราส่วน 20 มิลลิกรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม ผึ่งลมให้แห้ง นำไปเลี้ยงลูกกุ้งขาวแวนนาไมระยะ PL12 เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นนำลูกกุ้ง ระยะ PL25 บรรจุลงในถุงพลาสติก ขนาด 45 x 75 เซนติเมตร ที่มีน้ำความเค็ม 2-3 ส่วนในพันส่วน ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนแล้ว ในอัตราความหนาแน่น 100 และ 500 ตัวต่อน้ำ 1 ลิตรต่อถุง ตามชุดการทดลอง ทำการเติมอากาศและใช้ยางรัดปากถุงให้สนิทก่อนการขนส่ง ระยะเวลารับขนส่ง 2-3 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บข้อมูลคุณภาพลูกกุ้งขาวแวนนาไมตามวิธีซีรึมพีไบโอเทค ภายหลังการขนส่งแล้วเสร็จทันที

ทดสอบคุณภาพลูกกุ้งขาวแวนนาไมตามวิธีซีรึมพีไบโอเทค (Ruchirawat and Vaikrudha, 2003) โดยสุ่มเก็บตัวอย่างลูกกุ้ง PL25 จำนวน 20 ตัว ทำการ

ตรวจให้คะแนนความสมบูรณ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า (10x) แบ่งออกเป็น จำนวนกริ ความยาวตัว ความสมบูรณ์ของรยางค์ ประสิทธิภาพนอก อัตรากล้ามเนื้อต่อลำไส้ (M:G ratio) ปริมาณเม็ดไขมัน ในตับและความสมบูรณ์ของตับลูกกุ้ง สรุปผลการให้ คะแนนเป็นเปอร์เซ็นต์มาตรฐานการยอมรับ โดยขั้นตอน การตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งคะแนนการตรวจ ตั้งแต่ 85 % ขึ้นไปจึงจะถือว่าผ่านเกณฑ์มาตรฐาน (Department of Fisheries, 2018)

เก็บข้อมูลสุขภาพเพื่อวิเคราะห์คุณภาพ ลูกกุ้งขาวแวนนาไม ทำการทดสอบความทนทานต่อ ความเครียด โดยการแช่น้ำจืด สุ่มเก็บตัวอย่างจำนวน 100 ตัว มาแช่น้ำจืด ทิ้งไว้ 30 นาที แล้วทำการตรวจ นับการรอดตายของลูกกุ้ง ต้องไม่น้อยกว่า 90 % และ ทดสอบการแช่ฟอร์มาลิน สุ่มเก็บตัวอย่างจำนวน 100 ตัว มาแช่น้ำฟอร์มาลิน ความเข้มข้น 100 ส่วนในพัน ส่วน ทิ้งไว้ 30 นาที แล้วตรวจนับการรอดตายของลูกกุ้ง ต้องไม่น้อยกว่า 95 % (Department of Fisheries, 2018)

ทดสอบคุณภาพลูกกุ้งขาวแวนนาไมด้วย วิธีทางอณูชีววิทยา โรคที่ตรวจวินิจฉัย ได้แก่ โรคตาย ด่วน (acute hepatopancreatic necrosis syndrome: AHPND), โรคตัวแดงดวงขาว (white spot syndrome virus: WSSV) (Department of Fisheries, 2018) โดย นำตัวอย่างลูกกุ้ง ไม่น้อยกว่า 150 ตัว มาตัดส่วนหัวออก เพื่อแยกส่วนตาซึ่งมีสารยับยั้งปฏิกิริยา PCR ทำ การบดให้ละเอียด ชั่งตัวอย่าง 1 กรัม นำไปสกัดสาร- พันธ์กรรม โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป DNAzol® Reagent แล้วจึงนำมาตรวจด้วยเทคนิค nested PCR โดยใช้ primer 2 คู่ (Songkhla Aquatic Animal Health Research Center, 2018)

ทำการตรวจสอบการติดเชื้อไมโครสปอริเดีย (*Enterocytozoon hepatopenaei*: EHP) นำเฉพาะส่วน ตับ/ตับอ่อน โดยเฉพาะในตำแหน่งที่อยู่ติดกับกระเพาะ อาหาร วางบนแผ่นสไลด์ หยดน้ำกลั่น 1 หยด ปิดทับ ด้วย cover glass นำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยลักษณะสปอร์ของ EHP จะมีรูปร่างกลม และรูปร่าง คล้ายรักบี้ มีขนาด 1 - 2 ไมครอน ซึ่งต้องใช้กำลังขยาย 1000 เท่า (100x) (Department of Fisheries, 2018)

วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติโดย analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบความ- แตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างชุดการทดลองโดยใช้วิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความ- เชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS

การทดลองที่ 2 การเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทริกที่ระดับแตกต่างกันในอาหาร ต่อการเติบโต ลูกกุ้งขาวแวนนาไม ระยะโพสลาร์วา (PL27 - PL87) และความทนทานต่อความเครียดในสภาวะการแช่ ด้วยเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่ สร้างสารพิษ ก่อให้เกิดโรคตายด่วน (AHPND)

