บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ปัญหาโรคระบาดในกุ้งกุลาดำนับว่ามีส่วนสำคัญต่อปริมาณผลผลิตและส่งผลกระทบต่อการส่งออกกุ้งกุลาดำของประเทศ โรคติดเชื้อหลายชนิดทำให้ปริมาณผลผลิตลดลง เช่น โรคแบคทีเรียเรืองแสง โรคไวรัสหัวเหลือง โรคไวรัสเอ็มบีวี และโรคไวรัสตัวแดงดวงขาว เป็นต้น (Lin and Nash, 1996 ; Lightner, 1996) โดยเฉพาะโรคติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีซึ่งแพร่กระจายในทุกพื้นที่ทั่วโลก (Chen *et al*., 1989 ; Lightner and Redman, 1981 ; Lightner *et al*., 1983) จากรายงานการศึกษาพบว่า การติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในกุ้งกุลาดำมีผลให้กุ้งเจริญเติบโตลดลง รวมทั้งมีอัตราการรอดตายต่ำ ซึ่งจะทำให้ผลผลิตลดลง (Chang and Chen, 1994) แต่ยังไม่มีรายงานที่ชัดเจนในระดับการติดเชื้อที่จะส่งผลต่อการเจริญเติบโตและผลผลิต อีกทั้งยังไม่มีรายงานที่ชัดเจนเกี่ยวกับผลของอาหารที่มีต่อการแพร่ระบาดของไวรัสเอ็มบีวี อย่างไรก็ตามมีรายงานที่ชี้ให้เห็นว่าเมื่อปลาหลายชนิดและกุ้งกุลาดำได้รับอาหารที่มีความอุดมสมบูรณ์ของสารอาหารที่เหมาะสมจะส่งผลให้ความต้านทานต่อโรคเพิ่มขึ้นและทำให้ปัญหาเกี่ยวกับการเกิดโรคลดลง (Vogt, 1986 ; Sorgeloose, 2001) ในขณะเดียวกันความเครียดจากคุณภาพน้ำ อาหาร และสิ่งแวดล้อมต่างๆ เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลให้ภูมิคุ้มกันของครัสตาเซียลดลงอันจะนำไปสู่การเกิดโรคต่างๆได้ (Moullac and Haffner, 2000) ดังนั้นการศึกษาผลของอาหารและปัจจัยด้านความเครียดต่อการเปลี่ยนแปลงการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีของกุ้งกุลาดำ ตลอดจนการศึกษาและการตรวจสอบผลของการติดเชื้อที่มีต่อการเจริญเติบโต การรอดตาย และปริมาณผลผลิตกุ้งกุลาดำจึงเป็นข้อมูลสำคัญที่จะนำมาใช้ประกอบการตัดสินใจและการคัดเลือกลูกพันธุ์กุ้งที่มีคุณภาพก่อนนำลงปล่อยเลี้ยงเพื่อให้ได้ผลผลิตสูงสุดและเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตให้สูงขึ้นได้ในอนาคต

การตรวจเอกสาร

1. การเลี้ยงกุ้งทะเลในประเทศไทย

การเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลกลายมาเป็นอุตสาหกรรมที่ยั่งยืนสำหรับประเทศไทยและประเทศอื่นๆในภูมิภาค แต่เดิมการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลแบบธรรมชาติ (extensive) ในเอเชียมีมาเป็นระยะเวลานานและประสบความสำเร็จเป็นอย่างยิ่ง ต่อมาเริ่มมีการพัฒนาการให้ได้ผลผลิตมากขึ้นหรือแบบกึ่งพัฒนา (semi-intensive) ทำให้เกิดผลตอบแทนทางเศรษฐกิจที่ดีมากขึ้น จนกระทั่งมีการพัฒนามาเป็นการเลี้ยงกุ้งแบบหนาแน่น หรือแบบพัฒนา (intensive) ดังเช่นในปัจจุบัน ซึ่งในช่วงแรกก็ให้ผลตอบแทนที่ดีเช่นกัน ในไต้หวันบางพื้นที่ประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบพัฒนา ผลผลิตเพิ่มขึ้นจากในอดีต 270 เมตริกตัน จนมีผลผลิตสูงสุด 95,000 เมตริกตัน ต่อมาเมื่อปี 1988 ไต้หวันประสบความล้มเหลวในการเพาะเลี้ยงกุ้งแบบพัฒนา (intensive) เป็นครั้งแรก และพบว่าจากการล้มเหลวในพื้นที่บางแห่งนั้นไม่สามารถฟื้นฟูกลับมาได้ มีการตายของกุ้งในบ่อดินแพร่กระจายอย่างกว้างขวางทำให้ผลผลิตตกลงไป 30,000 เมตริกตัน ซึ่งพบว่าการตายของกุ้งกุลาดำบางส่วนเป็นผลมาจากการเกิดโรคระบาด ในขณะเดียวกันประเทศไทยก็ประสบความล้มเหลวในลักษณะคล้ายๆกัน (Flegel, 1997) ซึ่งชี้ให้เห็นว่าขาดการวางแผนและการจัดการที่ดี ต่อมาได้มีการพัฒนาการเลี้ยงกุ้งในพื้นที่ใหม่เกิดขึ้น หันไปเลี้ยงกุ้งที่ลดความหนาแน่นลงให้เหมาะสม ควบคุมปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อม อีกทั้งมีการตระหนักในเรื่องของการควบคุมและป้องกันโรคระบาดมากยิ่งขึ้น พยายามที่จะแก้ปัญหาที่สาเหตุของการเกิดโรค และระมัดระวังในผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมซึ่งจะนำไปสู่แนวทางในการพัฒนาไปสู่การเลี้ยงกุ้งอย่างยั่งยืน

2. ระบบการเลี้ยง

การเลี้ยงกุ้งในประเทศไทยมีมาเป็นระยะเวลานาน และมีระบบการเลี้ยงที่แตกต่างกันไปตามยุคสมัยและการพัฒนาของสังคมและเศรษฐกิจ และเพื่อตอบสนองความต้องการของผู้บริโภคอย่างเพียงพอ ระบบการเลี้ยงที่มีในประเทศไทย ได้แก่ (กลุ่มบัณฑิตเกษตรอาสา, 2539)

2.1 การเลี้ยงกุ้งแบบธรรมชาติ

เป็นการเลี้ยงกุ้งที่อาศัยลูกพันธุ์กุ้งจากธรรมชาติเป็นหลัก โดยจะได้ลูกพันธุ์มาพร้อมกับการนำน้ำเข้าสู่พื้นที่เลี้ยงซึ่งจะใช้พื้นที่ในการเลี้ยงมาก ไม่มีการให้อาหารเนื่องจากอาศัยอาหารจากธรรมชาติ เลี้ยงไว้เป็นเวลา1-2 เดือน ปริมาณผลผลิตที่ได้จะไม่แน่นอนขึ้นอยู่กับลูกพันธุ์จากธรรมชาติ

2.2 การเลี้ยงกุ้งแบบกึ่งหนาแน่น

เนื่องจากการเลี้ยงกุ้งแบบใช้ลูกพันธุ์กุ้งจากธรรมชาติให้ผลผลิตเฉลี่ยค่อนข้างต่ำและบ้างครั้งก็ประสบปัญหาลูกพันธุ์กุ้งในธรรมชาติไม่เพียงพอ จึงได้มีการนำการเลี้ยงกุ้งแบบกึ่งหนาแน่นมาใช้เพื่อเพิ่มผลผลิต พื้นที่ในการเลี้ยงส่วนใหญ่ยังเหมือนกับการเลี้ยงกุ้งแบบธรรมชาติ และดัดแปลงบางส่วนมาใช้กักเก็บน้ำทะเลเพื่อเปลี่ยนถ่ายเป็นครั้งคราว แต่จะมีการควบคุมปัจจัยการผลิตต่างๆ ได้แก่ การนำพันธุ์ลูกกุ้งจากโรงเพาะฟักมาปล่อยเสริม การให้อาหาร การจัดการด้านโรค การเปลี่ยนถ่ายน้ำ รวมไปถึงการจัดการดูแลสภาพบ่อต่างๆด้วย

2.3 การเลี้ยงกุ้งแบบหนาแน่น

เป็นระบบการเลี้ยงที่ให้ผลผลิตสูง ดำเนินการโดยพยายามควบคุมปัจจัยการผลิตทั้งหมด รวมไปถึงการจัดการด้านอื่นๆ ได้แก่ การเพาะขยายพันธุ์ลูกกุ้งเพื่อนำมาเลี้ยงในบ่อ การเตรียมบ่อ การใส่ปุ๋ยการอนุบาลลูกกุ้ง การควบคุมระดับน้ำ การให้อาหาร รวมทั้งการปล่อยลูกพันธุ์กุ้งที่หนาแน่นกว่าการเลี้ยงกุ้งแบบอื่นๆ โดยมีอัตราส่วนในการปล่อยประมาณ 15 - 30 ตัวต่อตารางเมตร มีการจัดการที่ดีในการเปลี่ยนถ่ายน้ำ การควบคุมโรค มีการใช้เครื่องให้อากาศในน้ำและใช้เวลาในการเลี้ยงจนได้ขนาดตามความต้องการของตลาด

3. ผลผลิตกุ้ง

เมื่อพิจารณาตัวเลขผลผลิตรวมของกุ้งในปี 1991 – 2000 มีแนวโน้มผลผลิตกุ้งเพิ่มขึ้น ในขณะที่ ปี 2000 มีจำนวนผลผลิตกุ้งของโลกทั้งในส่วนของผลผลิตที่ได้จากการจับและผลผลิตที่ได้จากการเพาะเลี้ยง รวมทั้งหมด 4,168,400 ตัน โดยเพิ่มขึ้นจากปี 1999 เพียงเล็กน้อย จากตารางที่ 1 จะเห็นว่าประเทศจีนเป็นผู้ผลิตที่ใหญ่ที่สุดในโลกโดยมีปริมาณการผลิตที่ 1,241,900 ตัน คิดเป็นเกือบ 30 เปอร์เซ็นต์ของทั้งหมด อย่างไรก็ตาม ถ้าพิจารณาเฉพาะผลผลิตที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในปี 2001 ประเทศไทยเป็นประเทศผู้ผลิตที่ใหญ่ที่สุด โดยมีผลผลิตกุ้งที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมากถึง 280,000 ตัน (ตารางที่ 2) ซึ่งคิดเป็น 32 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่1) เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ผลิตรายใหญ่อื่นๆได้แก่ ประเทศจีน อินเดีย อินโดนีเซีย บังคลาเทศ และเวียดนาม

ตารางที่ 1 ผลผลิตรวมของกุ้งการจับและการเพาะเลี้ยงในปี 1991-2000

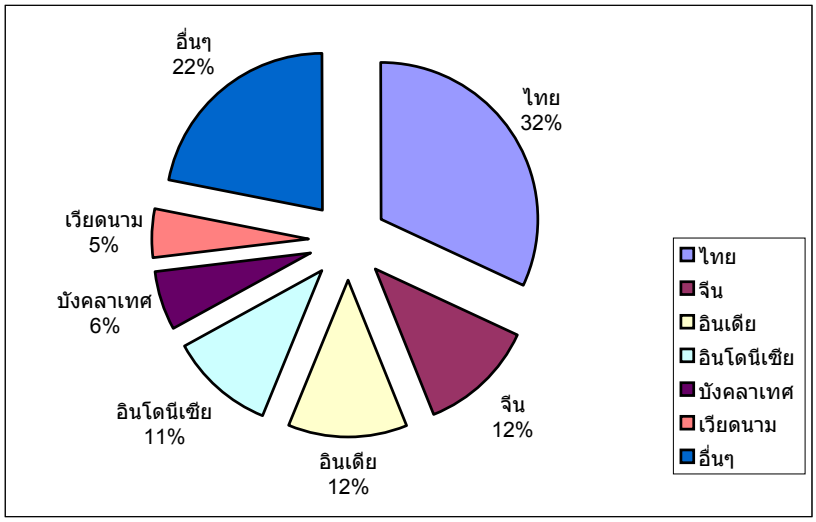
ประเทศ	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000
จีน	564.1	574.1	488.7	603.4	665.6	751.8	829.6	970.9	1227.7	1241.9
อินเดีย	300.5	290.4	363.0	446.6	406.1	415.6	366.6	413.1	423.3	405.7
ไทย	289.9	300.6	343.1	385.0	389.3	370.8	350.8	345.4	370.9	398.5
อินโดนีเซีย	296.8	312.1	300.7	317.1	334.7	343.3	382.2	345.5	384.5	398.4
อเมริกา	148.5	156.5	137.9	130.2	140.2	145.0	132.9	128.0	140.0	153.0
เวียดนาม	81.3	86.2	94.6	111.7	138.1	135.9	147.7	148.4	148.9	151.1
แคนนาดา	44.7	43.1	47.4	53.2	63.1	65.7	82.1	113.1	120.0	130.6
มาเลเซีย	104.7	129.4	109.8	106.4	99.6	108.0	101.0	57.1	102.7	111.9
เม็กซิโก	70.6	6.2	79.8	77.3	85.9	78.9	88.5	90.3	95.6	95.1
กรีนแลนด์	73.1	81.9	76.5	79.8	81.9	72.0	63.9	69.6	79.2	81.5
ฟิลิปปินส์	84.9	118.8	130.1	126.6	127.5	113.2	74.5	72.3	73.1	79.4
นอร์เวย์	49.0	49.1	49.0	38.2	39.3	41.5	42.0	57.1	64.2	66.2
บังคลาเทศ	19.6	21.0	28.5	28.8	34.0	49.3	56.5	66.1	81.1	58.2
บราซิล	42.3	44.0	38.4	38.5	43.0	38.9	44.1	42.8	47.7	56.6
เอกวาดอร์	118.8	127.0	97.5	98.7	112.1	112.9	137.2	147.4	121.0	51.4
เกาหลี	55.8	67.1	68.0	58.1	42.5	40.9	41.1	47.6	44.7	37.2
อื่นๆ	532.7	529.3	542.0	551.7	594.5	622.9	633.7	647.4	599.2	651.7
รวม	2877.3	2996.8	2995.0	3251.3	3397.4	3506.6	3574.4	3762.1	4118.9	4168.0

ที่มา: www. foodmarketexchange.com

ตารางที่ 2 ผลผลิตรวมของกุ้งที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในปี 1992-2001

ประเทศ	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001
ไทย	120.0	150.0	225.0	220.0	160.0	150.0	210.0	220.0	250.0	280.0
จีน	220.0	55.0	35.0	70.0	80.0	80.0	80.0	85.0	85.0	100.0
อินโดนีเซีย	150.0	80.0	100.0	130.0	90.0	80.0	80.0	85.0	85.0	90.0
อินเดีย	42.0	60.0	70.0	70.0	70.0	75.0	70.0	75.0	80.0	100.0
บังคลาเทศ	27.0	29.0	30.0	30.0	35.0	34.0	38.0	45.0	45.0	55.0
เอกวาดอร์	110.0	90.0	100.0	100.0	120.0	130.0	155.0	80.0	40.0	20.0
เวียดนาม	39.0	41.0	50.0	50.0	30.0	30.0	25.0	35.0	35.0	42.0
เม็กซิโก	6.0	6.5	12.0	12.0	12.0	16.0	17.0	20.0	25.0	32.0
ฟิลิปปินส์	25.0	20.0	18.0	25.0	25.0	10.0	15.0	20.0	20.0	25.0
โคลัมเบีย	10.0	12.0	18.0	20.0	20.0	18.0	18.0	18.0	20.0	25.0
ไต้หวัน	25.0	20.0	15.0	7.0	6.0	14.0	10.0	9.0	10.0	10.0
ฮอนดูรัส	5.2	5.7	6.5	10.0	10.0	12.0	12.0	10.0	10.0	12.0
ปานามา	4.2	4.4	4.6	10.0	10.0	10.0	10.0	9.0	8.0	5.5
กัวเตมาลา	2.5	2.7	3.0	7.0	7.0	7.0	7.0	6.0	6.0	4.5
เปรู	5.6	5.8	6.0	8.0	8.0	6.0	6.0	5.0	5.0	2.5
ญี่ปุ่น	3.5	3.5	3.6	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
อื่นๆ	45.0	51.2	50.0	14.0	30.0	35.0	55.0	54.0	50.0	47.0
รวม	840.0	636.8	746.7	788.0	718.0	712.0	813.0	781.0	779.0	855.0

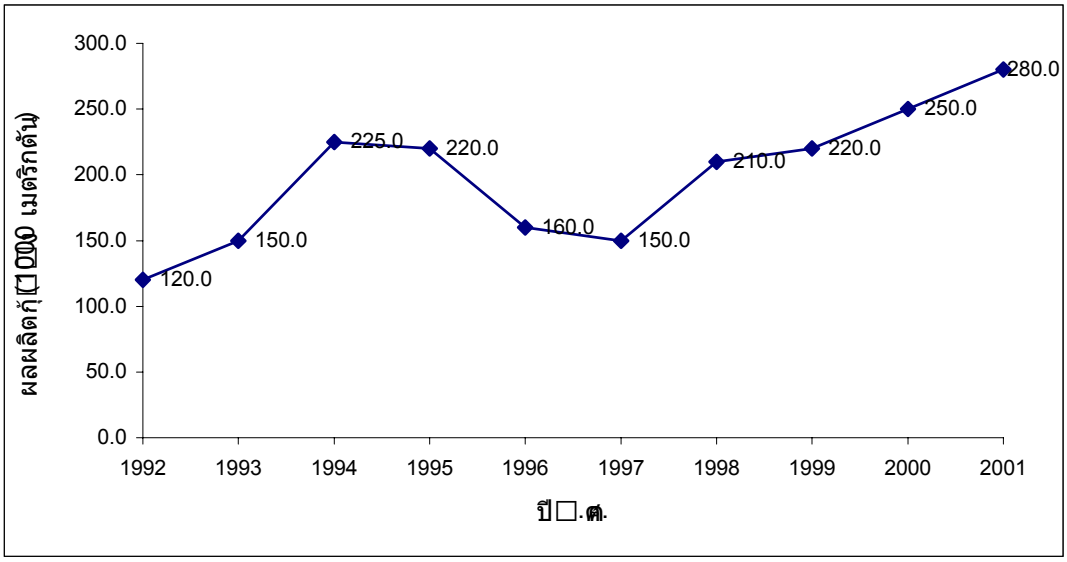
ที่มา: www. foodmarketexchange.com



ภาพที่ 1 ผู้ผลิตรายใหญ่ของโลก ในการผลิตผลผลิตจากการเพาะเลี้ยงกุ้งในปี 2001

ที่มา : www. foodmarketexchange.com

นอกจากนี้แล้วเมื่อพิจารณาเฉพาะการผลิตผลผลิตกุ้งจากการเพาะเลี้ยงในประเทศไทยตั้งแต่ปี 1992 –2001 พบว่าผลผลิตจากอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทยมีการเจริญเติบโตอย่างคงที่ โดยในปี 1998 มีการเจริญเติบโตที่ 40 เปอร์เซ็นต์ ปี 1999 มีผลผลิตเพิ่มขึ้น 5 เปอร์เซ็นต์ และในปี 2000 และ 2001 มีผลผลิตเพิ่มขึ้น 14 และ 12 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ภาพที่ 2) แสดงให้เห็นว่าอัตราการขยายตัวของอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งเริ่มคงที่