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) แบ่งเป็น 3 ชุดการทดลอง (treatment) ในแต่ละชุดการทดลองมี 3 ซ้ำ เลี้ยงเป็น ระยะเวลา 60 วัน ซึ่งแบ่งชุดการทดลอง ที่ระดับความ- เข้มข้นของกรดแกมมาอะมิโนบิวทริก 0, 0.2 และ 0.4 เปอร์เซ็นต์ เสริมในอาหารสำเร็จรูป แล้วเคลือบด้วย สารละลายพุลูลแลน (pullulan®) ในอัตราส่วน 20 มิลลิกรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม นำไปเลี้ยง กุ้งขาวแวนนาไมระยะ PL25 ที่ได้รับการเสริมกรด แกมมาอะมิโนบิวทริก 0 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังการขนส่ง ด้วยอัตราความหนาแน่น 500 ตัวต่อลิตร ในการทดลอง ที่ 1 ทำการสุ่มคัดเลือกกุ้ง จำนวน 120 ตัวต่อตู้ ตู้ทดลอง มีปริมาตรน้ำ 100 ลิตร ความเค็มของน้ำ 3 ส่วนใน พันส่วน ให้อาหารวันละ 3 ครั้ง โดยให้กินอาหารวันละ 10 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักตัว ทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำและ ดูดตะกอนของเสียทุกวัน เก็บข้อมูลการเติบโตและอัตรา การรอดตาย โดยทำการสุ่มเก็บตัวอย่างลูกกุ้งขาว แวนนาไม ระยะ PL27, PL39, PL51, PL63, PL75 และ PL87 จำนวน 30 ตัว มาชั่งน้ำหนักเพื่อหาน้ำหนักเฉลี่ย ต่อตัว และหาอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน (average daily growth: ADG) และหาอัตราการรอด ตาย (survival rate) ภายหลังการชั่งน้ำหนักและนับ จำนวน นำตัวอย่างกุ้งลงเลี้ยงในตู้ทดลองเช่นเดิม

การทดสอบความทนทานต่อความเครียด ภายใต้สภาวะความเข้มข้นของเชื้อก่อโรคสูง อันเกิด จากเชื้อก่อโรค *V. parahaemolyticus* โดยนำกุ้งขาว

แวนนาโม ระยะ PL39 (ช่วงเดือนแรกหลังลงเลี้ยงที่ประสบปัญหาการเกิดโรคตายด่วน) มาทดสอบคุณภาพเมื่ออยู่ในสภาวะความเครียดจากเชื้อก่อโรค *V. parahaemolyticus* AHPND ความเข้มข้นสูง (1.0×10^6 CFU/ml) โดยวิธีการแช่ (immersion method) ดัดแปลงจากวิธีการของ Balcázar *et al.* (2007) เป็นระยะเวลา 12 วัน

วิธีการเตรียมเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค AHPND ดำเนินการโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อในจานอาหารแข็ง tryptic soy agar (TSA) ที่มีความเข้มข้นของเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำ single colony จำนวน 3-5 โคโลนี มาใส่ลงในอาหารเหลว tryptic soy broth (TSB) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอน ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 5 ± 1 องศาเซลเซียส เสร็จแล้วทำการล้างตะกอนด้วยน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 2 ครั้ง แล้วทำการเจือจางตะกอนของแบคทีเรียด้วยน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ เพื่อวัดความเข้มข้นด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ปรับปริมาณเชื้อเทียบกับ 0.5 McFarland (ปริมาณเชื้อมีค่าประมาณ 10^6 CFU/ml)

ทำการสุ่มกุ้งขาวแวนนาโม ระยะ PL39 น้ำหนักรวมเฉลี่ย 1.31 ± 0.00 กรัม จากชุดควบคุมจำนวน 30 ตัว เลี้ยงในตู้กระจก ขนาด 18 ลิตร จำนวน 9 ตู้ ใส่เชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่เตรียมไว้ ให้มีปริมาณเชื้อภายในตู้ 10^6 CFU/ml ทำการให้อาหารแต่ละชุดการทดลอง วันละ 6 มื้อ ไม่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำ และดูดตะกอนจนสิ้นสุดการทดลอง เมื่อทดลองครบ 12 วัน นับจำนวนกุ้งที่คงเหลือ เพื่อหาอัตราการรอดตาย และศึกษาปริมาณเชื้อแบคทีเรียในตับและตับอ่อน ลำไส้ และน้ำเลี้ยงภายในตู้ โดยสุ่มกุ้งขาวแวนนาโมแต่ละชุดการทดลอง จำนวน 5 ตัว เก็บตัวอย่างตับและตับอ่อนพร้อมลำไส้ ใส่ในหลอดปั่นกันแหลม (microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ทำการเติมน้ำเกลือความ-

เข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บดตัวอย่างให้ละเอียดแล้ว เติมน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ เพิ่มลงไปอีก 900 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex ทำการเจือจางตัวอย่างตับและตับอ่อน พร้อมลำไส้ และน้ำเลี้ยงภายในตู้ ที่ระดับ 10^0 , 10^{-1} , และ 10^{-2} ดูดตัวอย่างด้วยปิเปต ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาตรวจนับจำนวนแบคทีเรีย ด้วยวิธี spread ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ thiosulfate citrate bile salt sucrose (TCBS)) ที่มีความเข้มข้นของเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีสีเขียวของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่เกิดขึ้น นำไปคำนวณหาปริมาณเชื้อในหน่วย colony forming unit (CFU) ต่อตับและลำไส้ กุ้ง 1 กรัม หรือ น้ำเลี้ยง 1 มิลลิลิตร

วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติโดย Analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน ระหว่างกลุ่มทดลองโดยใช้วิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS

ผลการทดลองและวิจารณ์

การทดลองที่ 1 เปรียบเทียบผลของการเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริก ที่ระดับแตกต่างกันในอาหาร ต่อคุณภาพของลูกกุ้งขาวแวนนาโม ระยะ PL25 ที่ได้รับความเครียดจากการขนส่งด้วยอัตราความหนาแน่นที่แตกต่างกัน

เมื่อทดสอบคุณภาพลูกกุ้งตามวิธีซีเอ็มพีไบโอเทค พบว่า ลูกกุ้งขาวแวนนาโม ระยะ PL25 ที่ได้รับการเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกที่ระดับ 0, 0.2 และ 0.4 เปอร์เซ็นต์ในอาหารสำเร็จรูป ภายหลังขนส่งด้วยอัตราความหนาแน่น 100 ตัวต่อน้ำ 1 ลิตร มีค่าเฉลี่ยคะแนนเท่ากับ 85.00 ± 2.00 , 91.33 ± 1.15 และ 96.33 ± 1.15 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และภายหลังขนส่งด้วยอัตราความหนาแน่น 500 ตัวต่อน้ำ 1 ลิตร ค่าเฉลี่ยคะแนนคุณภาพเท่ากับ 77.00 ± 2.65 , 88.67 ± 0.58 และ 94.00 ± 2.65 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งมีค่าเฉลี่ย

คะแนนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แสดงว่า การเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกที่ระดับต่าง ๆ และอัตราความหนาแน่นในการขนส่ง มีผลทำให้คุณภาพของลูกกุ้งขาวแวนนาไมแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) อัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมที่ขนส่งด้วยความหนาแน่น 100 ตัวต่อลิตร และ 500 ตัวต่อลิตร แปรผันตามกับอัตราส่วนการเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกที่ระดับต่าง ๆ ในอาหาร โดยมีอัตราการรอดตายแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (Table 1) โดยกุ้งที่ได้รับอาหารเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกในระดับสูงขึ้นไป มีอัตราการรอดสูงขึ้นไป เนื่องจากเมื่อใช้ความหนาแน่นในการขนส่งที่มากเกินไป กุ้งสะสมความเครียด อันเนื่องมาจากกุ้งอยู่ในสภาวะที่ถูกจำกัดในถุงบรรจุ จำกัดปริมาณน้ำ อีกทั้งมีการเปลี่ยนแปลงของคุณภาพน้ำ มีการเพิ่มขึ้นของแอมโมเนียและไนไตรท์ ปริมาณออกซิเจนลดลง ส่งผลกระทบต่อกระบวนการทางสรีรเคมีอย่างรุนแรง ทำให้กุ้งเกิดการกินกันเอง เห็นได้จากที่รังยักกุ้งกุดกร่อน (Pratoomchat, 2018; Wangsoontorn *et al.*, 2013) จะเห็นได้ว่า กุ้งขาวแวนนาไมที่ไม่ได้รับการเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกในอาหาร มีรังยักกุดกร่อน แม้ขนส่งด้วยอัตรา 100 ตัวต่อลิตร หรือ 500 ตัวต่อลิตร โดยยิ่งความหนาแน่นมากขึ้น คุณภาพรังยักยิ่งลดลง ความเครียดสะสมภายในตัวกุ้ง ส่งผลต่อความสมบูรณ์ทางกายภาพของตัวและตัวอ่อน โดยตัวและตัวอ่อนเกิดการคอดตัวของท้องตัว หากเกิดมากขึ้น กุ้งจะมีความสามารถในการควบคุมระบบการเผาผลาญอาหารภายในร่างกายต่ำลง ประสิทธิภาพในการสังเคราะห์และหลั่งเอนไซม์ในการย่อยและดูดซึมลดลง การสะสมไขมันก็ลดลง (Hiransuchalert *et al.*, 2013) ดังนั้น กุ้งขาวแวนนาไม ระยะ PL25 ที่ได้รับการเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกในอาหารสำเร็จรูประดับ 0.4 เปอร์เซ็นต์ ช่วยลดความเครียดในการขนส่ง ลดความก้าวร้าวของกุ้งเมื่ออยู่ในพื้นที่จำกัด โดยพิจารณาจากผลการตรวจสอบระยะการควบคุมสมดุลของแร่ธาตุภายในร่างกาย พิจารณาจากการทดสอบความเครียดโดยการแช่น้ำจืดและแช่ฟอร์มาลิน ทำให้สามารถขนส่งด้วยอัตราความหนาแน่น 500 ตัวต่อลิตรได้

โดยที่คุณภาพของกุ้งขาวแวนนาไมยังอยู่ในระดับดีและเหมาะสม (คะแนนมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป) (Department of Fisheries, 2018) ซึ่งแนวโน้มสอดคล้องกับการเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกในอาหารสัตว์ อาทิเช่น การเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกอัตรา 150 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในอาหารกุ้งขาวแวนนาไมสูตรปลาปนต่ำ จะช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ช่วยในการเจริญเติบโตได้เป็นอย่างดี และทนทานต่อแอมโมเนีย ได้อย่างเหมาะสม ลดความเครียดที่เกิดขึ้นเมื่อสภาวะแวดล้อมเปลี่ยนแปลง (Xie *et al.*, 2017) การเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกในอาหารกุ้งขาวแวนนาไมอัตราส่วน 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ช่วยเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตมากขึ้น เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเชื้อก่อโรค การเสริมด้วยกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกอัตราส่วน 175.6 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ส่งผลให้อัตราการรอดตายสูงขึ้น แสดงว่า สามารถทดแทนการเข้ายาปฏิชีวนะได้อีกทางหนึ่ง (Bae *et al.*, 2022) และการเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกในอาหารปลา จะช่วยป้องกันความเครียด กระตุ้นการกินอาหารระดับโปรตีนในร่างกายเพิ่มขึ้น กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของปลา Jian carp (Chen *et al.*, 2021) กรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกช่วยควบคุมการกระตุ้นประสาทในสัตว์ ลดความเครียดที่เกิดขึ้น (Nakamura *et al.*, 2022; Turenus *et al.*, 2009) เพิ่มอัตราการเจริญเติบโต อัตราการกินอาหาร และเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของวู (Jeong *et al.*, 2020) และไก (Wang *et al.*, 2013) ดังนั้น ระดับการเสริมด้วยกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกในอาหารของสัตว์น้ำนั้น ขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์น้ำ ช่วงวัย และจุดประสงค์ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