ภาพที่ 2 ผลผลิตจากอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย

ที่มา : www. foodmarketexchange.com

4. ปัญหาที่เกิดขึ้นในอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย

4.1 การแพร่ระบาดของโรค

อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งทั้งในส่วนของโรงเพาะฟักและบ่อดินมักจะประสบปัญหาในลักษณะคล้ายๆ กัน คือ ได้รับผลกระทบจากการเกิดการแพร่ระบาดของโรคต่างๆ โรคที่พบทั่วไปในส่วนของโรงเพาะฟัก ได้แก่ โรคแบคทีเรีย โดยเฉพาะโรคแบคทีเรียเรืองแสงที่เกิดขึ้นจะสร้างความเสียหายอย่างมากโดยก่อให้เกิดอัตราการตายสูงซึ่งโรคชนิดนี้สามารถเกิดได้ทุกฤดูกาลตลอดทั้งปี แต่มักจะพบมากกว่าในช่วงฤดูร้อน และความเค็มสูง (สุภฎา และคณะ 2543) โรคเชื้อรา ได้แก่ แลกจินิเดียม *Lagenidium* sp. และโรคปรสิตที่เกิดจาก ซูแทมเนียม *Zoothamnium* sp. ก็เป็นปัญหาทั้งในส่วนของโรงเพาะฟักและบ่อดินที่มีสิ่งแวดล้อมไม่ดีและมักจะเกิดในกุ้งที่อ่อนแอ ในส่วนของบ่อดิน โรควิบริโอซิสก็เป็นสาเหตุสำคัญเช่นกัน โดยมักพบการติดเชื้อใน 1-2 เดือนหลังจากระยะโพสต์ลาวา 15 - 20 เชื้อวิบริโอที่มักพบในกุ้งและก่อให้เกิดปัญหาในประเทศไทย ได้แก่ *V. parahaemolyticus*, *V. anguillarum*, *V. vulnificus* และ *V. damsela* เป็นต้น (Lin and Nash, 1996 ; Lightner, 1996) นอกจากนี้โรคไวรัสที่เกิดขึ้นในระบบการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทยก็สร้างความเสียหายให้กับเกษตรกรมิใช่น้อย โรคไวรัสที่มีความรุนแรงและพบการแพร่ระบาด ได้แก่ โรคไวรัสตัวแดงดวงขาว (white spot syndrome virus) (Flegel *et al*., 1996 ; Flegel, 1997) โรคไวรัสหัวเหลือง (Yelow-Head Virus) (Flegel *et al*., 1995 ; Flegel *et al*., 1996) เป็นต้น นอกจากนี้ไวรัสที่ไม่มีความรุนแรงมากนักแต่สามารถสร้างความเสียหายให้กับผลผลิตกุ้ง โดยทำให้เกิดโรคแคระแกรน หรือ เป็นสาเหตุให้กุ้งโตช้ามีขนาดแตกต่างกัน และความผิดปกติในกุ้ง ได้แก่ ไวรัสไอเอชเอชเอ็น (Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus) (Kalaganya *et al*., 1991 ; Flegel, 1997) ไวรัสเอชพีวี (Hapatopancreatic Parvo-like Virus) (Flegel *et al.,* 1999) และไวรัสเอ็มบีวี (Monodon baculovirus) (Chang and Chen, 1994)

4.2 สิ่งแวดล้อม

ตั้งแต่ช่วงปี 1990 การเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบหนาแน่นกลายเป็นอุตสาหกรรมที่สำคัญของโลก ต่อมามีการแพร่ระบาดของโรคและมีอัตราการตายของกุ้งเพิ่มมากขึ้นในหลายๆพื้นที่ จากการศึกษาผลกระทบของการเลี้ยงกุ้งแบบหนาแน่นพบว่า ความบกพร่องในการจัดการตะกอนดิน คุณภาพน้ำ การจัดการด้านอาหาร คุณภาพของลูกพันธุ์ รวมไปถึงการใช้ยาและสารเคมี เป็นสาเหตุที่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและเมื่อสิ่งแวดล้อมเสื่อมโทรมลงก็จะส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งในระยะยาวด้วย (Lin and Nash, 1996) ปัญหาสิ่งแวดล้อมที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่มักจะเป็นมลพิษทางน้ำที่เกิดขึ้นเนื่องจากกิจกรรมชายฝั่ง การเพาะเลี้ยงกุ้งเป็นกิจกรรมหนึ่งที่ส่งผล

กระทบต่อคุณภาพน้ำบริเวณชายฝั่ง เนื่องมาจากการขาดความรู้ความเข้าใจและการจัดการหรือการบำบัดน้ำก่อนปล่อยสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ ของเสียจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเป็นพวกอาหารที่เหลือและของเสียจากการขับถ่าย รวมทั้งตะกอนพื้นบ่อซึ่งส่วนใหญ่เป็นสารอินทรีย์เมื่อปล่อยลงสู่แหล่งน้ำจะเป็นการเพิ่มสารอาหารให้แก่แหล่งน้ำนั้นทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนของแพลงก์ตอนอย่างรวดร็ว เกิดภาวะออกซิเจนต่ำในแหล่งน้ำ หรือ แพลงก์ตอนบางชนิดอาจส่งผลต่อการเจริญเติบโต หรือทำให้สัตว์น้ำบางชนิดตายได้ (ประทักษ์, 2542)

4.3 **พ่อแม่พันธุ์**

ในอดีตประเทศไทยใช้ลูกพันธุ์จากธรรมชาติ โดยกุ้งระยะโพสต์ลาวาจะถูกนำมาเลี้ยงพร้อมกับการสูบน้ำทะเลเข้าบ่อเลี้ยง หรือนำลูกกุ้งที่จับได้จากทะเลไปเลี้ยง ต่อมามีการเปลี่ยนระบบการเลี้ยงจากการเลี้ยงกุ้งแบบธรรมชาติมาเป็นการเลี้ยงกุ้งแบบหนาแน่น ต้องใช้พันธุ์กุ้งมากขึ้น ทำให้ต้องอาศัยลูกพันธ์กุ้งจากโรงเพาะฟักเท่านั้น ซึ่งจะมีการนำพ่อแม่พันธุ์จากธรรมชาติมาเร่งให้มีการสร้างและการฟักของไข่ ปัญหาโรคที่พบในพ่อแม่พันธุ์จากธรรมชาติที่นำมาใช้ในโรงเพาะฟักในประเทศไทยเป็นอีกปัญหาหนึ่งที่มีความสำคัญ เนื่องจากการใช้พ่อแม่พันธุ์ที่เป็นโรคหรือเป็นพาหะนำโรคจะส่งผลกระทบต่อลูกกุ้งรวมไปถึงผลผลิตกุ้งจากบ่อดินด้วย จากรายงานการศึกษาของ Flegel และคณะ (1992) ได้ทำการศึกษาการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในพ่อแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่ได้จากธรรมชาติ โดยศึกษาพยาธิสภาพที่เกิดในเซลล์ของต่อมน้ำเหลือง (lymphoid organ) เกิดความผิดปกติในเซลล์โดยเกิดก้อนกลมขึ้นในเซลล์ของต่อมน้ำเหลืองคิดเป็น 90 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนตัวอย่างที่นำมาศึกษาและพบอนุภาคไวรัส 1 ตัวอย่างจาก 5 ตัวอย่าง จากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า พ่อแม่พันธุ์ที่นำมาจากธรรมชาติ อาจมีโรคหรือเป็นพาหะของโรคต่างๆ ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อลูกพันธุ์ ดังนั้นควรจะมีการตรวจสุขภาพพ่อแม่พันธุ์ก่อนนำมาใช้ทุกครั้ง นอกจากนี้ยังมีปัญหาหนึ่งที่เกิดขึ้นในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำในประเทศไทย ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อลูกพันธุ์ด้วยนั่นคือ การจับพ่อแม่พันธุ์จากธรรมชาติที่มากขึ้นทุกวันทำให้มีปัญหาพ่อแม่พันธุ์ในธรรมชาติมีปริมาณลดลง และด้วยเหตุนี้บางส่วนจึงมีการหันมาใช้พ่อแม่พันธุ์ที่ได้จากบ่อเลี้ยงซึ่งจากรายงานการศึกษาขนาดและแหล่งที่มาของพ่อแม่พันธุ์ไม่มีผลต่อช่วงระยะความสมบูรณ์เพศ แต่อย่างไรก็ตามจากรายงานการศึกษาของ Ruangpanit และคณะ (1984) (อ้างโดย Menasveta *et al*., 1994) พบว่า พ่อแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่ได้จากธรรมชาติเมื่อนำมาตัดก้านตาจะสมบูรณ์เพศและให้ลูกพันธุ์ภายใน 20-30 วัน และในการศึกษาของ AQUACOP (1983) ได้รายงานไว้ว่า พ่อแม่พันธุ์ที่ได้จากบ่อเลี้ยงสามารถให้ลูกพันธุ์หลังจากตัดก้านตาเป็นเวลาเฉลี่ย 14-21 วัน

4.4 การเจริญเติบโตของกุ้ง

จากรายงานการศึกษาของ Flegel และคณะ (1997) ได้กล่าวถึงปัญหาของเกษตรกรในเรื่องของส่วนแบ่งตลาดของผลผลิตกุ้งที่มีผลกระทบต่อเกษตรกรเป็นอย่างมาก เนื่องจากประสบปัญหากุ้งโตช้าและหลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือนมีขนาดน้อยกว่า 5 กรัมเมื่อเปรียบเทียบกับขนาดปกติที่ควรจะเป็นคือ 20 –30 กรัม จากข้อมูลการศึกษาตั้งแต่ปี 1989-1994 พบว่าปัญหากุ้งโตช้าทำให้ผลผลิตต่ำลง ไม่ตรงกับขนาดที่ต้องการของตลาด นอกจากนี้ พบว่ายังมีปัญหาเรื่องผลผลิตกุ้งที่ได้มีขนาดแตกต่างกันซึ่งจากการสำรวจในปี 1989 ขนาดกุ้งที่จำหน่าย มีสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation) ของขนาดกุ้ง 30 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในปี 1994ขนาดกุ้งที่จำหน่ายออกสู่ตลาดมีสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนสูงถึง 40 เปอร์เซ็นต์

4.5 สารตกค้างและการกีดกันทางการค้า

การเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทยสามารถส่งเป็นสินค้าส่งออกได้เป็นอันดับต้นๆของโลก แต่ในปัจจุบันผู้เลี้ยงกุ้งและผู้ส่งออกของไทยได้ประสบปัญหาการปนเปื้อนสารตกค้างและราคาของกุ้งที่ต่ำลง ซึ่งทางสหภาพยุโรปได้มีการกำหนดสารต้องห้ามที่มิให้ใช้กับสัตว์เลี้ยงเพื่อการบริโภคหลายชนิด ได้แก่ ไนโตรฟูแรน (nitrofuran) และคลอแรมเฟนิคอล (chloram phenecal) เป็นต้น นอกจากนี้แนวโน้มตลาดโลกในอนาคตจะมีกฎระเบียบการนำเข้าสินค้าประเภทอาหารมากขึ้นซึ่งจะเป็นไปในทางที่สินค้าประเภทอาหารจะต้องสด สะอาด ปราศจากสารสารพิษหรือสารตกค้างต่างๆที่ก่อให้เกิดปัญหากับผู้บริโภคได้ และด้วยเหตุนี้เองที่ประเทศไทยโดยกรมประมงได้เริ่มส่งเสริมให้มีการเลี้ยงกุ้งในมาตรฐาน GAP (good aquculture practices) และ CoC (code of conduct)

5. ไวรัสเอ็มบีวี (Monodon baculovirus ; MBV)

5.1 สัณฐานวิทยาและชีววิทยาของไวรัสเอ็มบีวี

มีรายงานการพบเชื้อไวรัสในกลุ่มแบคคูโลไวรัส (baculovirus) ที่สร้างออกคลูชั่นบอดี้ ในปี 1974 ทั้งที่พบในธรรมชาติและในฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล (Couch, 1974b) จากการศึกษาโดยใช้เทคนิคจุลทรรศน์อิเลคตรอนโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบทรานสมิชชั่น ในการตรวจหาไวรัส ที่สร้างออกคลูชั่นบอดี้ในเซลล์ที่ติดเชื้อ โดยศึกษาทางสัณฐานวิทยา แบคคูโลไวรัสที่พบในครัสเตเซียจัดอยู่ในแฟมิลี่แบคคูโรวิริดี (Baculoviridae) จีนัสนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัส (Nucleopolyhedrovirus) ไวรัสพวกที่มีนิวคลีโอแคปสิด1ชั้น และสร้างออกคลูชั่นบอดีที่เป็นโปรตีนโพลีฮีดริน (single nucleocapsid polyhedrosis virus) ในตอนแรกแยกได้เป็น 2 กลุ่ม โดยแยกจากขนาดที่แตกต่างกันของออกคลูชั่นบอดี้ กลุ่มแรกคือ กลุ่มไวรัสบีพี (Baculovirus

penaei : BP) มีออกคลูชั่นบอดีเป็นแบบปิรามิดฐานสี่เหลี่ยม tetrahedral กลุ่มที่ที่สอง คือ กลุ่มไวรัสเอ็มบีวี (Monodon baculovirus : MBV) มีออกคลูชั่นบอดี้เป็นแบบก้อนกลม เนื่องจากมีการรายงานการตรวจพบ ไวรัสพวกที่มีนิวคลีโอแคปสิด1ชั้นและสร้างโปรตีนโพลีฮีดริน ในกุ้งชนิดต่างๆ ในหลายแห่ง ทำให้ทราบได้ว่าไม่สามารถแยกกลุ่มของเชื้อไวรัสชนิดนี้ด้วยการแยกจากขนาดของออกคลูชั่นบอดี้ที่สร้างขึ้น ดังนั้นจึงมีการปรับเปลี่ยนมาใช้ การจำแนกแบบมาตรฐาน (International Committee on Taxonomy of Virus) ทำให้สามารถแยกได้เป็น 2 กลุ่ม โดยศึกษาความแตกต่างของโครงผลึกของโปรตีนในออกคลูชั่นบอดี (Crystalline structure) พบว่าในกลุ่ม ไวรัสบีพี จะมีหน่วยย่อยเรียงกันในแนวขนาน ส่วนกลุ่มไวรัสเอ็มบีวีจะมีหน่วยย่อยเรียงกันเป็นวงคล้ายรูปดอกไม้ โดยมี 2 หน่วยย่อยที่ใช้ร่วมกับวงถัดไปกลายเป็นวงที่ต่อเนื่องกัน (Bonami, 1997)

ออกคลูชั่นบอดีที่สร้างขึ้นภายในเซลล์ตับและตับอ่อนของกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวี ประกอบด้วยร่างแหของผลึกโพลีฮีดริน (polyhedrin) ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 17 ไมโครเมตร (Ramasamy *et al*.,1995) ซึ่งภายในก้อนโปรตีนนี้จะมีอนุภาคไวรัส มีลักษณะเป็นรูปแท่ง มีผนังหุ้มชั้นเดียว นิวคลีโอแคปสิดติดสีเข้ม ขนาดของอนุภาคไวรัสมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 75$\pm$4 นาโนเมตร และยาวประมาณ 324$\pm$33 นาโนเมตร (Lu *et al*.,1995) จากรายงานวิจัยของ Chen และคณะ (1989) ในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* พบว่าขนาดอนุภาคไวรัสโดยวัดจากความยาวของเอนเวลลอปได้ 325$\pm$20 นาโนเมตร กว้าง 58$\pm$2 นาโนเมตร และในกุ้ง *Penaeus penicillatus* พบว่าอนุภาคไวรัสมีความยาว 265$\pm$12 นาโนเมตร กว้าง 48$\pm$4 นาโนเมตร Ramasamy และคณะ (1995) ได้ศึกษาทางจุลทรรศน์อิเลคตรอนของเซลล์ตับอ่อนที่ติดเชื้อพบลักษณะโครงสร้างของออกคลูชั่นบอดีเป็นแบบโครงผลึกซึ่งมีลักษณะต่อกันเป็นร่างแหของโปรตีนโพลีฮีดริน มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 17 นาโนเมตร ไวรัสที่พบมีรูปแท่งมีทั้งแบบที่สร้างโปรตีนและไม่สร้างโปรตีนซึ่งแยกความแตกต่างได้จากรายละเอียดโครงสร้างและสัณฐานวิทยา และยังประกอบด้วย เอนเวลลอปทีมีขนาดกว้าง 83 $\pm$ 0.02 นาโนเมตร และยาว 299 $\pm$ 0.02 นาโนเมตร นิวคลีโอแคปสิดมีขนาดกว้าง 69 $\pm$ 1.2 นาโนเมตร และ ยาว 194 $\pm$ 0.01 นาโนเมตร เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนพบว่าภายในก้อนโปรตีนในนิวเคลียสจะมีอนุภาคไวรัส และมองเห็นบริเวณที่มีการสร้างอนุภาคไวรัสเป็นสีน้ำตาลดำ นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียในนิวเคลียสของเซลล์ตับและตับอ่อนที่ติดเชื้อด้วย

5.2 ลักษณะทางชีวเคมีของออกคลูชั่นบอดี

ออกคลูชั่นบอดีเป็นโพลิฮีดรินโปรตีนที่สร้างจากโพลิฮีดรินยีนในดีเอ็นเอของไวรัสเอ็มบีวี การศึกษาทางชีวเคมีของออกคลูชั่นบอดีของเชื้อไวรัสเอ็มบีวีที่ถูกสร้างขึ้นภายในเซลล์ที่ติดเชื้อ จะ

สามารถทำให้ทราบถึงองค์ประกอบของโปรตีนต่างๆในออกคลูชั่นบอดี จากการศึกษาลักษณะทางชีวเคมีของออกคลูชั่นบอดีของเชื้อไวรัสเอ็มบีวี โดย Chang และคณะ (1992) โดยนำกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีไปบดแล้วแยกองค์ประกอบด้วยเทคนิคการหมุนเหวี่ยงในสารละลายซูโครสที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 35-65 เปอร์เซ็นต์ (sucrose gradient centrifugation) จากนั้นทำการวิเคราะห์จำนวนโพลีเปปไทด์ ของออกคลูชั่นบอดี โดยการทำเอสดีเอส-เพจ เจล (SDS-PAGE gel) พบว่าออกคลูชั่นบอดีมีโพลีเปปไทด์ 12 หน่วยย่อย โดยหน่วยโปรตีนหลักมีน้ำหนัก 62 กิโลดาลตัน และหน่วยโปรตีนย่อยอีก11 แถบ มีน้ำหนักดังต่อไปนี้คือ 160, 125, 60, 55, 50, 45, 40, 34, 32 และ 27 กิโลดาลตัน จากนั้นได้นำเอาออกคลูชั่นบอดีที่บริสุทธิ์ไปฉีดในกระต่ายเพื่อจะได้แอนติซีรั่มของออกคลูชั่นบอดีของเชื้อไวรัสเอ็มบีวีแล้วนำมาทำเวสเทิร์น บลอท (western blot) โดยใช้ออกคลูชั่นบอดีที่บริสุทธิ์เป็นมาตรฐานเปรียบเทียบกับตับบดของกุ้งที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวี พบว่าเกิดแถบที่ 62 กิโลดาลตัน ในส่วนของตับบดที่ติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวี ด้วยเหตุนี้เองทำให้สามารถทราบได้ว่า โปรตีน โพลีฮีดริน เป็นหน่วยโปรตีนหลักที่มีขนาด 62 กิโลดาลตัน และหน่วยโปรตีนย่อยที่พบเป็นส่วนของโพลีเปปไทด์ของไวรัสที่ประกอบอยู่ในออกคลูชั่นบอดี