เมื่อทดสอบคุณภาพลูกกุ้งขาวแวนนาไมด้วยวิธีทางอนุชีววิทยา พบว่า ลูกกุ้งขาวแวนนาไม ระยะ PL25 ภายหลังการขนส่งด้วยอัตราความหนาแน่น 100 และ 500 ตัวต่อน้ำ 1 ลิตร ไม่พบการติดเชื้อก่อโรคตายด่วน (AHPND) และ เชื้อตัวแดงดวงขาว (WSSV) (Table 1) กรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกเป็นสารสกัดจากพืช hawthorn (*Crataegus monogyna*) ที่มีสารต้านอนุมูลอิสระจำพวกสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) วิตามินซี (vitamin C) ไกลโคไซด์ (glycoside) แทนนิน (tannin)

Table 1. Quality after transportation at a density rate of 100 and 500 individuals/liter of PL25-whiteleg shrimp fed with 0, 0.2 and 0.4% gamma-aminobutyric acid supplementation in commercial diets

Parameters	100 individuals/liter			500 individuals/liter			P-value		
	0% GABA	0.2% GABA	0.4% GABA	0% GABA	0.2% GABA	0.4% GABA	Density	GABA	Inter- action
Number of spines ¹ (score)	10.00 ± 0.00 ^a	10.00 ±0.00 ^a	10.00 ± 0.00 ^a	10.00 ± 0.00 ^a	10.00 ± 0.00 ^a	10.00 ± 0.00 ^a	<0.001	<0.001	0.038
Completion of appendix ¹ (score)	14.67 ± 0.58 ^a	15.00 ± 0.00 ^a	15.00 ± 0.00 ^a	14.00 ± 1.00 ^a	14.67 ± 0.58 ^a	15.00 ± 0.00 ^a	1.000	1.000	1.000
Completion of the hepatopancreas ¹ (score)	11.00 ± 1.73 ^a	11.00 ± 1.73 ^a	13.00 ± 1.73 ^a	6.00 ± 3.00 ^b	10.00 ± 1.73 ^a	12.00 ± 0.00 ^a	0.204	0.115	0.565
Lipid in the hepatopancreas ¹ (score)	16.00 ± 0.00 ^b	18.67 ± 2.31 ^{ab}	20.00 ± 0.00 ^a	12.00 ± 0.00 ^c	17.33 ± 2.31 ^{ab}	18.67 ± 2.31 ^{ab}	0.021	<0.001	0.144
Muscle to gut ratio ¹ (score)	10.00 ± 0.00 ^a	10.00 ± 0.00 ^a	10.00 ± 0.00 ^a	10.00 ± 0.00 ^a	10.00 ± 0.00 ^a	10.00 ± 0.00 ^a	0.014	<0.001	0.300
Salinity shock ¹ (score)	8.33 ± 2.89 ^a	11.66 ± 2.89 ^a	13.33 ± 2.89 ^a	10.00 ± 0.00 ^a	11.67 ± 2.89 ^a	13.33 ± 2.89 ^a	1.000	1.000	1.000
Formalin stress tests ¹ (score)	15.00 ± 0.00 ^a	15.00 ± 0.00 ^a	15.00 ± 0.00 ^a	15.00 ± 0.00 ^a	15.00 ± 0.00 ^a	15.00 ± 0.00 ^a	0.663	0.053	0.821
Total Score ¹ (%)	85.00 ± 2.00 ^e	91.33 ± 1.15 ^{bc}	96.33 ± 1.15 ^a	77.00 ± 2.65 ^f	88.67 ± 0.58 ^d	94.00 ± 2.65 ^{ab}	1.000	1.000	1.000
Survival rate (%)	91.50 ± 2.00 ^{cd}	93.33 ± 1.76 ^{bc}	97.67 ± 1.26 ^a	79.73 ± 1.62 ^e	90.60 ± 0.79 ^d	95.03 ± 0.47 ^b	<0.001	<0.001	<0.001
AHPND	ND	ND	ND	ND	ND	ND			
WSSV	ND	ND	ND	ND	ND	ND			
EHP	++++	++++	++++	++++	++++	++++			

Means values in the same row with different superscripts are significantly different ($P \leq 0.05$)¹ Evaluate the results according to the shrimp biotech method

ND = non-detect pathogenically, tested by molecular biological methods

++++ = More than 10 EHP spores were found

ซาโปนิน(saponin) แอนโทไซยานิน(anthocyanin) และ protoanthocyanidins ซึ่งจำแนกได้ว่าเป็น cyanidin-3-O-galactoside ที่สามารถต้านอนุมูลอิสระได้อย่างชัดเจนกว่าฟีนอลิกกลุ่มอื่น ๆ (Bahorun *et al.*, 1996; Froehlicher *et al.*, 2009) จากคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกจากพืชกลุ่มดังกล่าวนี้ ให้ผลการยับยั้งเชื้อก่อโรคคล้ายคลึงกับงานวิจัยจากพืชหลายชนิด เช่น น้ำมันหอมระเหย *Melissa officinalis* ที่ความเข้มข้น 1 µl/ml สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ได้ (Yu *et al.*, 2022) และมีรายงานการศึกษาของ Wu *et al.* (2016) ได้เสริมสารสกัดจากใบพืช *Gynura bicolor* ในอาหารกุ้ง พบว่า สามารถต้านเชื้อ *V. alginolyticus* และเชื้อไวรัส WSSV ในกุ้งขาวแวนนาไมได้ และการเสริมสาหร่ายสไปรูลินาสดในอาหาร เพิ่มความต้านทานต่อโรค EMS จากการติดเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ในลูกกุ้งขาวแวนนาไมได้

เมื่อทดสอบการติดเชื้อไมโครสปอริเดีย (EHP) ของลูกกุ้งขาวแวนนาไมระยะ PL25 ด้วยการส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า ลูกกุ้งขาวแวนนาไม ระยะ PL25 ภายหลังการขนส่งด้วยอัตราความหนาแน่น 100 และ 500 ตัวต่อน้ำ 1 ลิตร มีการติดเชื้อ EHP โดยพบสปอร์ของเชื้อมากกว่า 10 สปอร์ อ่านผลการติดเชื้อในระดับ ++++ ซึ่งเป็นระดับที่มีการติดเชื้อ EHP ในบ่อเลี้ยง (Table 1) นอกจากนี้ กุ้งขาวแวนนาไมระยะ PL12 พบการติดเชื้อ EHP ในระดับ ++++ อีกด้วย สาเหตุอาจเกิดได้หลายปัจจัย เช่น การปนเปื้อนสปอร์ EHP ในระบบโรงเพาะฟักและอนุบาล แล้วเข้าสู่ลูกกุ้งระยะ PL ทางปากและเพิ่มจำนวนในระบบทางเดินอาหาร ตับและตับอ่อนของลูกกุ้ง (Chaweepack, 2022) กุ้งที่มีการติดเชื้อพบการเจริญของเชื้อภายในตับและตับอ่อนเป็นจำนวนมาก และมีการหลุดลอกออกมาพร้อม สิ่งขับถ่ายสะสมบนเวียนภายในบ่อเลี้ยง สามารถลดปริมาณเชื้อโดยการถ่ายน้ำเพื่อลดเชื้อในตัวเนื่องจากไม่มีสารหรือยาที่สามารถฆ่าเชื้อ EHP ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Songkhla Aquatic Animal Health Research Center, 2022)

การทดลองที่ 2 การเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกที่ระดับแตกต่างกันในอาหาร ต่อการเติบโตของลูกกุ้งขาวแวนนาไม ระยะโพสลาร์วา (PL27 - PL87) และความทนทานต่อความเครียดในสภาวะการแช่ด้วยเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* AHPND

ผลการเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไม ระยะโพสลาร์วา (PL27-PL87) ที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปที่มีระดับโปรตีน 39% ผสมกับกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกในระดับ 0, 0.2 และ 0.4 เปอร์เซ็นต์ โดยมีกุ้งขาวแวนนาไม ระยะโพสลาร์วา ได้รับอาหารที่ไม่มีการผสมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกเป็นกลุ่มควบคุม (Table 2) พบว่า กุ้งขาวแวนนาไม ระยะ PL39 ที่ได้รับการเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริก ในอาหารสำเร็จรูป ระดับ 0, 0.2 และ 0.4 เปอร์เซ็นต์ มีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ส่วนกุ้งขาวแวนนาไม ระยะ PL51, PL63, PL75 และ PL87 ที่ได้รับการเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกในอาหารสำเร็จรูประดับ 0.4 เปอร์เซ็นต์ มีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวสูงสุด เท่ากับ 0.103 ± 0.004 , 0.201 ± 0.006 , 0.751 ± 0.068 และ 2.367 ± 0.110 กรัม ตามลำดับ มีอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวันสูงสุด เท่ากับ 0.003 ± 0.000 , 0.008 ± 0.001 , 0.016 ± 0.001 และ 0.040 ± 0.002 กรัม ตามลำดับ ซึ่งมีค่าน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวและอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวันในกุ้งแต่ละระยะแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเทียบกับกุ้งขาวแวนนาไม ที่ได้รับการเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกในอาหารสำเร็จรูป ระดับ 0 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งอัตราการรอดตายสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แสดงได้ว่า แนวโน้มการเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับการเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกในระดับ 0.4 เปอร์เซ็นต์ในอาหาร มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง และมีอัตราการรอดตายเพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับกุ้งขาวแวนนาไมที่ไม่ได้รับการเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกในอาหาร สอดคล้องกับการศึกษาของ Bae *et al.* (2022) พบว่า การเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริก อัตราส่วน 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

Table 2. Growth performance of whiteleg shrimp larvae fed with 0, 0.2, and 0.4% gamma-aminobutyric acid supplementation in commercial diets for 60 days

Growth performance	Level of gamma-aminobutyric acid		
	0%	0.2%	0.4%
Average weight (g/PL)			
PL27	0.029 ± 0.000 ^a	0.029 ± 0.000 ^a	0.029 ± 0.000 ^a
PL39	0.032 ± 0.016 ^a	0.042 ± 0.001 ^a	0.047 ± 0.001 ^a
PL51	0.082 ± 0.003 ^a	0.085 ± 0.003 ^a	0.103 ± 0.004 ^b
PL63	0.141 ± 0.001 ^a	0.167 ± 0.017 ^b	0.201 ± 0.006 ^c
PL75	0.461 ± 0.017 ^a	0.628 ± 0.107 ^b	0.751 ± 0.068 ^b
PL87	1.613 ± 0.070 ^a	1.840 ± 0.303 ^a	2.367 ± 0.110 ^b
Average daily growth (g/PL)			
PL39	0.001 ± 0.000 ^a	0.001 ± 0.000 ^a	0.002 ± 0.000 ^b
PL51	0.002 ± 0.000 ^a	0.002 ± 0.000 ^a	0.003 ± 0.000 ^b
PL63	0.005 ± 0.000 ^a	0.007 ± 0.001 ^b	0.008 ± 0.001 ^b
PL75	0.010 ± 0.001 ^a	0.014 ± 0.002 ^b	0.016 ± 0.001 ^b
PL87	0.027 ± 0.001 ^a	0.031 ± 0.005 ^a	0.040 ± 0.002 ^b
Survival rate (%)	91.11 ± 3.85 ^a	95.56 ± 1.92 ^{ab}	97.78 ± 1.92 ^b

Means values in the same row with different superscripts are significantly different ($P \leq 0.05$)