5.3 ชนิดของเจ้าบ้าน /การแพร่กระจาย

5.3.1 ชนิดของเจ้าบ้าน (host species)

กุ้งที่ยอมรับต่อเชื้อไวรัสเอ็มบีวีจะอยู่ในระยะที่ง่ายต่อการติดเชื้อ คือ ระยะวัยอ่อน โพสต์ลาวา และระยะวัยรุ่น โอกาสในการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีจะลดลงเมื่อกุ้งอยู่ในระยะหลังจากระยะโพสต์ลาวา 25 กุ้งที่ง่ายต่อการติดเชื้อได้แก่ *Penaeus monodon* , *P. esculentus* , *P. semisulcatus* , *P. penicillatus* , *P. kerathurus* , *P. plegejus* และ *P. merguiensis* (Lightner,1996)

5.3.2 การแพร่กระจายของเชื้อ

เชื้อไวรัสเอ็มบีวีพบอย่างกว้างขวางในแถบประเทศจีน ไต้หวัน ฟิลิปปินส์ มาเลเซีย สิงคโปร์ ไทย ศรีลังกา อินเดีย อินโดนีเซีย และออสเตรเลีย นอกจากนี้ยังเคยมีรายงานว่าพบเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในประเทศคูเวต โอมาน อิสราเอล อิตาลี เคนยา และแกมเบีย และกุ้งที่ถูกนำเข้ามาในประเทศตาฮิติ ฮาวาย เม็กซิโก เอกวาดอร์ บราซิล เปอร์โตริโก (Lightner, 1996)

5.4 ระยะการติดเชื้อ

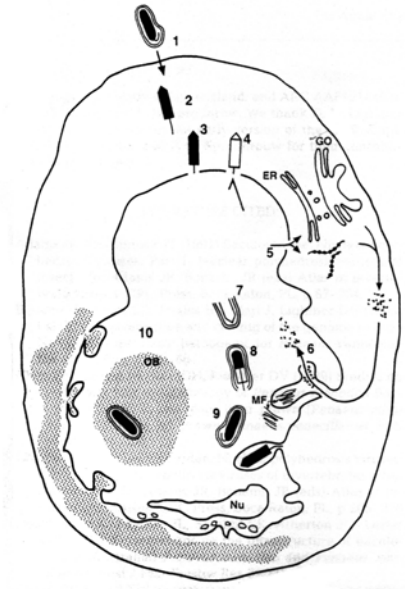
การศึกษาข้อมูลจากโรงเพาะฟักพบว่ากุ้งวัยอ่อนที่ติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีมีอัตราการตายสูงและมีอัตราการเจริญเติบโตช้าลงกว่าปกติ (Chang and Chen, 1994) ด้วยเหตุนี้เองทำให้ผลผลิต

ลดลง เพื่อคุณภาพของลูกกุ้งจึงจำเป็นต้องมีการกำจัดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีจากโรงเพาะฟัก ดังนั้นการศึกษาสาเหตุที่ทำให้กุ้งติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีเป็นสิ่งสำคัญ Chen และคณะ (1992) ได้ทำการศึกษาหนทางที่ทำให้กุ้งติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวี โดยนำกุ้งระยะนอเพลียส หรือไข่ที่เพิ่งฟัก 7,000-10,000 ตัวต่อตันลงเลี้ยงในถัง ศึกษาการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในตับอ่อนในแต่ละระยะของกุ้งกุลาดำตั้งแต่ซูเอีย 1 ถึง โพสต์ลาวา 40 โดยใช้วิธีทำนำตับมาบี้บนสไลด์ (squash mount) แล้วย้อมด้วยสีมาลาไคท์กรีน และวิธีการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาแล้วย้อมด้วยสีฮีมาท็อกซิลินและ อีโอซิน ลูกกุ้งจะถูกเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28-33 องศาเซลเซียส โดยแบ่งเป็นชุดการทดลองต่างๆ พบว่า ลูกกุ้งที่มาจากพ่อแม่พันธุ์ที่ปลอดเชื้อเอ็มบีวี จะเกิดการติดเชื้อเอ็มบีวีเมื่อเข้าสู่ระยะโพสต์ลาวา15 ลูกกุ้งที่มาจากพ่อแม่พันธุ์ที่ติดเชื้อเอ็มบีวีจะติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีตั้งแต่ระยะไมซิส 2 จะเห็นว่าลูกกุ้งที่มาจากพ่อแม่พันธุ์ที่ติดเชื้อเอ็มบีวีเช่นเดียวกันแต่มีการแช่ลูกกุ้งด้วยฟอร์มาลินและไอโอโดฟอร์ (iodophore) ก่อนและมีการดูแลความสะอาดของน้ำทะเลที่ใช้เลี้ยง พบว่ากุ้งในกลุ่มนี้จะเริ่มติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีเมื่อเข้าสู่ระยะ โพสต์ลาวา 12 นอกจากนี้กุ้งในกลุ่มที่มาจากพ่อแม่พันธุ์ที่ปลอดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีแล้วทำให้ได้รับขี้กุ้งที่มีเชื้อไวรัสเอ็มบีวี พบว่าทำให้กุ้งติดเชื้อได้ตั้งแต่ระยะไมซิส 2 จากผลการทดลองนี้เองแสดงให้เห็นว่าลูกกุ้งไม่ได้ติดเชื้อไวรัสโดยผ่านทางพ่อแม่แต่เนื่องมาจาก การกินออกคลูชั่นบอดี้หรือ อนุภาคไวรัสเข้าไป จะเห็นว่ากุ้งกุลาดำในระยะวัยอ่อน การเกิดขึ้นและความรุนแรงต่ำทำให้สามารถตรวจวินิจฉัยได้ยาก นอกจากนี้ Ramasamy และคณะ (1995) ได้รายงานการสำรวจการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในธรรมชาติในระยะต่างๆของกุ้งกุลาดำ พบว่ากุ้งกุลาที่ติดเชื้อจากประเทศฟิลิปปินส์และตาฮิติที่ถูกสำรวจจากระยะโพสต์ลาวา 5 – 40 มีการติดเชื้อเพิ่มขึ้น การเลี้ยงกุ้งในสภาวะที่หนาแน่นจะทำให้ง่ายต่อการติดเชื้อและการพัฒนาการติดเชื้อ การติดเชื้อและความรุนแรงจะลดลงเมื่อกุ้งอายุมากขึ้น จากผลการศึกษาจะเห็นว่ากุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อจากประเทศไต้หวันมีการติดเชื้อลดลงเรื่อยๆเมื่ออายุมากขึ้นโดยมีความยาวของเปลือกส่วนหัวและอก (carapace) มากขึ้น ในขณะที่ จากการศึกษาดังกล่าวจะเห็นว่า กุ้งกุลาดำในระยะวัยอ่อนมักจะมีการติดเชื้อและความรุนแรงของโรคต่ำทำให้ไม่สามารถตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อได้จนกระทั่งเมื่อกุ้งเข้าสู่ระยะโพสต์ลาวา จะเริ่มตรวจพบการติดเชื้อและมีความรุนแรงเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนสูงสุดซึ่งในระยะนี้จะมีอัตราการตายสูงด้วย จากนั้นการติดเชื้อและความรุนแรงจะลดลงเมื่อกุ้งอายุมากขึ้น

5.5 กลไกการเข้าสู่เซลล์ของเชื้อไวรัสเอ็มบีวี

กลไกการเข้าสู่เซลล์ของเชื้อไวรัสเอ็มบีวียังไม่เคยมีในรายงาน ในแบคคูโลไวรัสที่ติดเชื้อในเซลล์ของแมลงจะเข้าสู่ไซโตพลาสซึมของเซลล์โดยทำให้เกิดการละลายของเมมเบรน จากนั้นไวรัส

จะทิ้งเอนเวลลอปไว้นอกเซลล์แล้วเข้าสู่เซลล์ สำหรับรูปแบบกลไกของวงชีวิตของไวรัสเอ็มบีวียังไม่มีรายงานชัดเจนแต่ได้มีรูปแบบที่นำเสนอไว้ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 โมเดลสำหรับวงชีวิตของไวรัสเอ็มบีวี
ที่มา : Vicker และคณะ (2000)

จากภาพที่ 3 กลไกการเข้าสู่เซลล์มีดังนี้คือ 1) ไวรัสเข้าสู่เซลล์โดยทิ้งเอนเวลลอป (envelope) ไว้นอกเซลล์ 2) จะเหลือแต่นิวคลีโอแคปสิด (nucleocapsid) ของไวรัสที่เข้าสู่เซลล์ 3) นิวคลีโอแคปสิด (nucleocapsid) จะเข้าไปจับกับเมมเบรนของนิวเคลียส การเข้าจับจะเข้าจับตรงส่วนของนิวคลีโอพอร์ (nucleopore) และ 4) ส่งผ่านกรดนิวคลีอิค (nucleic acid) เข้าสู่นิวเคลียส 5) การสังเคราะห์อาร์เอ็นเอจากยีนของไวรัส (viral genome) เพื่อสั่งให้มีการสร้าง viral protein mRNA จะออกจากนิวเคลียสผ่านทางนิวคลีโอพอร์ (nucleopore) และviral protein จะถูกสั่งสังเคราะห์ขึ้นในไซโตพลาสซึม 6) การขนส่ง viral protein เข้าสู่นิวเคลียสผ่านทาง nuclear targeting sequence โดยเกิดการม้วนพับของเมมเบรนของนิวเคลียสเข้าด้านในเพื่อส่งผ่าน viral protein เข้าไป 7) แคปสิด (capsid) จะถูกสร้างขึ้นพร้อมกับเอนเวลลอป 8) มีการสร้างเส้นใยฟิลาเมนต์ตรงกลาง (central filament) และยีนของไวรัส (viral genome) จะถูกใส่ลงในแคปสิด 9) มีการขยายส่วนของเอนเวลลอป จนช่องถูกปิดไว้ 10)อนุภาคของไวรัสบางตัวจะอยู่ในส่วนที่กำลังมีการพัฒนาการสร้างออกคลูชั่นบอดี (Vicker *et al*., 2000)

5.6 **พยาธิสภาพที่เกิด**

5.6.1 ผลต่อสรีรวิทยา/เซลล์

จากรายงานการวิจัยของ Chen และคณะ (1989) พบว่าการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) และกุ้งหางแดง (*P. penicillatus*) ทำให้เกิดพยาธิสภาพของเซลล์และมีการสร้างไวรัสในเซลล์ของตับอ่อน โดยเซลล์ง่ายต่อการติดเชื้อ คือ เซลล์เอฟ เซลล์บี และเซลล์อาร์ โครงสร้างไวรัสชนิดนี้ประกอบด้วยกรดนิวคลีอิค แคปสิด และเอนเวลลอป นอกจากนี้ยังมีการสร้างออกคลูชั่นบอดีด้วย การสังเกตุการติดเชื้อจะพบได้ที่เมมเบรนของเซลล์ตับอ่อน และการเกิดนิวเคลียสบวมเนื่องมาจากการเพิ่มจำนวนของไวรัสและการสร้างโปรตีนโพลีฮีดริน อนุภาคไวรัสและออกคลูชั่นบอดี จะถูกปล่อยออกจากเซลล์ที่เสื่อมสลายแล้วเข้าสู่ท่อตับไปยังทางเดินอาหาร และจากการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวี พบว่าภายในเซลล์ อิพิทีเรียลของตับและตับอ่อนที่ติดเชื้อ พบออกคลูชั่นบอดีอยู่ภายในเมื่อนำไปย้อมสีพบว่าติดสี อีโอซินซึ่งจะติดสีจางไปจนเข้มจัด เซลอิพิทีเรียลล์จะเกิดการแตกสลายโดยเริ่มจากมีการบวมของนิวเคลียสขึ้นในอัตราส่วน 3:1 เมื่อเทียบกับไซโตพลาสซึม พบแวคิวโอลมากมายภายในเซลล์ และมีขนาด 15 $\pm$ 1 ไมโครเมตร ภายในเซลล์ที่มีการติดเชื้ออย่างรุนแรง จะเกิดเนื้อตายและการสลายของเซลล์อิพิทีเรียลและหลุดลอกของเซลล์ที่ติดเชื้อไปสู่ท่อตับ การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นอันเนื่องมาจากเชื้อไวรัสเอ็มบีวีจะเกิดขึ้นเฉพาะที่ตับและตับอ่อนและทางเดินอาหารตอนหน้า (anterior midgut) ไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่เนื้อเยื่อบริเวณอื่น และเมื่อศึกษาทางจุลทรรศน์อิเลคตรอนโดย Ramasamy และคณะ (2000) ได้ทำการศึกษาเซลล์ปกติของเซลล์ทางเดินอาหารตอนหน้าและเซลล์อิพิทีเรียลของตับอ่อนด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบทรานสมิชชั่น พบไมโตคอนเดรีย เอนโดพลาสมิกเรติคูรั่ม และเวสซิเคิลจำนวนมาก และเมื่อศึกษาในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวี พบไซโตพลาสซึมเล็กลง พบแวคคิวโอล กอลจิ เอนโดพลาสมิกเรติคูรั่ม ไรโบโซมจำนวนมาก และไมโตคอนเดรียลดลง บริเวณผิวหน้าเซลล์สูญเสียไมโครวิลไลไป นิวเคลียสบวม ภายในมีออกคลูชั่นบอดี ไซโตพลาสซึมติดสีจาง เส้นใยโครมาตินพบเป็นชิ้นเล็ก นิวคลีโอลัสจะอยู่บริเวณขอบ เมมเบรนของนิวเคลียสขยายขอบเขตกว้างขึ้น และจาการศึกษาทางจุลทรรศน์อิเลคตรอนนี้เองทำให้สามารถแยกออกคลูชั่นบอดีได้เป็น 2 แบบ คือ แบบแรกพบก้อนโปรตีน โพลีฮีดรินเรียงเป็นแนวอยู่ภายใน มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 14.5 นาโนเมตร อนุภาคไวรัสเป็นรูปแท่งทั้งชนิดที่สร้างโปรตีนและไม่สร้างโปรตีน มีเอนเวลลอป 2 ชั้น กว้าง 78 $\pm$ 3 นาโนเมตร ยาว 276 $\pm$ 2 นาโนเมตร ภายในอนุภาคไวรัส นิวคลีโอโปรตีนมองเห็นเป็นสีเข้ม ในระยะลาวาจะพบแต่โปรตีนที่ไวรัสสร้างขึ้นอยู่ในโครงผลึก จะยังมองไม่เห็นอนุภาคไวรัสภายใน ส่วนออกคลูชั่นบอดีแบบที่สอง จะไม่เป็นโครงผลึก ภายในมีลักษณะคล้ายแกรนูล แต่ละอันมีขนาด 12 นาโนเมตร และประกอบไปด้วยอนุภาคไวรัสที่ไม่สร้างโปรตีน อนุภาคไวรัสมีเอนเวลลอป 1 ชั้น ยาว 326 $\pm$ 4 นาโน

เมตร กว้าง 72 $\pm$ 1 นาโนเมตร ภายในมีนิวคลีโอแคปสิดยาว 295 $\pm$ 1 นาโนเมตร กว้าง 67 $\pm$ 1 นาโนเมตร Ramasamy และคณะ (2000) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ด้วยเทคนิคทางจุลทรรศน์อิเลคตรอน พบว่าจากการสังเกตการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์หลังการติดเชื้อที่เกิดทำให้สามารถแบ่งระยะการติดเชื้อได้เป็น 3 ระยะ ระยะแรก ไม่มีการเกิดพยาธิสภาพของเซลล์ อาจเกิดนิวเคลียสบวมเพียงเล็กน้อยประมาณ 44 เปอร์เซ็นต์และนิวคลีโอลัสจะเคลื่อนไปอยู่บริเวณขอบโครมาตินเป็นชิ้นเล็กๆ ส่วนนิวคลีโอพลาสยังปกติ การเกิดการรวมกันของโพลีฮีดรินและอนุภาคไวรัสจนเกิดเป็นออกคลูชั่นบอดีขนาดเล็กพบบางส่วน ไม่พบการติดเชื้อแบคทีเรีย ระยะที่สอง พบว่าโครมาตินลดจำนวนลง เกิดออกคลูชั่นบอดีขนาดเล็กบริเวณกลางนิวเคลียสภายในพบที่มีและไม่มีอนุภาคไวรัส นิวคลีโอลัสแตกเป็นชิ้นเล็กๆ เกิดการบวมของนิวเคลียสเพิ่มขึ้นเป็น 116 เปอร์เซ็นต์ ส่วนของไซโตพลาสซึมพบแวคคิวโอลมากมายปะปนไปกับออร์แกนเนลล์ของเซลล์ และยังไม่พบการติดเชื้อแบคทีเรีย ระยะสุดท้ายเกิดนิวเคลียสบวมพอง ภายในไซโตพลาสซึมพบแกรนูลและเกิดการสลายของเซลล์ ทำให้ออกคลูชั่นบอดีและอนุภาคไวรัสถูกปล่อยออกมาจากเซลล์ที่ติดเชื้อ นอกจากนี้แล้วการเกิดการเสื่อมสลายของเซลล์ยังทำให้เกิดการติดเชื้อซ้ำจากเชื้อแบคทีเรีย

นอกจากนี้ Vogt (1992) ยังพบว่า เมื่อกุ้งติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีพบว่า มีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์บุผิว (epithelium cell) บริเวณ anterior midgut โดยระยะแรกเซลล์จะมีนิวเคลียสขนาดใหญ่ (hypertrophy) และเส้นใยโครมาตินจะถูกดันไปติดขอบเซลล์ (chromatin margination) ระยะที่สองจะเกิดการสร้างออกคลูชั่นบอดีขึ้นภายในเซลล์ ซึ่งภายในจะมีอนุภาคไวรัสอยู่ หนาแน่น ดิกไทโอโซม (dictyosome) จะลดน้อยกว่าระยะแรก เนื่องมาจากการถูกรบกวนบริเวณดิกไทโอโซม ซิสเตอร์นี (dictyosome cisternae) การเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์อื่นๆมีเพียงเล็กน้อย โดยเกิดพยาธิสภาพของเซลล์ในระยะไลติก (lytic stage) แสดงให้เห็นว่าการทำหน้าที่หลักภายในเซลล์เกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ นอกจากนี้ยังเกิดการเปลี่ยนแปลงในส่วนของตับและตับอ่อน (hepatopancreas) การเปลี่ยนแปลงที่นิวเคลียสของเซลล์เอฟ และเซลล์บี คล้ายกับในเซลล์เยื่อบุผิวของทางเดินอาหารตอนกลาง โดยเกิดนิวเคลียสขนาดใหญ่ (hypertrophy)และเส้นใยโครมาตินจะถูกดันไปติดขอบเซลล์ (chromatin margination) และรวมเป็นก้อน มีการสร้างออกคลูชั่นบอดีเข้าล้อมอนุภาคไวรัส พบว่าเซลล์จะมีพยาธิสภาพของการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีตามลำดับดังนี้

- การสร้างไวโรจีนิก สโตรมา (Virogenic stroma) และกรดนิวคลีอิคของไวรัสในเซลล์ตับและตับอ่อนของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ

เริ่มต้นจะมีการสะสมกรานูลจะสังเกตุเห็นเป็นสีเข้มจำนวนมากอยู่ในนิวคลีโอพลาส แต่ในระยะนี้จะยังไม่พบการบวมของนิวเคลียส ต่อมาจึงพบว่า นิวเคลียสเริ่มบวมและโครมาตินไปรวมอยู่บริเวณขอบของนิวเคลียส และเกิดไวโรจีนิก สโตรมา ขึ้นในนิวเคลียสนั้น เมื่อนิวเคลียสเริ่มบวม

มากขึ้นจะพบว่าไมโครวิลไล (microvilli) ที่บริเวณขอบของเซลล์เริ่มสลายตัวลง จะพบว่า ไวโรจีนิก สโตรมา มีลักษณะเป็นรูปแท่ง ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 19.5 นาโนเมตร จากนั้นไวโรจีนิก สโตรมา จะพัฒนาไปเป็นกรดนิวคลีอิคของไวรัสต่อไป

- การสร้างแคปสิดและนิวคลีโอแคปสิด

ภายในนิวเคลียสที่ติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวี จะสังเกตุเห็น แคปสิด มีลักษณะเป็นท่อ กว้างประมาณ 36.7 นาโนเมตร ภายใน แคปสิด ติดสีเข้ม ส่วนที่มองเห็นเป็นสีเข้มเนื่องมาจากมีกรดนิวคลีอิค อยู่ภายใน แคปสิด นั้น แคปสิด ที่ไม่มีกรดนิวคลีอิกจะติดสีจางมองเห็นเป็นท่อยาว

- การสร้างเอนเวลลอปของไวรัสภายในเซลล์

เอนเวลลอป เกิดขึ้นจากไตรลามินา เมมเบรน (trilaminar membrane) ในบริเวณไวโรจีนิก สโตรมา จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน พบว่าไวรัสที่สร้างสมบูรณ์จะมีเอนเวลลอป 3 ชั้นล้อมรอบนิวคลีโอแคปสิดอยู่

- การสร้างออกคลูชั่นบอดีในเซลล์ที่ติดเชื้อ

เมื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรสน์อิเลคตรอน พบว่าในนิวเคลียสที่ติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีจะพบก้อนโพลิฮีดรินโปรตีนมากมายอยู่ล้อมรอบนิวคลีโอแคปสิดของไวรัสซึ่งมีเอนเวลลอป หุ้มอยู่ จะสังเกตเห็นแถวผลึกของอนุภาคโพลิฮีดรินเรียงกันอยู่ในไซโตพลาสซึมส่วนที่ติดกับนิวคลีโอพอร์

การสร้างอนุภาคโพลิฮีดรินโปรตีนจะเกิดขึ้นในไซโตพลาสซึมของเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวี แล้วอนุภาคเหล่านี้จะถูกส่งผ่านทางนิวคลีโอพอร์ ไปยังนิวเคลียสและสะสมไว้สร้างเป็นออกคลูชั่นบอดี การขยายตัวของออกคลูชั่นบอดีจะขึ้นอยู่กับการสะสมโพลิฮีดรินโปรตีนและอนุภาคไวรัสที่เพิ่มขึ้น การขยายตัวของออกคลูชั่นบอดีและอนุภาคไวรัสในออกคลูชั่นบอดีและอนุภาคไวรัสเดี่ยวๆ ที่เพิ่มขึ้นทำให้นิวเคลียสบวม การบวมของนิวเคลียสที่มากเกินไปจะทำให้เซลล์ตายและแตกสลาย

นอกจากการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีจะทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนไวรัสในเซลล์ที่ติดเชื้อ การสะสมโพลิฮีดรินโปรตีนในนิวเคลียสทำให้เกิดเป็นออกคลูชั่นบอดีและเกิดการแตกสลายของเซลล์กุ้งที่ติดเชื้อ ยังมีรายงานที่กล่าวถึงการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ที่ติดเชื้อ พบว่า มีโครงสร้างที่เรียกว่า เมมเบรน ลาบิรินท์ (membrane labyrinth) เกิดขึ้นในเซลล์ที่ติดเชื้อ *Baculovirus penaei* (BP) และจะเกิดขึ้น เพิ่มจำนวนและพัฒนาไปพร้อมกับการเพิ่มจำนวนของไวรัสในเซลล์ สำหรับหน้าที่ของ เมมเบรน ลาบิรินท์ ยังไม่ทราบชัดเจนแต่คาดว่าน่าจะทำหน้าที่ 1. ขนส่งสารสำหรับการสร้างไวรัส 2. ขนส่งเอทีพี (ATP) 3. กลไกที่ขนส่งอนุภาคไวรัสไปสู่ผิวเซลล์ Lu และคณะ (1996) ได้ศึกษาโครงสร้างทางจุลทรรศน์อิเลคตรอนและทางสัณฐานวิทยาของเมมเบรน ลาบิรินท์ ในเซลล์ของกุ้งกุลาดำในระหว่างการติดเชื้อและการพัฒนาเข้าสู่ระยะต่างๆของการติดเชื้อไวรัสเอ็มบี

วี จากการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า จะเกิด เมมเบรน ลาบิรินท์ ในเซลล์ตับและ ตับอ่อนที่ติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวี และคาดว่าเมมเบรน ลาบิรินท์ น่าจะมาจากนิวเคลียส เอนโด พลาสมิค เรติคูลัม (endoplasmic reticulum) หรือ กอลจิแอปพาราตัส (Golgi apparatus) แต่เห็นเด่นชัดคือ ในระยะแรกจะสังเกตเห็นว่า เมมเบรน ลาบิรินท์ มีความสัมพันธ์กับกอลจิ แอปพาราตัส โดยการสร้าง เมมเบรน ลาบิรินท์ เริ่มจากการขยายกว้างออกของ กอลจิเวสสิเคิล (golgi vesicle) กลายมาเป็นโครงสร้างที่ซ้อนกัน หรือซ้อนทับไปมา ลักษณะเป็นเมมเบรน 2 ชั้นที่ห่างกันประมาณ 10-25 นาโนเมตร ซึ่งบางครั้งอาจมองเป็นเมมเบรนชั้นเดียว และเมื่อตรวจสอบที่กำลังขยายสูงๆ พบว่าเมมเบรนแต่ละชั้นหนาประมาณ 5-8 นาโนเมตร

การพัฒนาไปพร้อมๆกันของ เมมเบรน ลาบิรินท์ และการติดเชื้อเอ็มบีวี จะสังเกตุเห็นว่ามีเฉพาะเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีเท่านั้นที่พบ เมมเบรน ลาบิรินท์ ภายในเซลล์ เมมเบรน ลาบิรินท์ เริ่มต้นสร้างพร้อมกับการที่ไวรัสที่อยู่ภายในเซลล์เริ่มเพิ่มจำนวนและเกิด ไวโรจีนิก สโตรมาพบการเพิ่มของ เมมเบรน ลาบิรินท์ ที่ระดับสูงสุดเมื่อพบอนุภาคไวรัสและออกคลูชั่นเพิ่มจำนวนมากในนิวเคลียสจนกระทั่งพบในไซโตพลาสซึมด้วย

การพัฒนาของ เมมเบรน ลาบิรินท์ ที่สัมพันธ์กับการเพิ่มจำนวนของไวรัส อาจแบ่งได้เป็นระยะต่าง ดังนี้

ระยะที่ 1 การติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีที่เริ่มจากการกินอนุภาคไวรัสเข้าไปแล้วมีการส่งผ่านดีเอ็นเอของไวรัสเข้าสู่นิวเคลียสของเซลล์ หลังจากนั้นจะเกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างเซลล์ดังนี้ 1) เส้นใยโครมาตินไปติดขอบเซลล์ เกิดก้อนของ ไวโรจีนิก สโตรมา ในนิวเคลียส 2) เกิดรอยพับตรงขอบด้านนอกของเมมเบรนของนิวเคลียส ในไซโตพลาสซึมจะเกิดการขยายของ เอนโดพลาสมิค เรติคูลัม และ กอลจิแอปพาราตัส พบไรโบโซมมากมายที่หลุดลอยอิสระจาก เอนโดพลาสมิค เรติคูลัม ทำให้พบไรโบโซมอยู่เป็นอิสระมากมายในเซลล์

ระยะที่ 2 การเพิ่มจำนวนของ เมมเบรน ลาบิรินท์ และการเพิ่มจำนวนของไวรัส ในระยะนี้จะสังเกตุเห็นว่าโครงสร้างของ เมมเบรน ลาบิรินท์ จะซับซ้อนขึ้น และพบนิวคลีโอแคปสิด ของไวรัสที่สมบูรณ์ แต่ในระยะนี้ยังไม่มีการสร้างออกคลูชั่นบอดี ส่วนในไซโตพลาสซึม ไมโตคอนเดรียจะเกิดความผิดปกติและบางอันเกิดลักษณะคล้ายมีก้อนอยู่ภายใน และมีจำนวนไมโครฟิลาเมนท์เพิ่มขึ้นมากมายและพบส่วนประกอบของเซลล์ที่ยังปกติอยู่ด้วย

ระยะที่ 3 การพัฒนาของ เมมเบรน ลาบิรินท์ และการสร้างออกคลูชั่นบอดี การพัฒนาของเมมเบรน ลาบิรินท์ ในขั้นสูงสุด จะเกิดการสร้างเป็นรูปท่อ ซ้อนกัน เกิดเป็นตุ่มและโครงสร้างที่ซ้อนทับกัน พร้อมกับมีการสร้างออกคลูชั่นบอดีเป็นรูปไข่และมีปริมาณโพลิฮีดรินโปรตีนเพิ่มจำนวน

มากในนิวเคลียส จะสังเกตุเห็นไมโครฟิลาเมนท์อยู่ติดกับออกคลูชั่นบอดีในนิวเคลียสซึ่งพบว่าไมโครฟิลาเมนท์ที่พบเป็นส่วนเดียวกันกับที่พบในไซโตพลาสซึม อย่างไรก็ตามความสัมพันธ์ระหว่างไมโครฟิลาเมนท์ในนิวเคลียสและในไซโตพลาสซึมยังไม่ทราบแน่ชัด นอกจากนี้ยังพบว่ามีการลดลงอย่างมากของโครมาตินในนิวเคลียส

ระยะที่ 4 การเสื่อมสลายของ เมมเบรน ลาบิรินท์ และการปล่อยอนุภาคไวรัส ในขั้นตอนสุดท้ายของการเพิ่มจำนวนไวรัสนี้ เมมเบรน ลาบิรินท์ จะไม่เกิดการพับ พบว่าเซลล์ที่ติดเชื้อจะเกิดการย่อยสลาย ออกคลูชั่นบอดี อนุภาคไวรัส และส่วนประกอบอื่นๆของเซลล์จะถูกปล่อยออกสู่ส่วนช่องว่างที่เคยเป็นขอบเขตของเซลล์ที่ติดเชื้อ

5.6.2 ผลกระทบต่อการเจริญเติบโต

การติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยาของกุ้งดังกล่าว นอกจากการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวียังมีผลต่อการเจริญเติบโตและอัตราการรอดของกุ้ง จากรายงานการวิจัยของ Chang และ Chen (1994) ได้ศึกษาถึงผลของการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีที่มีต่อการเจริญเติบโตและอัตราการอดของกุ้งกุลาดำในระยะวัยอ่อน โดยนำตัวอ่อนกุ้งระยะนอเพลียสที่ปลอดเชื้อเอ็มบีวีมาแช่ฟอร์มาลินความเข้มข้น 200 ส่วนในล้านส่วน เป็นเวลา 30 วินาทีและ ไอโอโดฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 ส่วนในล้านส่วน เป็นเวลา 1นาที เพื่อทำให้ปลอดเชื้อ นำลูกกุ้งประมาณ 5 x 10^4 ตัวเลี้ยงในถังขนาด 500 ลิตร จำนวน 7 ถัง ด้วยน้ำที่มีความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน ที่ผ่านการกรองแล้วและให้อาหารตามปกติ เพื่อให้แน่ใจว่ากุ้งได้รับอาหารอย่างเหมาะสมในแต่ละระยะและไม่เกิดภาวะขาดสารอาหาร ใช้ 4 ถังเป็นชุดควบคุมและ 3 ถังเป็นชุดการทดลองทำให้ติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีโดยเติมออกคลูชั่นบอดี้ 3.2 x 10^5 ต่อวันตั้งแต่ระยะซูเอีย 1-3 จากนั้นบันทึกอัตราการเจริญเติบโตโดยการวัดความยาว อัตราการตาย พบว่ากุ้งในกลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีมีการเจริญเติบโตลดลงและอัตราการตายเพิ่มขึ้นระหว่างการเลี้ยง โดยกุ้งในกลุ่มควบคุมมีอัตราการตาย 10 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกุ้งในกลุ่มที่ติดเชื้อมีอัตราการตายอยู่ระหว่าง 10 - 50 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่ากุ้งในกลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีมีขนาดตัวที่แตกต่างกันมากและมีสีตัวจางกว่ากลุ่มควบคุม โดยกลุ่มควบคุมมีความยาวแตกต่างกันอยู่ระหว่าง 0.27 - 1.69 มิลลิเมตร ส่วนในกลุ่มที่ติดเชื้ออยู่ระหว่าง 0.25 - 3.15 มิลลิเมตร

5.7 การตรวจสอบโรคติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวี

การตรวจวินิจฉัยโรคกุ้งในปัจจุบันและในการวิจัยต่างๆจะใช้วิธีการที่ทำสืบต่อกันมา และการตรวจหาเชื้อที่ก่อโรคยังเป็นวิธีที่พัฒนามาจากวิธีที่ใช้ในตรวจวินิจฉัยในปลา วิธีที่ใช้ตรวจรักษา

สัตว์ และวิธีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการตรวจวินิจฉัยโรคในมนุษย์ การรักษาและการตรวจวินิจฉัยโรคในกุ้งจะพิจารณาจากประวัติการเลี้ยง ลักษณะภายนอก พฤติกรรม และพยาธิสภาพที่เกิดขึ้น การตรวจสอบจะใช้วิธีต่างๆ ได้แก่ การตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์และจุลทรรศน์อิเลคตรอน การตรวจทางจุลชีววิทยา การเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อดูความผิดปกติที่เกิดกับเซลล์ การตรวจสอบทางโลหิตวิทยา ซึ่งวิธีต่างเหล่านี้ล้วนเป็นวิธีที่เป็นหลักสำคัญที่ใช้ในการวิจัยทางการแพทย์ การตรวจวินิจฉัยและการรักษาโรคแต่ก็มีบางวิธีที่เมื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคในกุ้งได้ไม่สำเร็จหรือไม่ดีเท่าที่ควร ได้แก่ การเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อกุ้ง และบางวิธีก็ไม่สามารถนำมาเป็นวิธีตรวจวินิจฉัยโดยทั่วไปได้ (routine diagnostic) เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้วิธีตรวจวินิจฉัยทางภูมิคุ้มกันวิทยา (การใช้โพลิโคลนอล หรือ โมโนโคลนอลแอนติบอดี) โดยเฉพาะวิธีทางอณูชีววิทยา (การใช้ยีนโพรบ และ เทคนิค PCR) พบว่าเป็นวิธีที่ให้ความถูกต้องและเป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวินิจฉัยโรคและหาสาเหตุของโรคที่เกิดขึ้นในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งได้ดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งสามารถใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสในกุ้งได้อย่างแม่นยำ

วิธีการตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสเอ็มบีวีในกุ้ง

5.7.1 **การตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์**

-สควอส เม้าท์ (squash mount)

การตรวจวินิจฉัยติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีที่ใช้กันทั่วไปคือ วิธีสควอส เม้าท์ ซึ่งเป็นวิธีที่ทำได้ง่ายและรวดเร็ว จากรายงานวิจัยของ Fegan และคณะ (1991) พบว่าออกคลูชั่นบอดี้ของไวรัสเอ็มบีวีสามารถมองเห็นได้ง่ายในการทำวิธีสควอส เม้าท์ โดยนำลูกกุ้งมาบดบนสไลด์แล้วย้อมสีด้วยมาลาไคท์กรีน แล้วตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าออกคลูชั่นบอดีติดสีเขียวลักษณะแวววาวโดยออกคลูชั่นบอดีจะอยู่เป็นกลุ่มๆสามารถแยกความแตกต่างจากหยดไขมันได้ชัดเจน

-อิมเพรสชั่นเสมียร์ (impression smear)

จากรายงานการศึกษาของ Vicker และคณะ (1993) ได้ทำการศึกษาการตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสเอ็มบีวีในกุ้งออสเตรเลียด้วยวิธีอิมเพรสชั่นเสมียร์ โดยนำตับอ่อนของกุ้งระยะโพสต์ลาวา (โพสต์ลาวา 25 หรือ ต่ำกว่า) มาบดแล้วเกลี่ยบนสไลด์ แล้วย้อมด้วยสีฮีมาท็อกซีลินและอีโอซิน (Haematoxylin & Eosin) ซึ่งวิธีนี้ได้ใช้ตรวจวินิจฉัยไวรัสเอ็มบีวีในโรงเพาะฟักทางตอนใต้ของรัฐควีนสแลนด์และทางตอนเหนือของรัฐเวลล์ประเทศออสเตรเลีย การศึกษาได้ทำการตัดส่วนของตับอ่อนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยแยกส่วนหัวและอกออกจากส่วนท้อง แล้วดึงตับอ่อนมาบดและเกลี่ยบนสไลด์ หยดน้ำทะเลเพื่อป้องกันเนื้อเยื่อแห้ง จากนั้นถูกทำให้แห้งโดยตะเกียง 10 นาที แล้ว

แช่ในเมทานอล 5 นาที จากนั้นล้างน้ำ 2 นาที เข้าสู่กระบวนการดึงน้ำออกจากเซลล์โดยใช้ 95% แอลกอฮอล์ 45 วินาที, 100 % แอลกอฮอล์ 1 นาที, ไซลีน 2 นาที จากนั้นปิดสไลด์ด้วย Permount และ กระจกปิดสลด์ ส่วนอีกการย้อมวิธีหนึ่งจะใช้สีอะคริดีน ออเร้นท์ (acridine orange) โดยเนื้อเยื่อจะถูกแช่ในสารละลายที่เอทธิลแอลกอฮอล์ผสมกับกรดอะซิติกความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที ล้างน้ำ 2 นาที แล้วย้อมด้วยสีอะคริดีน ออเร้นท์ ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นปิดสไลด์ด้วยนำยาเครป ริงเกอร์ (Krebs-Ringer solution) และนำไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งให้แสงฟลูออเรสเซนต์ที่ความยาวคลื่น 450-490 ไมโครเมตร