ในอาหารกุ้งขาวแวนนาไม ช่วยเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตได้มากที่สุด และสามารถทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะได้อีกด้วย รายงานการวิจัยของ Xie *et al.* (2017) พบว่าการเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริก 150 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมในอาหารกุ้งขาวแวนนาไมสูตรปลาป่นต่ำช่วยให้น้ำหนักกุ้งเพิ่มขึ้น ค่าดัชนีตับ (hepatosomatic index) ดีขึ้น อัตราการรอดตายเพิ่มขึ้น อีกทั้งยังช่วยกระตุ้นฮอร์โมนและภูมิคุ้มกันอีกด้วย โดยเฉพาะเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียสูง กุ้งขาวแวนนาไมสามารถทนต่อความเข้มข้นสูงนั้นได้ โดยพิจารณาจากอัตราการรอดตายที่มากขึ้นกว่าการไม่ได้เสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกในอาหาร ให้ผลสอดคล้องกับการเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกในอาหารปลาเฉา (*Ctenopharyngodon idellus*) ระยะ juvenile โดยเมื่อเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกในอัตราส่วน 87.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม อาหารช่วยเพิ่มอัตราการเติบโตที่จำเพาะ (SGR) อย่างมีนัยสำคัญและ

ควบคุมการแสดงออกของยีน NPY และ ghrelin ที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นความอยากอาหารได้อย่างเหมาะสมที่สุด ทำให้อัตราการเติบโตจำเพาะมีค่าสูงสุดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้น ทำให้ malondialdehyde ลดลงได้ (Wu *et al.*, 2016) อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาพบว่า ในภาพรวมการเติบโตช้า (2.37 ± 0.11 กรัม) แม้ว่าอัตราการรอดมีค่าค่อนข้างสูง เมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม เป็นเวลา 60 วัน ของ Vieira *et al.* (2010) ซึ่งมีน้ำหนักเฉลี่ย 6.39 ± 0.86 กรัม ทั้งนี้ เนื่องจากกุ้งมีการติดเชื้อ EHP ระดับ ++++ มาตั้งแต่ระยะ PL12 ชว่นนำมาปรับสภาวะก่อนการทดลอง จึงมีผลให้กุ้งมีการเจริญเติบโตช้า ดังนั้น กรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกมีผลน้อยใน การควบคุม EHP แต่ส่งผลให้สุขภาพดี ความเครียดลดลง และสุขภาพตับดีขึ้น จึงทำให้กุ้งมีอัตราการรอดดี แต่มีขนาดเล็กกว่าปกติ

เมื่อทำการศึกษาเพิ่มเติมในกุ้งระยะ PL39 ภายใต้สภาวะความเครียดจากความเข้มข้นของเชื้อก่อ

โรคสูง (1.0×10^6 CFU/ml) อันเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ระยะเวลาการทดสอบ 12 วัน (Table 3) พบว่า ปริมาณเชื้อแบคทีเรียในน้ำเลี้ยงของกุ้งขาวแวนนาไม ระยะ PL39 ที่ได้รับการเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกในอาหารสำเร็จรูป ระดับ 0 (กลุ่มควบคุม), 0.2 และ 0.4 เปอร์เซ็นต์ ที่คงเหลือเมื่อครบระยะเวลา มีปริมาณเชื้ออยู่ระหว่าง $8.80 \times 10^3 \pm 6.79$ ถึง $10.53 \times 10^3 \pm 0.28$ CFU/ml ซึ่งมีค่าแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) และเมื่อทดสอบหาปริมาณเชื้อแบคทีเรียในตับของกุ้งขาวแวนนาไม ระยะ PL39 ที่ได้รับการเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกในอาหารสำเร็จรูป ระดับ 0.4 เปอร์เซ็นต์ มีค่าน้อยสุด $0.15 \times 10^3 \pm 0.42$ CFU/ml และยังมีอัตราการรอดตายสูงสุด 64.44 ± 1.93 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับกุ้งขาวแวนนาไม ระยะ PL39 กลุ่มควบคุม ซึ่งมีอัตราการรอดตายเท่ากับ 52.22 ± 6.94 เปอร์เซ็นต์ อาจเนื่องจากการกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกนั้น มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ

แบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ได้ และยังช่วยให้ตัวมีความสมบูรณ์และแข็งแรงสูงสุด สามารถป้องกันไม่ให้เชื้อแบคทีเรียเข้ามาได้ในปริมาณที่ก่อให้เกิดโรครุนแรงได้ และลดความเสี่ยงในการเกิดโรคได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Xie *et al.* (2017) พบว่าการเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริก อัตรา 150 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในอาหารกุ้งขาวแวนนาไม สูตรปลาป่นต่ำ ช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไม และทนทานต่อแอมโมเนีย ได้อย่างเหมาะสม การเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกอัตรา 50-100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในอาหารกุ้งขาวแวนนาไม ช่วยให้กุ้งขาวมีอัตราการรอดตายสูงขึ้น เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเชื้อ *V. alginolyticus* สูง (Bae *et al.*, 2022) ปริมาณการเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกที่แตกต่างกันนั้น เนื่องมาจากแหล่งของกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกที่นำมาใช้ มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้แตกต่างกัน รวมถึงสภาวะในระหว่างการเลี้ยงที่แตกต่างกันอีกด้วย

Table 3. Survival rate and vibriosis count after stress condition of high concentrations of sever bacteria *Vibrio parahaemolyticus* in water, immersion treatment for 12 days

Parameters	Level of gamma-aminobutyric acid		
	0%	0.2%	0.4%
Numbers of bacteria in hepatopancreas (CFU/ml)	$0.21 \times 10^3 \pm 0.12^b$	$0.15 \times 10^3 \pm 0.21^a$	$0.15 \times 10^3 \pm 0.42^a$
Numbers of bacteria in water (CFU/ml)	$10.53 \times 10^3 \pm 0.28^a$	$9.38 \times 10^3 \pm 3.84^a$	$8.80 \times 10^3 \pm 6.79^a$
Survival rate (%)	52.22 ± 6.94^a	63.33 ± 6.66^{ab}	64.44 ± 1.93^b

Means values in the same row with different superscripts are significantly different ($P \leq 0.05$)

สรุป

การศึกษาในครั้งนี้เมื่อทำการเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริก ระดับ 0.4 เปอร์เซ็นต์ในอาหารสำเร็จรูป จะช่วยเพิ่มการเจริญเติบโต และส่งผลให้คุณภาพของลูกกุ้งขาวแวนนาไม ระยะ PL25 มีค่าสูงสุดภายหลังการขนส่งด้วยอัตราความหนาแน่น 100 ตัวต่อลิตร หากเมื่อคำนึงถึงต้นทุนในการขนส่งของเกษตรกรพบว่า สามารถขนส่งลูกกุ้งขาวแวนนาไม ระยะ PL25 ในอัตราความหนาแน่นเพิ่มขึ้นได้ในอัตรา 500 ตัวต่อน้ำ 1 ลิตรได้ โดยที่คุณภาพอยู่ในระดับคุณภาพสูงกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม เป็นระยะเวลา 60 วัน พบว่า กุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับการเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริก ระดับ 0.4 เปอร์เซ็นต์ในอาหารสำเร็จรูป มีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว และอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวันสูงกว่ากลุ่มทดลองอื่น ๆ และเมื่อทดสอบความเครียดภายใต้สภาวะความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียสูง กุ้งที่ได้รับการเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกในอาหาร สามารถยับยั้งหรือป้องกันการติดเชื้อก่อโรคไวรัสได้ โดยปริมาณเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในตับมีค่าต่ำกว่ากลุ่มอื่น ส่งผลให้อัตราการรอดตายสูงขึ้น แสดงได้ว่าการเสริมกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริก 0.4% ในอาหารของกุ้งขาวแวนนาไมนี้ ช่วยเพิ่มการเจริญเติบโต เพิ่มความแข็งแรงของสุขภาพกุ้ง และสุขภาพตับ ลดความเสี่ยงในการเกิดโรคแบคทีเรียได้เป็นอย่างดี แต่มีผลน้อยในการควบคุมเชื้อ EHP

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ กองวิจัยและพัฒนาสุขภาพสัตว์น้ำ กรมประมง ที่อนุเคราะห์การวิเคราะห์โรคสัตว์น้ำด้วยวิธีทางอณูชีววิทยาและวิธีประเมินคุณภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่และนิสิตปริญญาตรีและนิสิตปริญญาโท ห้องปฏิบัติการโภชนศาสตร์อาหารสัตว์น้ำ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน ที่อนุเคราะห์การเก็บข้อมูลและการวิเคราะห์ต่าง ๆ

การศึกษานี้เป็นการศึกษาภายใต้โครงการพัฒนาวิชาการ 062/65 ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารอ้างอิง

- Abdel-Naime, W.A., J.R. Fahim, U.R. Abdelmohsen, M.A. Fouad, K.O. Al-Footy, A.A. Abdel-Lateff and M.S. Kamel. 2019. New antimicrobial triterpene glycosides from lemon balm (*Melissa officinalis*). South African Journal of Botany 125: 161-167. doi: 10.1016/j.sajb.2019.07.004.
- Bae, J., A. Hamidoghli, N.W. Farris, O.S. Olowe, W. Choi, S. Lee, S. Won, M. Ohh, S. Lee and S.C. Bai. 2022. Dietary γ -aminobutyric acid (GABA) promotes growth and resistance to *Vibrio alginolyticus* in whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture Nutrition 2022: 9105068, doi: 10.1155/2022/9105068.
- Bahorun, T., B. Gressier, F. Troitin, C. Brunet, T. Dine, M. Luyckx, J. Vasseur, M. Cazin, J.C. Cazin and M. Pinkas. 1996. Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. Arzneimittel-forschung 46(11): 1086-1089.
- Balcázar, J.L., T. Rojas-Luna and D.P. Cunningham. 2007. Effect of the addition of four potential probiotic strains on the survival of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following immersion challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. Journal of Invertebrate Pathology 96(2): 147-150.
- Chaweepack, T. 2022. Expose the secret of white feces syndrome in marine shrimp. Aquatic Life Magazine 31(384): 45-49. (in Thai)

- Chen, X., C. Gao, X. Du, H. Xu, G. Wang and D. Zhang. 2021. Effects of dietary γ -aminobutyric acid levels on the growth, serum biochemical indexes, immune-related signalling molecules of Jian carp. *Aquaculture Research* 52(3): 1096-1105.
- Chirawithayaboon, P., N. Areechon and O. Meunpol. 2020. Hepatopancreatic antioxidant enzyme activities and disease resistance of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed diet supplemented with garlic (*Allium sativum*) extract. *Agriculture and Natural Resources* 54(4): 377-386. (in Thai)
- Department of Fisheries. 2018. Standard criteria for evaluation of white leg shrimp postlarvae. (Online). Available: https://www4.fisheries.go.th/local/file_document/20190301135305_1_file.pdf (March 4, 2023). (in Thai)
- Froehlicher, T., T. Hennebelle, F. Martin-Nizard, P. Cleenewerck, J.-L. Hilbert, F. Trotin and S. Grec. 2009. Phenolic profiles and antioxidative effects of hawthorn cell suspensions, fresh fruits, and medicinal dried parts. *Food Chemistry* 115(3): 897-903.
- Hiransuchalert, R., T. Lertpattanapaiboon, P. Tippachararoch, S. Donnuea and S. Piyateratitivorakul. 2013. Development of 17 β -estradiol hormone mixed diets for ovarian maturation of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) broodstock in maturation tank. *Journal of Fisheries Technology Research* 7(2): 14-26. (in Thai)
- Jannoey, P., H. Niamsup, S. Lumyong, S. Tajima, M. Nomura and G. Chairrote. 2010. γ -Aminobutyric acid (GABA) accumulations in rice during germination. *Chiang Mai Journal of Science* 37(1): 124-133.
- Jeong, S.-B., Y.B. Kim, J.-W. Lee, D.-H. Kim, B.-H. Moon, H.-H. Chang, Y.-H. Choi and K.-W. Lee. 2020. Role of dietary gamma-aminobutyric acid in broiler chickens raised under high stocking density. *Animal Nutrition* 6(3): 293-304.
- Jorgensen, E.M. 2005. GABA. *WormBook : the online review of C. elegans biology*, 1-13. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.14.1>
- Liang, Y., Y. Wu, J. Li, R. Peng, M. Jiang, X. Jiang, S. Chen and J. Lin. 2022. Effects of ammonia toxicity on the histopathology, detoxification, oxidative stress, and immune response of the cuttlefish *Sepia pharaonis* and the mitigation of γ -aminobutyric acid. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 232: 113256, doi: 10.1016/j.ecoenv.2022.113256.
- Limsuwan, C., N. Chuchird, P. Prompamorn and K. Sangrungruang. 2006. Epizootiology of white shrimp *Litopenaeus vannamei* diseases in Thailand. Research report. National Research Council of Thailand, Bangkok. 539 p. (in Thai)
- Nakamura, U., T. Nohmi, R. Sagane, J. Hai, K. Ohbayashi, M. Miyazaki, A. Yamatsu, M. Kim and Y. Iwasaki. 2022. Dietary gamma-aminobutyric acid (GABA) induces satiation by enhancing the postprandial activation of vagal afferent nerves. *Nutrients* 14(12): 2492, doi: 10.3390/nu14122492.
- Ngo, D.H. and T.S. Vo. 2019. An updated review on pharmaceutical properties of Gamma-aminobutyric acid. *Molecules* 24(15): 2678. doi: 10.3390/molecules24152678.