การทดลองให้กุ้งระยะโพสต์ลาวา 3-15 ติดเชื้อ โดยใช้หัวเชื้อจากลูกกุ้งหรือตับกุ้งที่ติดเชื้อตามธรรมชาติจากรัฐควีนสแลนด์ นำกุ้งที่ไปติดเชื้อไปทำ อิมเพรสชั่นเสมียร์ ตรวจสอบดูเซลล์ อิพิทีเรียล เมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อกลุ่มที่ติดเชื้อ พบว่า เซลล์ที่ติดเชื้อมีนิวเคลียสขนาดใหญ่ขึ้น หลังจากติดเชื้อ 2-3 วัน ตรวจพบออกคลูชั่นบอดีเดี่ยวๆและเป็นกลุ่มในเซลล์อิพิทีเรียล ของกุ้งโพสต์ลาวา 6-25 ที่ติดเชื้อ2-10วัน นอกจากนี้ยังพบออกคลูชั่นบอดีภายนอกเซลล์ทั้งที่อยู่เดี่ยวๆ และเป็นกลุ่มซึ่งน่าจะเกิดจากขั้นตอนการทำ อิมเพรสชั่นเสมียร์ ทำให้เซลล์แตกและออกคลูชั่นบอดีหลุดออกมานอกเซลล์

ออกคลูชั่นบอดีที่ทำอิมเพรสชั่นเสมียร์และทำให้แห้งแล้วเมื่อนำมาดูภายใต้กล้อง (Nomarsky optics) จะเห็นเป็นรูปร่างยาวเนื่องมาจากออกคลูชั่นบอดีเกิดการแตก และมีรูปร่างกลม ส่วนหยดไขมันจะมีลักษณะกลมและแวววาว การตรวจดูออกคลูชั่นยังสามารถทำได้ในกรณีที่ตับอ่อนมีการติดเชื้อมากๆสามารถนำตับอ่อนมาบี้บนสไลด์แล้วตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเฟส คอนทราสท์ (phase contrast) ส่วนวิธีที่ใช้การย้อมด้วย สีอะคริดีน ออเร้นท์ แล้วดูด้วยกล้องฟลูออเรสเซนต์ พบว่า นิวเคลียสที่ติดเชื้อจะมีสีเขียวเรืองแสงและจะเห็นเป็นสีเหลืองในเซลล์ที่ติดเชื้อ และมีการย่อยสลายของเซลล์ตับและตับอ่อนและจำนวนออกคลูชั่นบอดีลดลง สีที่เห็นแตกต่างกันเนื่องมาจากนิวคลีโอพลาสซึม (nucleoplasm) ที่ปิดทับออกคลูชั่นบอดี และขึ้นกับจำนวนดีเอ็นเอของไวรัส และอนุภาคไวรัสที่อยู่ภายในนิวเคลียส ส่วนไซโตพลาสซึมจะเห็นเป็นสีแดงและหยดไขมันจะเห็นสีดำ

จากรายงานข้างต้นพบว่า การตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีด้วยวิธีทางเนื้อเยื่อวิทยาและการทำอิมเพรสชั่นเสมียร์ได้ผลที่มีความไวเท่ากัน จากการทดลองที่ทำให้กุ้งติดเชื้อจะสามารถตรวจพบได้เร็วที่สุดใน 2 - 3 วันโดยวิธีทั้งสอง และจากการทดลอง 12 ครั้ง พบว่า มีอย่างน้อย 10 ครั้งที่ตรวจพบได้ว่ากุ้งติดเชื้อภายในวันที่4 หลังจากการทำให้ติดเชื้อ จะเห็นได้ว่า การตรวจวินิจฉัยด้วยวิธีอิมเพรสชั่นเสมียร์แล้วย้อมด้วยสีฮีมาท็อกซีลินและอีโอซิน สามารถทำได้รวดเร็ว

(ไม่เกิน 20 นาที) และง่ายในการตรวจสอบ อีกทั้งสามารถเห็นได้ชัดเจนกว่าวิธีที่ย้อมสีมาลาไคท์กรีน แต่วิธีดังกล่าวจะขึ้นอยู่กับการมองเห็นออกคลูชั่นบอดี จึงไม่สามารถตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในระยะแรกๆที่เกิดการบวมของนิวเคลียสและในระหว่างการสร้างออกคลูชั่นบอดีได้

5.7.2 การตรวจสอบทางเนื้อเยื่อวิทยา

ประเทศไทยมีการศึกษาและการพัฒนาวิธีตรวจวินิจฉัยทางเนื้อเยื่อวิทยาของโรคไวรัสเอ็มบีวีในกุ้งกุลาดำวัยอ่อนและตัวเต็มวัยรวมไปถึงพ่อแม่พันธุ์มาตั้งแต่ปี 1989 โดยเฉพาะทางภาคใต้ของประเทศไทย (Fegan *et al*., 1991) ได้มีการเก็บตัวอย่างพ่อแม่พันธุ์ที่จับจากทะเลอันดามันมาศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาเพื่อตรวจสอบโรคไวรัสเอ็มบีวี โดยเก็บตัวอย่างพ่อแม่พันธุ์ในเดือนสิงหาคม 1989 พฤศจิกายน 1989 และ กุมภาพันธ์ 1990 พบว่ากุ้ง 2 จาก 35 ตัวจะมี ออกคลูชั่นบอดีในเนื้อเยื่อตับคิดเป็น 51 เปอร์เซ็นต์และ 17 เปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่ติดเชื้อ ส่วนการตรวจในระยะวัยอ่อน โดยนำกุ้งกุลาดำระยะนอเพลียสจากโรงเพาะฟักต่างๆทางใต้ของอ่าวไทยซึ่งทั้งหมดใช้พ่อแม่พันธุ์จากทะเลอันดามันแล้วนำมาฟักในโรงเพาะ ให้อาหารสำเร็จรูปและ skeletonema จนกระทั่งถึงระยะโพสต์ลาวาจะให้อาร์ทีเมียแทน ตัวอย่างลูกกุ้งจะถูกเก็บทุกวันเพื่อตรวจหาออกคลูชั่นบอดีด้วยวิธีสควอสเม้าท์และการตรวจสอบทางเนื้อเยื่อวิทยา ในการทดลองจะดองลูกกุ้งด้วย น้ำยาดองเดวิดสัน (Davidson ‘s fixative) 1 คืน จากนั้นเปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์ 50 เปอร์เซ็นต์แล้วนำไปผ่านขบวนการนำน้ำออกจากเซลล์และฝังตัวอย่างลงในพาราฟิน จากการศึกษาพบว่ามีออกคลูชั่นบอดีในทางเดินอาหาร และพบออกคลูชั่นบอดีบริเวณส่วนปลายของท่อตับและไม่พบออกคลูชั่นบอดีในส่วนที่ไกลจากบริเวณท่อตับหรือเซลล์อี (generative cells : E cell) เช่นเดียวกับรายงานวิจัยของ Chen และคณะ (1989) ที่เคยรายงานไว้ว่าในเซลล์ตับและตับอ่อนของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) และกุ้งหางแดง (*Penaeus penicillatus*) เซลล์เอฟ เซลล์บี และเซลล์อาร์ เป็นเซลล์ที่ง่ายต่อการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวี

5.7.3 การตรวจสอบทางจุลทรรศน์อิเลคตรอน

การศึกษาทางไวรัสวิทยาและเซลล์วิทยาของไวรัสเอ็มบีวีในกุ้งกุลาดำ *P. monodon* และกุ้งหางแดง *P. penicillatus* ในปี 1989 Chen และคณะ ได้นำเนื้อเยื่อตับกุ้งกุลาดำ และกุ้งหางแดง ที่ติดเชื้อมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่าตัวอย่างกุ้งจะมีการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีและ อาจพบเชื้อไวรัสเอชพีวีด้วย อย่างไรก็ตาม พบว่าเซลล์อีจะไม่มีการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวี เมื่อย้อมสีเนื้อเยื่อดังกล่าวด้วยสีฮีมาทอกซิลินและอีโอซิน จะเห็นว่าออกคลูชั่นบอดีติดสีแดง ในขณะที่เซลล์อื่นที่ติดเชื้อไวรัสเอชพีวี ลักษณะภายในอินคลูชั่นบอดีติดสีน้ำเงินเข้ม เมื่อตรวจดูด้วยกล้อง

จุลทรรศน์อิเลคตรอน เซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีจะเกิดนิวเคลียสบวม นิวคลีโอลัสกระจัดกระจาย โครมาตินไปรวมติดอยู่ที่ขอบเซลล์ และเกิดไวโรจีนิก สโตรมา จากนั้น ส่วนของฟิลาเมนท์ แคปสิด ของไวรัสและเวสสิเคิล เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญภายในนิวเคลียสที่ติดเชื้อ ต่อมาจะเกิดการสร้างออกคลูชั่นบอดีและไวรัสที่มีเอนเวลลอป อยู่ภายในเซลล์ตับและตับอ่อนที่ติดเชื้อ จากการศึกษาพบว่าเซลล์ตับและตับอ่อนที่ติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีของกุ้งกุลาดำ และกุ้งหางแดงจะมีลักษณะไม่แตกต่างกัน

เมื่อศึกษาเซลล์ที่ติดเชื้อแล้วนำมาเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ติดเชื้อพบว่า เอนโดพลาสมิค เรติคูลัม ในไซโตพลาสซึมของเซลล์เอฟ ซึ่งปกติมีลักษณะยาวจะเปลี่ยนแปลงเป็นรูปร่างกลม จำนวนไมโตคอนเดรียและกอลจิ แอปพาราตัสลดลงอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ส่วนของคริสตี (cristae) บวมและเพิ่มจำนวนขึ้นในไมโตคอนเดรียของเซลล์เอฟที่ติดเชื้อด้วย

ส่วนไซโตพลาสซึมของเซลล์บี ที่ติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวี เอนโดพลาสมิด เรติคูลัม ซึ่งปกติมีลักษณะยาวจะเปลี่ยนแปลงเป็นรูปร่างกลม และ จะสังเกตุเห็นเมมเบรนที่ขดเป็นวง (membrane labyrinths) ซึ่งเชื่อว่าเกิดมาจากกอลจิแอปพาราตัส เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์บี ที่ปกติ พบว่าจำนวนไมโตคอนคอนเดรียในเซลล์บีที่ติดเชื้อลดลงอย่างมีนัยสำคัญ และส่วนของคริสตี (cristae) ในไมโตคอนเดรีย ผิดปกติและบวม ในไซโตพลาสซึมจะมีไมโครฟิลาเมนท์จำนวนมาก

เอนโดพลาสมิด เรติคูลัม ของเซลล์อาร์ เปลี่ยนแปลงเป็นรูปร่างกลมเช่นเดียวกับเซลล์บีและเซลล์เอฟ ไมโตคอนเดรียบวมและเกิดการสลายตัว และพบไมโคฟิลาเมนท์เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกับในเซลล์อื่นๆที่ติดเชื้อ ในเซลล์ที่มีการติดเชื้อในระยะแรกๆจะพบว่ามีหยดไขมัน 2 - 3หยดและก้อนไกลโคเจน แต่เมื่อมีการพัฒนาระยะการติดเชื้อไปแล้วจะไม่มีหยดไขมันภายในเซลล์อาร์ที่ติดเชื้อ

จากรายงานของ Vicker และคณะ (2000) ได้ศึกษาทางเซลล์วิทยา โลหิตวิทยา และการเพิ่มจำนวนของไวรัสเอ็มบีวีในกุ้งกุลาดำจากออสเตรเลีย การศึกษาได้ใช้เทคนิคทางจุลทรรศน์อิเลคตรอน โดยตัดตับอ่อนของกุ้งที่ติดเชื้อมาดองในน้ำยาดองที่มีส่วนผสมของกลูตารอัลดีไฮน์ 2.5 เปอร์เซ็นต์ พาราฟอร์มอลดีไฮน์ 2.5 เปอร์เซ็นต์ ในบัฟเฟอร์คาโคไดเลท (cacodylate buffer) หลังจากย้อมแล้วนำมาย้อมด้วยออสเมียมเตตระออกไซด์ ความเข้มข้น 1% (osmium tetraoxide) จากนั้นนำไปผ่านกระบวนการเอาน้ำออกโดยใช้แอลกอฮอล์ระดับต่างๆจากนั้นนำตัวอย่างไปฝังลงในแอลอาร์ ไวท์ เรซิน (LR White resin) นำชิ้นเนื้อที่ตัดแล้วไปย้อมสีด้วยยูรานิลอะซีเตด 5 เปอร์เซ็นต์ ในเมทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ และเรย์โนลลีดซิเตรท (Reynold's lead citrate) แล้วนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบทรานสมิชชั่น (Hitachi H-800) เมื่อตรวจสอบเซลล์ตับและตับอ่อนที่ติดเชื้อพบว่ามีนิวเคลียสขนาดใหญ่ขึ้น และภายในมีออกคลูชั่นบอดี 1-3 อัน รวม

ไปถึงมีอนุภาคไวรัสกระจายอยู่บริเวณกลางนิวเคลียสห่างจากขอบเยื่อหุ้มนิวเคลียส ส่วนการศึกษาโครงสร้างของไวรัสตัวเต็มวัย พบว่า มีลักษณะเป็นรูปแท่งมีเยื่อหุ้มแคปสิด เอนเวลลอปของไวรัสบางอนุภาคมียอดเป็นรูปกรวย ซึ่งจะขึ้นอยู่กับรูปร่างของนิวคลีโอแคปสิด ไวรัสหลายอนุภาคมีการขยายออกด้านข้าง หรือด้านปลาย ได้ง่ายเนื่องจากประกอบด้วย ฟิลาเมนท์ เมื่อนำแคปสิดมาตัดตามขวางพบฟิลาเมนท์ซึ่งเคยมีรายงานในแบคคูโลไวรัสในครัสเตเซีย แต่สามารถแยกความแตกต่างของฟิลาเมนท์ออกจากโปรตีนในโครงสร้างไวรัสที่มีรูปร่างไม่แน่นอนได้ยาก

5.7.4 **การตรวจสอบทางอณูชีววิทยา** (molecular biology)

- **ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรส** (Polymerase Chain Reaction : PCR)

เทคนิคพีซีอาร์ (PCR) เป็นเทคนิคใหม่ทางด้านอณูชีววิทยาเช่นเดียวกับการค้นพบเทคนิคต่างๆ เช่น เซ้าท์เทิร์น บลอทติ้ง (Southern blotting) การโคลนนิ่งโมเลกุล (molecular cloning) ซึ่งทำให้เกิดการพัฒนาวิธีการที่จะศึกษาถึงขบวนการต่างๆของสิ่งมีชีวิตในระดับโมเลกุลให้ทำได้ง่ายขึ้น เทคนิคพีซีอาร์เป็นวิธีการเพิ่มดีเอ็นเอเฉพาะส่วนอย่างจำเพาะในหลอดทดลอง เป็นเทคนิคใหม่ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในการวิเคราะห์ หรือศึกษายีนต่างๆ เนื่องจากยีนแต่ละชนิดจะมีเป็นส่วนน้อยในจีโนม (genome) ดังนั้นถ้าศึกษายีนใดๆ จะต้องมีวิธีเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอชิ้นนั้นให้มากขึ้นและนำมาทำการทดลองต่างๆได้ วิธีปกติที่ใช้เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอส่วนที่ต้องการ คือ การโคลนนิ่งโมเลกุล โดยการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอส่วนที่ต้องการในแบคทีเรีย ซึ่งเป็นวิธีที่ทำได้ยากมีหลายขั้นตอนใช้เวลานานและยังต้องมีวิธีการที่จะพิสูจน์ว่าดีเอ็นเอส่วนที่เพิ่มจำนวนขึ้นมา ได้เป็นดีเอ็นเอส่วนที่ต้องการหรือไม่ แต่เทคนิคพีซีอาร์สามารถทำให้เราศึกษายีนต่างๆได้ง่ายขึ้นโดยการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอส่วนที่ต้องการได้อย่างไม่จำกัดจำนวนโดยไม่ต้องใช้วิธีโคลนนิ่ง (cloning) เทคนิคพีซีอาร์ คิดขึ้นโดย Kary B. Mullis นักเคมีวิเคราะห์ชาวอเมริกัน ในปี ค.ศ. 1985 (อ้างโดย นเรศวร สุขเจริญ และคณะ, 2541) โดยทางทฤษฎีของพีซีอาร์ จะคล้ายกับการจลองดีเอ็นเอ (DNA replication) ภายในเซลล์ คือ เป็นวิธีที่ดีเอ็นเอโพลิเมอเรส สร้างดีเอ็นเอจากดีเอ็นเอต้นแบบ โดยการต่อสายโอลิโกนิวคลีโอไทด์ ไพรเมอร์ (oligonucleotide primers) แต่ขบวนการพีซีอาร์ อาศัยโอลิโกนิวคลีโอไทด์ ไพรเมอร์ 2 เส้น ซึ่งแต่ละเส้นจะจับกับสายดีเอ็นเอเส้นตรงข้ามกัน จากนั้นจะเกิดการสร้างดีเอ็นเอขึ้นโดยการต่อปลายจากไพรเมอร์ทั้งสองเส้น ตามดีเอ็นเอต้นแบบจนกระทั่งสุดปลายดีเอ็นเอต้นแบบ โดยการสร้างดีเอ็นเอ จะทำได้ในทิศทางเดียวคือ จาก 5' ไป 3' ผลที่ได้คือสายดีเอ็นเอคู่ใหม่ที่เกิดจาก สายดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมกัน (complementary) กับดีเอ็นเอต้นแบบ

จากรายงานการวิจัยของ Belcher และ Young (1998) ได้พัฒนาเทคนิคเนสเตดพีซีอาร์ (Nested PCR) เพื่อตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีที่มีปริมาณต่ำในลูกกุ้งกุลาดำ การทดสอบ

ความไว (sensitivity) ทำโดยใช้สารละลายดีเอ็นเอมาทำให้เจือจาง 10 เท่า ตั้งแต่ 100 พิโคกรัม ถึง 0.001 เฟนโตกรัม โดยใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ คือ MBV1.4F, MBV1.4R สำหรับไพรมารี พีซีอาร์ (primary PCR) และ MBV1.4NF, MBV1.4NR สำหรับเนสเตดพีซีอาร์ (ตารางที่ 3) แล้วนำสารละลายดังกล่าวมาผ่านขั้นตอนไพรมารี พีซีอาร์

ตารางที่ 3 ดีเอ็นเอต้นแบบจำลองที่ใช้ในเทคนิคพีซีอาร์

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์
MBV1.4F	5'-CGA TTC CAT ATC GGC CGA ATA-3'
MBV1.4R	5'-TTG GCA TGC ACT CCC TGA GAT-3'
MBV1.4NF	5'-TCC AAT CGC GTC TGC GAT ACT-3'
MBV1.4NR	5'-CGC TAA TGG GGC ACA AGT CTC-3'

ที่มา : Belcher and Young (1998)

การทำไพรมารีพีซีอาร์ ทำได้โดยนำดีเอ็นเอรวมของกุ้งที่ติดเชื้อ มาทำให้เสียสภาพในน้ำเดือดเป็นเวลา 3 นาทีแล้วนำไปแช่บนน้ำแข็ง ดีเอ็นเอจำนวน 100 นาโนกรัม จะถูกใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทำ ไพรมารีพีซีอาร์ ซึ่งมีส่วนผสมดังนี้คือ 50mM KCl, 10mM Tris-HCl (pH9.0), 0.1% Triton x-100, 0.2mM dNTP, 1.5mM $MgCl_2$, 0.25 uM Primer MBV1.4F และ MBV 1.4R, 2.5 unit Taq ส่วนผสมทั้งหมดนี้จะถูกทำให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 50 ไมโครลิตร นำไปทำการเพิ่มปริมาณท่อนดีเอ็นเอโดยเครื่องควบคุมอุณหภูมิโดยเริ่มจากที่ 96 ^{o}C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำ 40 รอบ ที่อุณหภูมิต่างๆดังนี้ 94^{o}C 30 วินาที, 65^{o}C 30 วินาที และ 72^{o}C 60 วินาทีหลังจากเสร็จสิ้นในรอบสุดท้ายแล้วให้ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 72^{o}C เป็นเวลา 7 นาที หลังจากการเสร็จสิ้นขั้นตอนดังกล่าวในส่วนของไพรมารีพีซีอาร์ จะได้ท่อนดีเอ็นเอที่มีขนาด 533 คู่เบส

การทำเนสเตดพีซีอาร์ โดยขั้นตอนนี้จะใช้ดีเอ็นเอที่มีขนาด 533 คู่เบส ที่ได้จากขั้นตอนการทำ ไพรมารีพีซีอาร์ มาเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ มีส่วนผสมดังนี้คือ 50mM KCl, 10mM Tris-HCl (pH9.0), 0.1% Triton x-100, 0.2mM dNTP, 1.5mM $MgCl_2$, 0.25uM Primer MBV1.4Fและ MBV 1.4R, 2.5 unit Taq ส่วนผสมทั้งหมดนี้จะถูกทำให้ ปริมาตรสุดท้ายเป็น 50 ไมโครลิตรและนำไปทำการเพิ่มปริมาณท่อนดีเอ็นเอโดยเครื่องควบคุมอุณหภูมิโดยเริ่มจากที่ 96 ^{o}C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำ 40 รอบ ที่อุณหภูมิต่างๆดังนี้ 94^{o}C 30 วินาที 65^{o}C 30 วินาที และ 72^{o}C 60

วินาที หลังจากเสร็จสิ้นในรอบสุดท้ายแล้วให้ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 7 นาที จากนั้นเก็บดีเอ็นเอที่ได้จากการทำเนสเตดพีซีอาร์ นำไปผ่านขั้นตอนการทำเจลอิเลคโตรโฟรีซิส (gel electrophoresis) แล้วนำไปย้อมสี พบว่าผลผลิตที่ได้เป็นดีเอ็นเอขนาด 361 คู่เบส นอกจากนี้การวัดความไวในการตรวจจับเชื้อไวรัสเอ็มบีวีด้วยวิธีพีซีอาร์ ยังสามารถทำได้โดยการนำดีเอ็นเอต้นแบบมาทำให้เจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆจากนั้นนำไปผ่านขั้นตอนพีซีอาร์ จะเห็นว่าไพร์เมอร์ที่ใช้สามารถจับกับดีเอ็นเอแล้วถูกเพิ่มปริมาณได้ก็จะเห็นเป็นแถบที่ความเข้มข้นต่างๆ ความเข้มข้นของดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสเอ็มบีวีที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจสอบได้ในไพรมารีพีซีอาร์ คือ 100 พิโคกรัม และใน เนสเตดพีซีอาร์ คือ 0.1 เฟนโตกรัม

-เทคนิค ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

การป้องกันการติดเชื้อเอ็มบีวีในโรงเพาะเป็นปัญหาสำคัญที่ต้องทำให้รัดกุมเพื่อป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อ ดังนั้นจึงต้องมีการตรวจพ่อแม่พันธุ์เพื่อให้แน่ใจว่าปลอดเชื้อเอ็มบีวี มีหลายๆวิธีที่ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสเอ็มบีวี ทั้งนี้ ELISA ก็เป็นเทคนิคหนึ่งที่ได้นำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสเอ็มบีวีในกุ้งกุลาดำ จากรายงานวิจัยของ Chang และ Chen (1994) ได้ศึกษาถึงผลของการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีที่มีต่อการเจริญเติบโตและการอยู่รอดของกุ้งกุลาดำในระยะตัวอ่อน โดยนำตัวอ่อนกุ้งระยะนอเพลียสที่ปลอดเชื้อเอ็มบีวีมาแช่ฟอร์มาลินความเข้มข้น 200 ส่วนในล้านส่วน 30 วินาทีและไอโอโดฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 ส่วนในล้านส่วน 1นาที เพื่อทำให้ปลอดเชื้อ นำลูกกุ้งประมาณ 5 x 10^4ตัวเลี้ยงในถังขนาด 500 ลิตร จำนวน 7 ถัง ด้วยน้ำเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน ที่ผ่านการกรองแล้วและให้อาหารที่เหมาะสมตามความต้องการแต่ละระยะ เพื่อให้แน่ใจว่ากุ้งได้รับอาหารอย่างเหมาะสมในแต่ละระยะและไม่เกิดภาวะขาดสารอาหาร ใช้ 4 ถังเป็นชุดควบคุมและ 3 ถังเป็นชุดการทดลองทำให้ติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีโดยเติมออกคลูชั่นบอดี้ 3.2 x 10^5 ออกคลูชั่นบอดี ต่อมิลลิตร ต่อวัน ตั้งแต่ระยะซูเอีย 1-3 จากนั้นบันทึกอัตราการเจริญเติบโตโดยการวัดความยาว อัตราการตาย และเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจสอบทางเนื้อเยื่อวิทยาเปรียบเทียบกับการใช้เทคนิค ELISA พบว่ากุ้งในกลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีจะมีสีตัวจางและมีขนาดตัวแตกต่างกัน ส่วนในกลุ่มควบคุม จะมีอัตราการเจริญเติบโตใกล้เคียงกัน รายงานนี้ได้ใช้เทคนิคการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวี คือ เทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยา โดยตรวจสอบความผิดปกติที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ที่ติดเชื้อในอวัยวะเป้าหมาย เปรียบเทียบกับการใช้เทคนิค ELISA ซึ่งจะพบว่าเทคนิค ELISA สามารถตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีได้ตั้งแต่ในระยะซูเอีย1 ส่วนเทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยาสามารถตรวจพบออกคลูชั่นบอดีได้ในระยะซูเอีย 2 การตรวจวินิจฉัยทางเนื้อเยื่อวิทยาสามารถตรวจสอบการติดเชื้อได้ 3 เปอร์เซ็นต์ ในระยะโพสต์ลาวา 1 และพบการติดเชื้อถึง 90

เปอร์เซ็นต์ ในระยะโพสต์ลาวา19 ส่วนการตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค ELISA จะใช้เปรียบเทียบกับชุดควบคุม จะเห็นว่าการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีด้วยเทคนิค ELISA มีความไวดีกว่าเทคนิคการตรวจวินิจฉัยทางเนื้อเยื่อวิทยา

การทำ ELISA สำหรับออกคลูชั่นบอดีของไวรัสเอ็มบีวี (Hsu *et al*., 2000) จะใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดี (polyconal antibodies) ต่อเชื้อเอ็มบีวีที่ได้มาจากการฉีดเชื้อเอ็มบีวีที่บริสุทธิ์เข้าไปในม้ามของกระต่ายหลังจากฉีดเป็นเวลา 3 สัปดาห์จึงทำการเก็บแอนติบอดี การทดสอบ ELISA ทำโดยนำออกคลูชั่นบอดีบริสุทธิ์ประมาณ 0.2 ไมโครกรัมในสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต พีเอช 9.6 มาเคลือบบนไมโครไตเตอร์เพลท แบบ 96 หลุม ที่ 4 องศาเซลเซียสทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นเติม โปรตีนอัลบูมิน 3 เปอร์เซ็นต์ ที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ใส่ซีรัมกระต่ายที่มีแอนติบอดีต่อไวรัสเอ็มบีวี (Rabbit anti-mbv serum) ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมงแล้วใส่ซีรั่มแพะที่มีแอนติบอดีต่อ Ig G ของกระต่าย (Goat anti-rabit IgG serum) ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ฮอสราดิชเปอร์ออกซิเดส (horseradish peroxidase) ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง จากนั้นใส่เตตราเมทิล เบนซิดีน (tetramethyl benzidine) เพื่อให้เกิดสี แล้วหยุดปฏิกิริยาที่เกิดสีโดยใช้กรดซัลฟูริก 1 นอร์มอล วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA Reader ทำการเปรียบเทียบการทำ ELISA โดยใส่ แอนติเจนลงไปแล้วทำตามขั้นตอนดังกล่าว ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าจะได้แอนติบอดี้ปริมาณมากที่สุดหลังจากฉีดเอ็มบีวีบริสุทธิ์ได้ 4 สัปดาห์ และเมื่อทำการทดสอบความไวของโพลิโคลนอลแอนติบอดี โดยนำมาเจือจาง 10 เท่า ที่ความเข้มข้นต่างๆแล้วนำมาเปรียบเทียบโดยการทำ ELISA พบว่าแอนติซีรัมที่ใช้สามารถตรวจจับไวรัสเอ็มบีวีได้ที่ระดับนาโนกรัม

สำหรับผลการทดสอบแอนติเจนซึ่งจะใช้สารผสมระหว่างแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสเอ็มบีวี (Anti-MBV serum) เจือจาง 1000 เท่า กับแอนติเจน (ออกคลูชั่นบอดีของไวรัสเอ็มบีวี) ที่ความเข้มข้นต่างๆ (0.04, 0.08, 0.12, 0.16, 0.2) มาเติมลงในแอนติบอดีไตเตอร์เพลทที่มีเชื้อไวรัส เอ็มบีวีเคลือบอยู่เพื่อให้แอนติบอดีที่เหลือในสารผสมทำปฏิกิริยากับแอนติเจนในเพลท จะเห็นว่าในสารผสมที่เติมลงไปในกรณีที่ใส่แอนติเจนในความเข้มข้นสูงขึ้นก็จะเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจนในเพลทน้อยลง ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลง เมื่อทดสอบด้วยการใส่เนื้อเยื่อตับที่ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40และ 50 ไมโครกรัม ผสมกับแอนติบอดี แล้วนำสารผสมนี้ไปทำตามวิธีข้างต้น พบว่า กราฟค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มีค่าใกล้กับตัวอย่างที่ไม่ได้เติมแอนติเจนในกราฟมาตรฐาน แสดงให้เห็นว่าเนื้อเยื่อตับที่ใส่ลงไปในสารผสมไม่ได้ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีและในทำนองเดียวกันเมื่อใส่เชื้อตัวแดงดวงขาว (WSSV) ลงไปในสารผสมก่อนทำตามขั้นตอนดังกล่าวนั้นจะให้ผลการทดลองในลักษณะเดียวกัน แสดงให้เห็นว่า แอนติบอดีที่ใช้มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อไว

รัสเอ็มบีวีเท่านั้น เมื่อทดลองใส่เนื้อเยื่อตับกุ้งที่ผสมกับออกคลูชั่นของไวรัสเอ็มบีวีลงไปในแอนติบอดีที่มีความเข้มข้นเท่ากับในตอนแรกของการทดลองแล้วนำไปทำปฏิกิริยากับแอนติเจนที่เคลือบอยู่ในเพลท แล้วเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน พบว่าค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มีค่าใกล้เคียงกันและมีแนวโน้มลดลงตามความเข้มข้นของแอนติเจนที่ใส่ก่อนจะทำปฏิกิริยาในเพลท สรุปได้ว่า rabbit antiserum ที่ใช้มีความจำเพาะกับเชื้อไวรัสเอ็มบีวีและวิธีการนี้เองสามารถใช้เป็นวิธีการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีได้ดีอีกวิธีหนึ่ง

-เทคนิค Dot Blot Hybridization

จากรายงานวิจัยของ Chang และคณะ (1993) ได้ทำการศึกษาดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสเอ็มบีวีและทำการเพิ่มปริมาณขึ้น โดยมีการสกัดอนุภาคไวรัสและออกคลูชั่นบอดีให้บริสุทธ์ด้วยการหมุนเหวี่ยงในสารละลายซีเซี่ยมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 30-50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งพบว่าอนุภาคไวรัสเอ็มบีวีมีความหนาแน่น 1.28-1.29 กรัมต่อมล. จากนั้นทำการออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณท่อนดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค PCR จำนวน 35 รอบ ทำให้ได้ท่อนดีเอ็นเอขนาด 600 คู่เบส แล้วยังได้ทำการตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์เดียวกันนี้ไปใช้ตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในกุ้งกุลาดำ โดยนำดีเอ็นเอที่สกัดจากกุ้งที่ติดเชื้อและกุ้งไม่ติดเชื้อมาตรวจสอบโดยใช้เทคนิค PCR พบว่าเมื่อนำผลผลิตจาก PCRไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเจลอิเลคโตรโฟลิซิส โดยใช้ เจลอะกาโรส พบว่ากุ้งที่ติดเชื้อจะเกิดแถบบนเจลขนาด 564 คู่เบส เมื่อเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ส่วนกุ้งไม่ติดเชื้อจะไม่พบแถบดังกล่าว นอกจากนี้แล้วยังใช้เทคนิค Dot Blot Hybridization โดยใช้ผลผลิตจาก PCR มาเป็น โพรบ เพื่อตรวจสอบว่าลำดับเบสในท่อนดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในกุ้งกุลาดำว่ามีบางส่วนของลำดับเบสที่เหมือนกับในดีเอ็นเอของยีนโพลีฮีดรินของแบคคูโลไวรัสในแมลง จึงใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจาก ยีนโพลีฮีดรินของแบคคูโรไวรัสในแมลง แล้วนำไปตรวจสอบความสามารถในการตรวจจับไวรัสเอ็มบีวีในกุ้งกุลาดำ โดยใช้เทคนิค Dot Blot Hybridization พบว่าไพรเมอร์ที่ใช้สามารถเกิด ไฮ บริไดเซชั่นกับไวรัสเอ็มบีวีในกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อได้ จากผลดังกล่าวทำให้ยืนยันสมมุติฐานได้ว่าบางส่วนของดีเอ็นเอในไวรัสเอ็มบีวีมีส่วนที่เหมือนกับส่วนของยีนโพลีฮีดรินในแมลง เนื่องมาจากไพรเมอร์ที่ผลิตจากยีนโพลีฮีดรินในแมลง สามารถเกิดไฮบริไดเซชั่น กับเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในกุ้งได้ จากการศึกษาวิจัยดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการใช้เทคนิค PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและนำมาใช้เป็น ดีเอ็นเอโพรบ (DNA probe) ในการทำ Dot Blot Hybridization เพื่อการตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสเอ็มบีวีในกุ้งกุลาดำจะมีความถูกต้องแม่นยำและเป็นอีกวิธีหนึ่งสามารถตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อในระยะแรกได้ เนื่องจากการติดเชื้อในระยะแรกของเชื้อไวรัส เอ็มบีวีจะไม่สามารถตรวจสอบ

ได้ด้วยเทคนิคทั่วไป เช่น เทคนิค squash mount และเทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยา (Chang and Chen,1994)

จากรายงานวิจัยของ Lu และคณะ (1993) ได้ทำการแยกอนุภาคไวรัสเอ็มบีวีและ ออกคลูชั่นบอดีให้บริสุทธิ์จากการสกัดโดยใช้สารละลายกลูโคสที่มีความเข้มข้นในช่วง 35 - 70 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำอนุภาคไวรัสและออกคลูชั่นบอดีที่ได้ไปสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Proteinase K เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอนำไปเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ สำหรับการเพิ่มปริมาณท่อนดีเอ็นเอที่มีขนาด 670 คู่เบส ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่ได้มาจากลำดับเบสของยีนที่สร้างโปรตีนโพลิฮีดริน (polyhedrin) ในแมลง เมื่อทำการเพิ่มปริมาณท่อนดีเอ็นเอโดยให้มีการติดฉลากด้วยดีออกซีจินิน (digoxigenin) แล้วจึงนำท่อนดีเอ็นเอดังกล่าวไปใช้เป็นโพรบ (Probe) เพื่อใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในกุ้งกุลาดำ โดยใช้เทคนิค Dot Blot Hybridization ซึ่งการทดลองนี้จะใช้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ของไวรัสเอ็มบีวีจำนวน 50 พิโคกรัม เป็นมาตรฐานเทียบกับดีเอ็นเอรวมของกุ้งในวัยอ่อนและตัวเต็มวัยที่ติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวี และดีเอ็นเอรวมของกุ้งในวัยอ่อนและตัวเต็มวัยที่ไม่ติดเชื้อ จากการนำสารละลายดีเอ็นเอดังกล่าวมาหยดลงบนไนล่อนเมมเบรนแล้วใช้โพรบที่ทำไว้ในตอนแรกมาจับกับดีเอ็นเอของเชื้อในตัวอย่างแล้วผ่านกระบวนการทำให้เกิดสี จากผลการทดลองพบว่าตัวอย่างดีเอ็นเอของกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีทั้งในกุ้งวัยอ่อนและตัวเต็มวัยเกิดสีเช่นเดียวกันเมื่อเทียบกับสารละลายดีเอ็นเอไวรัสบริสุทธิ์

นอกจากวิธีการทำ Dot Blot Hybridization จะสามารถตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในกุ้งวัยอ่อนและในตัวเต็มวัยได้แล้วนั้นยังสามารถตรวจสอบเชื้อไวรัสที่พบในปริมาณน้อยๆได้ โดยจากการนำดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสบริสุทธิ์มาเจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆแล้วนำไปตรวจสอบความสามารถในการจับของโพรบดังกล่าว พบว่า สามารถตรวจจับปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสเอ็มบีวีได้ที่ความเข้มข้น 0.1 พิโคกรัม จากผลการทดลองข้างต้นทำให้สรุปได้ว่า การใช้เทคนิค Dot Blot Hybridization เป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสเอ็มบีวีในกุ้งกุลาดำ อีกทั้งโพรบที่เตรียมขึ้นด้วยวิธีดังกล่าวยังสามารถจับจำเพาะกับเชื้อไวรัสเอ็มบีวีและสามารถตรวจสอบเชื้อได้ที่ปริมาณต่ำ ในทำนองเดียวกันจากรายงานวิจัยของ Lu และคณะ (1995) ซึ่งใช้เทคนิคเดียวกันนี้ตรวจสอบความสามารถในการตรวจจับเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในปริมาณต่ำที่ 1 พิโค กรัมเช่นเดียวกัน และยังทำการตรวจสอบความสามารถในการจับจำเพาะของโพรบเดียวกันกับที่ใช้ข้างต้นโดยทดลองให้จับกับพลาสมิด pBluescript (pBR328) พบว่าไม่มีตะกอนและสีเกิดขึ้นเมื่อเทียบกับการให้จับกับดีเอ็นเอของเอ็มบีวีซึ่งจะมีตะกอนและสีฟ้าอมม่วงเกิดขึ้น แสดงให้เห็นว่าโพรบที่เตรียมด้วยวิธีเดียวกันนี้เองมีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อไวรัสเอ็มบีวี