- Nuangsaeng, B., V. Yuvanatemiya, R. Hiransuchalert, M. Sonthi, S. Tharanat, T. Samosorn and C. Chaiharn. 2016. Breed improvement and productivity increase of marine shrimp bloodstock raised from soil ponds in a biosecurity system for sustainable marine shrimp farming. Research Report. National Research Council of Thailand, Bangkok. 84 p. (in Thai)
- Pratoomchat, B. 2018. Effects of temperature and density for transportation the post larva of *Litopenaeus vannamei*, *Penaeus monodon* and *Macrobrachium rosenbergii* on survival rate and changeable some properties of transported medium. Research reports. Faculty of Science, Burapha University, Chonburi. 29 p. (in Thai)
- Ruchirawat, K. and K. Vaikrudha. 2003. Quality inspection of shrimp fry using the "Biotech Lab" method. pp. 271-280. In: S. Dilokkiat (ed.), Thai shrimp, a new step, one of the sustainable world leaders., Bangkok. (in Thai)
- Songkhla Aquatic Animal Health Research Center. 2018. Manual for Aquatic Animal's Disease Diagnosis Using PCR Techniques. Technical document. Songkhla Aquatic Animal Health Research Center, Songkhla. 101 p. (in Thai)
- Songkhla Aquatic Animal Health Research Center. 2022. EHP management in marine shrimp hatcheries and nurseries. (Online). Available: https://www4.fisheries.go.th/local/pic_activities/202207111614471_pic.pdf (March 4, 2023). (in Thai)
- Sonthi, M. 2015. Farm management model and organic matter control in shrimp ponds of farmers. for prevention of early mortality disease in marine shrimp. Research Report. Burapha University, Chanthaburi. 49 p. (in Thai)
- Turenus, C.I., J.R. Charles, D.H. Tsai, P.L. Ebersole, M.H. Htut, P.T. Ngo, R.N. Lara and B.G. Stanley. 2009. The tuberal lateral hypothalamus is a major target for GABA_A-but not GABA_B-mediated control of food intake. Brain Research 1283: 65-72.
- Tummarongkongsatit, A. 2007. Effective of Thai herb extracts to inhibit bacterial pathogens in Giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). M.S. Thesis. Maejo University, Chiang Mai. (in Thai)
- van den Pol, A.N. 2003. Weighing the role of hypothalamic feeding neurotransmitters. Neuron 40(6): 1059-1061.
- Vieira, F.N., C.C. Buglione, J.P.L. Mouriño, A. Jatobá, M.L. Martins, D.D. Schleder, E.R. Andreatta, M.A. Barraco and L.A. Vinatea. 2010. Effect of probiotic supplemented diet on marine shrimp survival after challenge with *Vibrio harveyi*. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia 62(3): 631-638.
- Wang, D.M., C. Wang, H.Y. Liu, J.X. Liu and J.D. Ferguson. 2013. Effects of rumen-protected γ -aminobutyric acid on feed intake, lactation performance, and antioxidative status in early lactating dairy cows. Journal of Dairy Science 96(5): 3222-3227.
- Wangsoontorn, S., C. Limsuwan and N. Chuchird. 2013. Effect of density and transportation times on survival rate of *Litopenaeus vannamei* postlarvae. pp. 198-206. In: Proceedings of 51st Kasetsart University Annual Conference: Veterinary Medicine,

- Fisheries. Kasetsart University, Bangkok. (in Thai)
- Wu, F., M. Liu, C. Chen, J. Chen and Q. Tan. 2016. Effects of dietary gamma aminobutyric acid on growth performance, antioxidant status, and feeding-related gene expression of juvenile grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*. Journal of the World Aquaculture Society 47(6): 820-829.
- Xie, S.-W., Y.-T. Li, W.-W. Zhou, L.-X. Tian, Y.-M. Li, S.-L. Zeng and Y.-J. Liu. 2017. Effect of γ -aminobutyric acid supplementation on growth performance, endocrine hormone and stress tolerance of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, fed low fishmeal diet. Aquaculture Nutrition 23(1): 54-62.
- Yu, H., J. Pei, W. Qiu, J. Mei and J. Xie. 2022. The antimicrobial effect of *Melissa officinalis* L. essential oil on *Vibrio parahaemolyticus*: Insights based on the cell membrane and external structure. Frontiers in Microbiology 13: 812792, doi: 10.3389/fmicb.2022.812792.
-