-*In situ* Hybridization

In situ Hybridization (ISH) เป็นเทคนิคทางอณูชีววิทยาที่พัฒนาขึ้น ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2512 (คศ.1969) โดยมีจุดประสงค์เริ่มแรกเพื่อการศึกษาหรืออ่านลำดับการเรียงตัวของกรดนิวคลีอิค ทั้งดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอของเซลล์ต่างๆ ตลอดจนศึกษาหรืออ่านลำดับการเรียงตัวของดีเอ็นเอของไวรัส โดยที่โครงสร้างเซลล์ไม่ถูกทำลาย เทคนิคในการทำ ISH ในระยะแรกใช้สารกัมมันตรังสี (radioisotope) เช่น ^{125} I, ^{32} P, ^{35}S เป็นต้น ในการตรวจหาสัญญาณ ต่อมามีการนำสารอกัมมันตรังสี (non-radioisotope) มาใช้ในการตรวจหาสัญญาณ ได้แก่ fluorochromes, chemiluminescences, enzymes และ metallic compound เป็นต้น ทั้งนี้เพื่อความสะดวกและปลอดภัย

เทคนิคการใช้สารเรืองแสง (fluorochromes) เรียกว่า Fluorescence *In situ* Hybridization (FISH) จัดอยู่ในกลุ่มnon-isotopic *In situ* hybridization (NISH) เพิ่งถูกพัฒนาขึ้นมาในระยะ 10 ปีนี้ ปัจจุบันเป็นเทคนิคสำคัญที่ถูกนำมาใช้ตรวจวิเคราะห์ค้นคว้าวิจัยในระดับอณูชีววิทยาอย่างแพร่หลาย

หลักการของ Fluorescence *In situ* Hybridization (FISH)

หลักการ คือ ส่วนของดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอสายเดี่ยวที่ติดฉลากที่เรียกว่า labeled probe มีการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ที่เป็นคู่สม (complementary) กับดีเอ็นหรืออาร์เอ็นเอเป้าหมาย สามารถจับ (Hybridization) กับดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอเป้าหมายนั้นเกิดเป็น “hybrids” ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

ชนิดของ Fluorescence *In situ* Hybridization (FISH)

สามารถแบ่งตามวิธีการตรวจหาสัญญาณจาก โพรบ (probe) ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวรายงานหรือตรวจจับสัญญาณนั่นเอง แบ่งเป็น 2 ชนิด คือ direct method และ indirect method วิธี direct method นั้น สารเรืองแสงจะจับหรือติดอยู่กับโพรบโดยตรง ทำให้ตรวจหาสัญญาณได้ทันทีหลังจากเกิดไฮบริไดเซชั่น ส่วนวิธี indirect method นั้น โพรบจะติดฉลากด้วยสารเฮปเทน (haptens) เช่น ไบโอติน (biotin) , ดีออกซีจีนิน (digoxiginin) , โฟโตไบโอติน (photobiotin) , โบรโมดีออกซี-ยูริดีน (bromodeoxy-uridine) , อะเซทิลอะมิโนฟลูโอเรน (acetylaminofluorence) เป็นต้น แล้วจึงตรวจหาสัญญาณ โดยการติดสารเรืองแสงไว้กับแอนติบอดีที่จำเพาะเจาะจง (specific antibodies) ต่อเฮปเทนนั้น มีรายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการนำเทคนิค Fluorescence *In situ* Hybridization (FISH) มาใช้ Lu และคณะ (1995) ได้นำเทคนิคนี้มาใช้เพื่อตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในกุ้งกุลาดำ โดยใช้โพรบที่จำเพาะเจาะจง

กับเชื้อไวรัสเอ็มบีวี การนำส่วนของโปรตีนโพลีฮีดิน (polyhedrin) มาติดฉลากด้วยดีออกซีจินิน นำมาตรวจจับเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในเนื้อเยื่อของกุ้งกุลาดำ จากการทดลองพบว่า โพรบที่เตรียมขึ้นสามารถตรวจจับดีเอ็นเอของไวรัสที่อยู่ในเนื้อเยื่อของกุ้งกุลาดำวัยอ่อนได้ โดยจะสังเกตุเห็นการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ มีสีม่วงอมฟ้าในส่วนของนิวเคลียสและไซโตพลาสซึม สีที่เกิดขึ้นคือ มีการไฮบริไดเซชั่นของโพรบที่ติดฉลาก กับ นิวคลีโอไทด์ของไวรัสในเนื้อเยื่อนั้นและนำไปผ่านการทำปฏิกิริยาให้เกิดสี จากการศึกษาพบว่าในส่วนของเนื้อเยื่อที่ไม่ติดเชื้อเมื่อนำไปผ่านขั้นตอนการไฮบริไดเซชั่นจะไม่เกิดสีขึ้น ในทำนองเดียวกัน ถ้านำเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีมาไฮบริไดเซชั่น กับ พลาสมิด pBluescript (pBR328) ที่ติดฉลากด้วยดีออกซีจินินก็ไม่ทำให้เกิดสี เนื่องจากไม่เกิดการจับกันของพลาสมิดกับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสในเนื้อเยื่อ

6. อาหารกับสุขภาพสัตว์น้ำ

ในปีค.ศ. 1933 เริ่มมีการทดลองเพาะฟักกุ้งคุรูม่า *Penaeus japonicus* ในประเทศญี่ปุ่น แต่ลูกกุ้งวัยอ่อนส่วนใหญ่มักจะตายมีส่วนน้อยเท่านั้นที่รอดหลังจากระยะไมซิส (Fujinaga, 1967 ; Shigueno,1976) จากนั้นก็ได้มีการศึกษาเพื่อที่จะเพิ่มอัตรารอดของกุ้ง โดยในปีค.ศ. 1941 ได้มีการเพาะเลี้ยง *Skeletonema costatum* เพื่อใช้เป็นอาหารกุ้งในระยะซูเอียเป็นผลให้ลูกกุ้งมีอัตรารอด 30 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะไมซิส เปรียบเทียบกับก่อนหน้านี้ที่มีอัตรารอดเพียง 1 เปอร์เซ็นต์ ทำให้พบว่า *S. costatum* เป็นอาหารที่เหมาะสมสำหรับลูกกุ้งที่ระยะซูเอีย (Matsue, 1954) ในปีค.ศ. 1956 Hudinaga ได้นำนอเพลียสของอาร์ทีเมีย *Artemia salina* มาใช้เลี้ยงลูกกุ้งในระยะไมซิสและก่อนเข้าสู่ระยะโพสต์ลาวา โดยมีการให้ *S. costatum* ในระยะซูเอียด้วยซึ่งให้ผลการเลี้ยงที่ดี (Fujinaga, 1967; Shigueno,1976) อย่างไรก็ตามการเลี้ยง *S. costatum* ในบางฤดูกาลทำให้เก็บเกี่ยวผลผลิตได้น้อย (Hudinaga and Kittaka, 1975อ้างโดย Mcvey,1993) แต่ในปีค.ศ. 1964 ได้มีการเติมสารอาหารที่จำเป็นต่อการเลี้ยงไดอะตอมนี้จึงทำให้ประสบความสำเร็จในการผลิตในปริมาณมาก และได้มีการปรับเปลี่ยนใช้แพลงก์ตอนพืชชนิดอื่น (Simon, 1978) โรติเฟอร์ และ อาหารสำเร็จรูปอื่นๆมาเลี้ยงลูกกุ้ง ซึ่งต่อมามีการทดลองใช้อาหารสำเร็จรูปที่ผสมด้วยแพลงก์ตอน (Liao *et al*., 1988) ,อาหารสำเร็จรูปขนาดเล็กชนิด microencapsulated (Kurmaly *et al*., 1989), สาหร่ายอบแห้งด้วยเทคนิค spray - dried (Biedenback *et al*., 1990), อาหารสำเร็จรูปขนาดเล็กชนิด microbound (Liao *et al*., 1990) และอาหารสำเร็จรูปขนาดเล็กชนิด microparticulate (Kanazawa, 1991 อ้างโดย Mcvey, 1993) นำมาใช้แทนอาหารมีชีวิต ซึ่งก็พบว่า กุ้งกุลาดำที่ให้กินอาหารสำเร็จรูปขนาดเล็กชนิด microparticulate เพียงอย่างเดียวมีอัตรารอด 77 เปอร์เซ็นต์ในช่วงตั้งแต่ระยะซูเอีย 1 ถึงระยะโพสต์ลาวา 10 อย่างไรก็ตามอาหารสำเร็จดังกล่าว

บางชนิดมักพบการปนเปื้อนยาปฏิชีวนะ และสารพวกสเตรียรอยด์ จากรายงานในประเทศไต้หวัน พบว่าผลจากสารปนเปื้อนเหล่านี้ในอาหารสำเร็จที่ใช้ทำให้ผลผลิตลูกกุ้งกุลาดำอ่อนแอและมีการตายอย่างมากในเวลาเดียวกัน (Chen, 1990) อย่างไรก็ตาม อาหารมีชีวิตพวกสาหร่ายขนาดเล็ก โรติเฟอร์ และอาร์ทีเมียยังคงเป็นอาหารหลักที่มีความสำคัญต่อการผลิตพันธุ์กุ้งที่มีคุณภาพ

สาหร่ายที่นิยมใช้เป็นอาหารสำหรับลูกกุ้งวัยอ่อน ได้แก่ สาหร่ายสีเขียวพวกแฟลกเจลเลต *Tetraselmis* sp. และพวกไดอะตอม *Skeletonema costatum*, *Chaetoceros* sp. และ *Thalassiosira weissflogii* (Griffith *et al*., 1973; Simon, 1978; Emmerson, 1980; Gallagher, 1983; Chu, 1989) สาหร่ายเป็นอาหารมีชีวิตที่เป็นแหล่งอาหารที่สำคัญในการอนุบาลกุ้งพีเนียสในระยะวัยอ่อน แต่การเปลี่ยนแปลงของสภาพอากาศส่งผลต่อการเพาะเลี้ยงสาหร่ายทำให้เป็นอุปสรรคในการผลิตสาหร่ายให้เพียงพอต่อความต้องการของลูกกุ้ง ด้วยเหตุนี้เองทำให้มีการศึกษาการใช้อาหารสำเร็จอื่นๆทดแทน จากรายงานวิจัยของ Biedenbach และคณะ ได้ทำการทดลองให้ลูกกุ้งขาว *P. vannamei* กินสาหร่ายเตตร้าเซลมิส ซูสิก้า (*Tetraselmis suecica*) แบบสำเร็จรูปที่ใช้เทคนิคสเปรย์ดราย (spray-died) เพื่อทดแทนการใช้สาหร่ายสดทั้งหมดหรือบางช่วงของการเลี้ยง พบว่าการใช้สาหร่ายเตตร้าเซลมิส ซูสิก้า ทดแทนสาหร่ายสดที่ 33 และ 66 เปอร์เซ็นต์ไม่มีผลต่ออัตรารอดและการเปลี่ยนแปลงระยะเข้าสู่ระยะโพสต์ลาวา แต่ที่การทดแทนด้วยสาหร่ายแห้งนี้ 100 เปอร์เซ็นต์ พบว่าลูกกุ้งจะมีเปอร์เซ็นต์การรอดต่ำกว่าชุดการทดลองอื่นๆ ส่วนชุดการทดลองที่มีการให้สาหร่ายร่วมกับอาร์ทีเมีย พบว่าลูกกุ้งในชุดการทดลองที่มีการให้ อาร์ทีเมียกับสาหร่ายสดมีการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะต่างในอัตราที่มากกว่าชุดการทดลองที่ทดแทนด้วยสาหร่ายเตตร้าเซลมิส ซูสิก้าร่วมกับการให้อาร์ทีเมีย

โรติเฟอร์เป็นอาหารที่จำเป็นและมีความสำคัญมากสำหรับลูกปลาทะเลวัยอ่อนและเป็นอาหารสำหรับกุ้งในระยะไมซิสด้วย โรติเฟอร์ชนิดที่เหมาะสมที่สุดสำหรับใช้เป็นอาหารสัตว์น้ำวัยอ่อนได้แก่ โรติเฟอร์ (*Brachionus plicatilis*) ซึ่งมีขนาดอยู่ระหว่าง 100 – 400 ไมโครเมตร โรติเฟอร์ชนิดนี้สามารถแยกได้เป็น 3 สายพันธุ์ ที่มีขนาดแตกต่างกัน คือ ชนิด L มีขนาด 190-320 ไมโครเมตร ชนิด S มีขนาด 140-220 ไมโครเมตร และชนิด SS มีขนาด 100-160 ไมโครเมตร (Lubzens,1987; Lubzens *et al*., 1989) *B. plicatilis* สามารถพบได้ในธรรมชาติ ในบ่อเลี้ยงปลาไหลที่มีความเค็มมากกว่า 3.7 ppt โรติเฟอร์เพศเมียและไข่สามารถอยู่รอดได้ที่ความเค็มสูงถึง 98 ppt อย่างไรก็ตามช่วงความเค็มที่เหมาะสมสำหรับโรติเฟอร์ชนิดนี้ คือ 10-35 ppt (Hirayama and Ogawa, 1972)

นอเพลียสของอาร์ทีเมีย เป็นอาหารที่ดีที่สุด สำหรับลูกกุ้งวัยอ่อนซึ่งมักจะกินอาหารที่มีขนาด 0.5 มิลลิเมตร Seal (1933) และ Rollefsen (1939) อ้างโดย Sorgeloos (1980) รายงานว่า นอเพลียสของ *Artemia salina* ที่เพิ่งฟักใหม่ๆเป็นอาหารที่มีคุณค่าสำหรับลูกปลาวัยอ่อน *A. salina* มีมากกว่า 50 สายพันธุ์ จากพื้นที่ต่างกันในทวีปและประเทศต่างๆ ได้แก่ แอลจีเรีย เคนยา ตูนีเซีย อาร์เจนตินา บราซิล แคนาดา เม็กซิโก เปรู เปอร์โตริโก อเมริกา เวเนซูเอลา อินเดีย อิหร่าน อิรัก อิสราเอล ญี่ปุ่น จีน ออสเตรเลีย บัลแกเรีย ฝรั่งเศส อิตาลี สเปน รัสเซีย และประเทศอื่นๆ อีกมากมาย ไข่ของอาร์ทีเมียสามารถนำมาเพาะฟักได้ง่ายที่น้ำทะเลที่มีความเค็ม 35 ppt อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นอกจากนี้อาร์ทีเมียสามารถอยู่ได้ในน้ำจืดเป็นเวลา 1 วัน และเจริญเติบโตได้ที่ความเค็ม 5-150 ppt (Tunsutapanich,1992 อ้างโดย Mcvey,1993) และสามารถปรับตัวอยู่ได้ที่ช่วงอุณหภูมิ 6-35 องศาเซลเซียส อีกทั้งยังสามารถอยู่รอดได้ในน้ำที่มีค่าออกซิเจนละลายน้ำต่ำกว่า 1 ส่วนในล้านส่วน (ppm) (Persoone and Sorgeloos, 1980 อ้างโดย Mcvey, 1993) ด้วยเหตุที่อาร์ทีเมียเป็นสัตว์ที่มีคุณลักษณะที่สามารถอาศัยอยู่ได้ในสภาวะอุณหภูมิและความเค็มที่มีช่วงกว้างและที่มีออกซิเจนละลายน้ำในระดับต่ำ ทำให้อาร์ทีเมียเป็นอาหารที่เหมาะสมสำหรับทั้งกุ้งน้ำจืดและกุ้งน้ำเค็มในระหว่างการขนส่งและเหมาะสำหรับใช้เป็นอาหารอนุบาลลูกกุ้งและลูกปลาวัยอ่อนในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เนื่องจากสามารถเก็บรักษาไข่ในสภาพแห้ง (cyst) และใช้ได้สะดวก นอกจากอาร์ทีเมียจะเป็นอาหารที่มีคุณค่าและเป็นอาหารหลักที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงลูกกุ้งในระยะโพสต์ลาวา ยังพบว่า อาร์ทีเมียที่ได้จากแหล่งต่างกันจะมีองค์ประกอบของกรดไขมันที่ต่างกัน (Leger *et al*., 1986) อาร์ทีเมียโตเต็มวัยสามารถใช้เป็นอาหารในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้ โดยใช้เป็นวัสดุอาหารในการทำอาหารสำเร็จรูป ส่วนอาร์ทีเมียมีชีวิตใช้เป็นอาหารสำหรับลูกกุ้งระยะโพสต์ลาวาที่ดีกว่าอาหารสำเร็จรูปทั้งหมด อีกทั้งยังทำให้คุณภาพน้ำที่ใช้เลี้ยงดีและทำให้อัตรารอดของลูกกุ้งเพิ่มขึ้น อาร์ทีเมียที่ระยะโตเต็มวัยจะมีคุณค่าทางอาหารมากกว่าอาร์ทีเมียที่ระยะนอเพลียสซึ่งเพิ่งฟักออกจากไข่ คุณค่าทางอาหารของอาร์ทีเมียจะมีการเปลี่ยนแปลงระหว่างการเจริญเติบโต โดยปริมาณไขมันจะลดลงจาก 20 เปอร์เซ็นต์เหลือน้อยกว่า 10 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับน้ำหนักแห้ง ในขณะที่โปรตีนจะเพิ่มขึ้นจาก 42 เปอร์เซ็นต์จนถึงมากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ ในขณะเดียวกันอาร์ทีเมียที่เพิ่งฟักใหม่ๆจะขาดกรดอะมิโน ฮิสติดีน เมทไทโอนีน ฟีนิลอะลานีน และ ทรีโอนีน ส่วนอาร์ทีเมียโตเต็มวัยจะอุดมไปด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็นทั้งหมด (Sorgeloos, 1980)

Kim และคณะ (1996) ได้ทำการศึกษาผลของอาหารที่ให้ปลาในระยะวัยอ่อน โดยใช้อาร์ทีเมียโตเต็มวัยมาเลี้ยงลูกปลาโคโฮแซลมอน (coho salmon, *Oncorhyncus kisutch*) ทดลอง

ให้อาหารแตกต่างกัน 4 สูตร คือ สูตรที่1 อาร์ทีเมียมีชีวิตระยะนอเพลียส สูตรที่ 2 อาร์ทีเมียมีชีวิตโตเต็มวัย สูตรที่ 3 อาหารสำเร็จรูปสำหรับลูกปลาเบอร์ 2 และ เบอร์ 3 สูตรที่ 4 อาร์ทีเมียโตเต็มวัยชนิดอาหารแห้ง เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า ลูกปลาโคโฮแซลมอนที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรที่2 ในระยะแรกมีการเจริญเติบโตดีกว่าสูตรอื่นๆ โดยมีค่านำหนักเฉลี่ยเพิ่มขึ้น 5.8 เปอร์เซ็นต์ต่อวันในที่สูตรอื่นๆ มีค่าเฉลี่ย 4.0 เปอร์เซ็นต์ต่อวัน

Callan และคณะ (2003) ได้ทำการศึกษาการใช้อาหารเม็ดสำเร็จรูปขนาดเล็กมาใช้ทดแทนเพื่อลดการใช้อาร์ทีเมีย ในการเลี้ยงลูกปลาแอตแลนติกคอด *Gadus morhua* โดยแบ่งเป็น 4 ชุดการทดลอง ในชุดการทดลองที่ 1 เป็นชุดการทดลองที่มีการให้อาร์ทีเมียทั้งหมด ชุดการทดลองที่ 2 จะให้อาร์ทีเมีย 50 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับการให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปขนาดเล็ก ชุดการทดลองที่ 3 จะให้อาร์ทีเมีย 25 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับการให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปขนาดเล็ก ส่วนชุดการทดลองที่ 4 จะให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปขนาดเล็กเพียงอย่างเดียว จากผลการทดลองพบว่า เปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตและการรอดตายไม่มีความแตกต่างกันในชุดการทดลองที่ 1 2 และ 3 ส่วนชุดการทดลองที่ 4 พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตและการรอดตายน้อยกว่าในชุดการทดลองอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่า การให้อาหารสำเร็จรูปเพื่อทดแทนการใช้อาร์ทีเมียสามารถทดแทนได้บางส่วนเท่านั้น เนื่องจากจะช่วยในการลดต้นทุนการผลิตในช่วงที่อาร์ทีเมียมีราคาแพง แต่อย่างไรก็ตามอาร์ทีเมียก็ยังเป็นอาหารที่มีคุณค่าและมีความสำคัญในการใช้เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำวัยอ่อน

นอกจากนี้มีรายงานการใช้ไข่ของหอยนางรมหรือตัวอ่อนหอยนางรมระยะโทรโคฟอร์ลาวา (trochophore larvae) นำมาอนุบาลลูกกุ้งกุลาดำในไต้หวัน (Chen, 1990) รวมทั้งมีการใช้โคพิพอด และโพลีคีดบางชนิดมาใช้เป็นอาหารในบางช่วงระยะการเจริญเติบโตของกุ้งด้วย (Mcvey,1993) ในขณะเดียวกันการให้โคพิพอด *Tisbe holothuriae* จะช่วยให้การเจริญเติบโตและอัตรารอดของลูกปลาเทอร์บอท (turbot) วัยอ่อนเพิ่มมากขึ้น (Stottrup and Norsker, 1997)

7. สภาพแวดล้อมกับการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาและการเกิดโรค

ครัสเตเซียที่อาศัยอยู่ในทะเลจะได้รับอิทธิพลจากปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่มีการเปลี่ยนแปลงอยู่เสมอ ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงระหว่างวัน ตามฤดูกาล และความเครียดที่มาจาการได้รับมลพิษซึ่งเป็นปัจจัยที่สำคัญที่จะส่งผลกระทบต่อร่างกายสัตว์และเป็นสาเหตุที่จะเพิ่มการเกิดโรคในครัสเตเซีย การเปลี่ยนแปลงสภาพอากาศ การเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางฟิสิกส์และเคมีของน้ำ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำนี้เองจะส่งผลต่อเมตาบอลิซึม การเจริญเติบโต การลอกคราบ ซึ่งสิ่งเหล่านี้สามารถส่งผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน (Moullac and Haffner, 2000)

ความเครียดทางสิ่งแวดล้อมจากมลภาวะต่าง ๆ เป็นปัจจัยสำคัญที่จะทำให้ประสิทธิภาพของระบบภูมิคุ้มกันลดลง โดยสิ่งที่แสดงให้เห็นว่าภูมิคุ้มกันลดลงคือ การติดเชื้อหรือการเกิดโรคเพิ่มขึ้นในครัสเตเซีย ผลจากการติดเชื้อมาจากการได้รับเชื้อก่อโรคและความต้านทานโรคลดลง การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเป็นการนำเอาสัตว์มาเพาะฟักอนุบาลและเลี้ยงในพื้นที่จำกัดในอัตราความหนาแน่นที่มากกว่าสภาพธรรมชาติหลายเท่า การดำเนินการเช่นนี้ส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำในการเพาะเลี้ยง ซึ่งจะต้องมีการดูแลจัดการเพื่อคงคุณภาพน้ำไว้ให้อยู่ในช่วงระดับที่เหมาะสม การเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำที่เกิดขึ้นมีสาเหตุโดยตรงจากวิธีการที่นำมาใช้ในการเพาะเลี้ยง การเลี้ยงสัตว์น้ำในบ่อขนาดเล็ก การขับถ่ายของเสียของสัตว์น้ำที่สะสมอยู่ในบ่อ การเน่าสลายของเศษอาหารเหลือ การที่มีพื้นที่จำกัดทำให้สัตว์น้ำมีสภาพหนาแน่นและการให้อาหารในปริมาณสูงจะทำให้เกิดปัญหาคุณภาพน้ำ ซึ่งจะส่งผลโดยตรงต่อตัวสัตว์น้ำทำให้มีการเปลี่ยนแปลงต่างๆในร่างกายเพื่อปรับสภาพร่างกายให้เหมาะสม และถ้าปัญหาคุณภาพน้ำที่เกิดขึ้นมากกว่าที่สัตว์น้ำสามารถปรับตัวและทนอยู่ได้ก็จะทำให้ถึงตายได้ ปัจจัยที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำซึ่งจะทำให้เกิดผลกระทบต่อสัตว์น้ำ ได้แก่

7.1 **อุณหภูมิ**

ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในประเทศไทยที่เกิดปัญหาเกี่ยวกับอุณหภูมิน้ำก็คือ ในช่วงอุณหภูมิต่ำในฤดูหนาวซึ่งมีผลให้การพัฒนาเข้าสู่ระยะต่างๆและการเจริญเติบโตของลูกกุ้งก้ามกราม ลูกกุ้งกุลาดำ ลูกกุ้งแชบ๊วยวัยอ่อนเป็นไปอย่างค่อนข้างช้า กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในบ่อจะลดการกินอาหารลงเมื่อ อุณหภูมิลดต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียส และการเจริญเติบโตก็ลดลง (ยนต์, 2542) เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นกุ้งกุลาดำจะสร้างฮีโมไซยานิน (Haemocyanin) เพิ่มขึ้น ทำให้มีการบริโภคออกซิเจนเพิ่มขึ้น แต่เมื่อสูงขึ้นถึงระดับหนึ่ง การสร้างฮีโมไซยานินจะหยุดชะงักลง ร่างกายจะสร้างฮอร์โมนเพื่อยับยั้งการสร้างฮีโมไซยานิน มีผลทำให้กุ้งมีอาการอ่อนเพลีย กินอาหารน้อยลง (ประจวบ, 2537) อุณหภูมิจะส่งผลต่อการเจริญเติบโต ระดับโปรตีนในเลือด และมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง คือมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับเอนไซม์โปรฟีนอลออกซิเดส และยังมีผลต่อเวลาที่ใช้ในการแข็งตัวของเลือด (clotting time) และจำนวนเม็ดเลือดรวม (total haemocyte number) ในปู *Uca pugilator* (Dean and Vernberg, 1966) มีผลให้ความเป็นพิษของโครเมี่ยมนิเกิลและ สังกะสี มีเพิ่มมากขึ้นในไมสิด(*Praunus flexuosus*) เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น (McLusky and Hagerman, 1987) จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์โปรฟีนอลออกซิเดสในปูสีน้ำเงิน (*Carcinus maenas*) ที่เป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงฤดูกาล โดยจะเก็บตัวอย่างเลือดมาตรวจวัดเอนไซม์โปรฟีนอลและปริมาณเม็ดเลือด วัดความเค็มและอุณหภูมิของน้ำ รวมไปถึงหาความ

หนาแน่นของจำนวนแบคทีเรียในมวลน้ำ ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่มีความสัมพันธ์กับความว่องไวของเอนไซม์โปรฟีนอลออกซิเดส คือ จำนวนแบคทีเรีย เมื่อจำนวนแบคทีเรียในน้ำเพิ่มขึ้นก็จะส่งผลให้มีปริมาณเอนไซม์โปรฟีนอลมากขึ้น (Hauton *et al*., 1997) ในทำนองเดียวกันกับรายงานวิจัยของ Cheng และคณะ (2003) ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง *Macrobrachium rosenbergii* โดยเลี้ยงกุ้งที่อุณหภูมิ 20 25 30 และ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พบว่ากุ้งที่เลี้ยงที่อุณภูมิ 20 และ 35 องศาเซลเซียส มีค่าความว่องไวในการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดต่ำกว่า กุ้งที่เลี้ยงที่อุณภูมิ 25 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกันพบว่าความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียของน้ำเลือดของกุ้งที่เลี้ยงอุณหภูมิ 20 และ 35 องศาเซลเซียส มีค่าความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียของน้ำเลือดลดลง 118 และ 283 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งที่ได้รับอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ค่าความว่องไวในการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดและค่าความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียของน้ำเลือดที่มีค่าต่ำลงเนื่องมาจากอุณหภูมิ 20 และ 35 องศาเซลเซียส จะส่งผลให้กุ้งมีการยอมรับต่อเชื้อ *Lactococcus garvieae* เพิ่มมากขึ้นแสดงให้เห็นว่าที่อุณหภูมิดังกล่าวทำให้ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งมีประสทธิภาพลดลง ในทำนองเดียวกันจาก รายงานการวิจัยของ Vargas-Albores และคณะ (1998) โดยศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อความเข้มข้นของโปรตีนในน้ำเลือด และปริมาณเอนไซม์โปรฟีนอลออกซิเดสทั้งหมดในเซลล์เม็ดเลือดของกุ้ง *Penaeus californiensis* โดยนำกุ้งกลุ่มละ 10 ตัวมาเลี้ยงไว้เป็นเวลา 20 วัน ทดลองในอุณหภูมิระดับต่างๆ คือ 18, 22, 25, 28 และ 32 องศาเซลเซียสที่ความเค็ม 36 ส่วนในพันส่วน พบว่า เอนไซม์โปรฟีนอลออกซิเดส จะลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส และปริมาณโปรตีนที่เพิ่มขึ้นที่อุณหภูมิ 28 และ 32 องศาเซลเซียส โดยที่28 องศาเซลเซียส การเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีนจะไม่เกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์โปรฟีนอลออกซิเดสแต่ที่อุณภูมิ 32 องศาเซลเซียสที่มีการเปลี่ยนแปลงของระดับโปรตีนเพิ่มขึ้น จะมีการลดลงของการทำงานของเอนไซม์โปรฟีนอลออกซิเดส ทั้งนี้เนื่องจากปกติแล้วกุ้งขาวสามารถรักษาการทำงานของเอนไซม์นี้ได้อย่างเพียงพอที่ระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมได้ ดังนั้นเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงอุณภูมิที่ไม่เหมาะสมทำให้กุ้งไม่สามารถรักษาความสมดุลในการทำงานของเอนไซม์นี้ได้จะส่งผลให้กุ้งจะเกิดการติดเชื้อได้มากขึ้นที่อุณหภูมิที่สูงขึ้น นอกจากนี้การศึกษาในปูสีน้ำเงิน (*Carcinus maenas*) ยังพบว่า การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิตามฤดูกาลมีผลต่อความต้านทานต่อแบคทีเรียของเม็ดเลือด ซึ่งมีระดับความต้านทานต่ำในเดือนกุมภาพันธ์และสิงหาคม ซึ่งมีอุณหภูมิน้ำต่ำสุดและสูงสุดในรอบปี (Chisholm and Smith, 1994 อ้างโดย Moullac and Haffner, 2000)

Coman และคณะ (2002) ได้ทำการทดลองผลของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตและอัตรารอดของกุ้ง โดยใช้กุ้ง *Penaeus japonicus* สายพันธุ์ต่างกันโดยนำมาจากพื้นที่ต่างๆกัน โดยในการทดลองแรกจะนำกุ้งทั้ง 6 สายพันธุ์มาเลี้ยงที่อุณหภูมิต่างกันคือ 24 27 และ 30 องศาเซลเซียส พบว่าอัตรารอดของสูงสุดที่สุดที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียสและอัตรารอดต่ำสุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ส่วนการเจริญเติบโตสูงสุดที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียสและการเจริญเติบโตต่ำสุดที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังพบว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของสายพันธุ์และอุณหภูมิโดยมีบางสายพันธุ์สามารถทนต่ออุณหภูมิในช่วงกว้าง ซึ่งความแตกต่างกันของสายพันธุ์จะสัมพันธ์กับการเจริญเติบโต การรอด และนำหนักที่เพิ่มขึ้นในแต่ละอุณหภูมิด้วย และผลจากการใช้อุณหภูมิในช่วงกว้างทำให้ทราบได้ว่ามีผลต่อการรอดมากกว่าการเจริญเติบโต ในขณะที่เมื่อศึกษาในการทดลองที่สอง ซึ่งทำการทดลองผลของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตและอัตรารอดของกุ้งทั้ง 6 สายพันธุ์เช่นเดียวกันแต่ใช้ช่วงอุณหภูมิที่แคบลง คือ 27.5 29.2 และ31.2 ซึ่งพบว่ามีผลกระทบต่อทั้งการเจริญเติบโตและการรอดโดยที่อุณหภูมิ 31.2 องศาเซลเซียสจะมีการเจริญเติบโตและการรอดต่ำกว่าที่อุณหภูมิ 27.5 และ 29.2 องศาเซลเซียส

7.2 ความเค็ม

สิ่งมีชีวิตสามารถปรับตัวและทนอยู่ได้ในระดับความเค็มของน้ำที่แตกต่างกัน สัตว์ทะเลบางชนิดสามารถอาศัยอยู่ได้ในระดับความเค็มต่ำเช่นกุ้งกุลาดำ กุ้งตะกาด จากการที่สิ่งมีชีวิตสามารถทนอยู่ได้ในระดับความเค็มของน้ำที่ต่างกันและทนต่อการเปลี่ยนแปลงช่วงความเค็มต่างกัน จึงทำให้การเปลี่ยนแปลงความเค็มของน้ำมีอิทธิพลเป็นอย่างมากต่อระบบนิเวศในน้ำและสัตว์น้ำ เมื่อความเค็มของน้ำเปลี่ยนแปลงไปอยู่นอกช่วงความเค็มที่เหมาะสมของสัตว์ทะเลหรือสัตว์น้ำกร่อย ความรุนแรงของผลกระทบที่มีต่อสัตว์น้ำจะขึ้นอยู่กับความแตกต่างของความเค็มที่เปลี่ยนไป และความสามารถของสัตว์น้ำชนิดนั้นที่สามารถปรับระบบในร่างกายให้สามารถรับการเปลี่ยนแปลงความเค็มได้ ถ้าการเปลี่ยนแปลงความเค็มนั้นมากเกินกว่าที่สัตว์น้ำชนิดนั้นๆจะสามารถปรับตัวได้ก็จะทำให้สัตว์น้ำตาย แต่ถ้าการเปลี่ยนแปลงความเค็มนั้นยังอยู่ในระดับที่สัตว์น้ำทนได้ สัตว์น้ำก็ยังคงมีชีวิตอยู่ได้ แต่ก็จะมีอัตราการเจริญเติบโตที่ลดลง เนื่องจากสูญเสียพลังงานส่วนหนึ่งในการปรับสมดุลเกลือแร่ในสัตว์น้ำ (ยนต์, 2542) นอกจากนี้ยังทำให้สัตว์น้ำอ่อนแอลงซึ่งมีผลต่อการเกิดโรคและอัตราการรอดตายของสัตว์น้ำ จากรายงานการวิจัยของ Vargas-Albores และคณะ (1998) โดยศึกษาผลของความเค็มมีต่อความเข้มข้นของโปรตีนในน้ำเลือด และปริมาณเอนไซม์โปรฟีนอลออกซิเดสทั้งหมดในเซลล์เม็ดเลือดของกุ้ง *Penaeus californiensis* โดยนำกุ้งกลุ่มละ 10 ตัวมาเลี้ยงไว้เป็นเวลา 20 วัน ทดลองในความเค็มระดับต่างๆ คือ 28, 32, 36, 40 และ 44 ส่วน

ในพันส่วน ที่ความเค็ม 25 ส่วนในพันส่วน พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์โปรฟีนอลออกซิเดสจะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อความเค็มสูงขึ้น และปริมาณโปรตีนเปลี่ยนแปลงไม่สัมพันธ์กับความเค็มที่เพิ่มขึ้น การเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีนจะไม่เกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์โปรฟีนอลออกซิเดส นอกจากนี้ Cheng และคณะ (2003) ได้ศึกษาผลของความเค็มที่มีต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง *Macrobrachium rosenbergii* โดยได้รับความเค็มที่ 0 5 10 และ 15 ส่วนในพันส่วน เป็นเวลา 7 วัน พบว่ากุ้งที่ได้รับความเค็ม 5 และ 10 ส่วนในพันส่วน มีค่าความว่องไวในการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดมากกว่า กุ้งที่ได้รับความเค็มที่ 0 และ 15 ส่วนในพันส่วน นอกจากนี้พบว่าความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียของน้ำเลือดของกุ้งที่ได้รับความเค็มที่ 5 และ 10 ส่วนในพันส่วน มีค่าเพิ่มขึ้น 77 และ 74 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งที่อยู่ในน้ำจืด ในขณะที่กุ้งที่ได้รับความเค็ม 15 ส่วนในพันส่วน มีค่าความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียของน้ำเลือดลดลง 26 เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งที่เลี้ยงในน้ำจืด ในขณะที่ Villarreal และคณะ (2003) ได้ศึกษาผลของความเค็มต่อการเจริญเติบโต การรอด และการใช้ออกซิเจน ของกุ้งสีน้ำตาลระยะวัยรุ่น (*Farfantepenaeus californiensis*) โดยเลี้ยงกุ้งที่ความเค็มต่างๆ คือ 25 35 45 และ 55 ส่วนในพันส่วน เป็นเวลา 75 วัน พบว่ากุ้งที่เลี้ยงที่ความเค็ม 55 ส่วนในพันส่วน มีการเจริญเติบโตต่ำที่สุดและการเลี้ยงความเค็มสูงที่ 45 และ 55 ส่วนในพันส่วน มีอัตราการอดต่ำกว่าการเลี้ยงที่ความเค็ม 25 และ 35 ส่วนในพันส่วน ซึ่งอัตราการตายของกุ้งที่เลี้ยงที่ความเค็มสูงเป็นผลมาจาก การสูญเสียความสามารถในการปรับสมดุล ออสโม ติกในร่างกาย ในขณะเดียวกันกุ้งที่เลี้ยงที่ความเค็มสูงมีการใช้ออกซิเจนมาก โดยพบว่าเมื่อวัดค่าออกซิเจนละลายในน้ำของชุดการทดลองที่เลี้ยงที่ความเค็มสูงจะเหลือออกซิเจนละลายน้ำ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตรซึ่งมีค่าน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับชุดการทดลองอื่นๆ การใช้ออกซิเจนมากขึ้นของกุ้งที่เลี้ยงที่ความเค็มสูงจะส่งผลกระทบต่อการตอบสนองของความสามารถในการปรับสมดุลของอวัยวะต่างๆและทำให้เกิดความไม่สมดุลของอิออนในร่างกาย

Samocha และคณะ (1998) ศึกษาผลของอายุต่อความต้านทานความเค็มต่ำในกุ้งขาว *Penaeus vannamei* ในระยะโพสต์ลาวา โดยเลี้ยงกุ้งโพสต์ลาวา1 และ2 ที่ความเค็ม 16.8 ส่วนในพันส่วน สำหรับกุ้งโพสต์ลาวา3 เลี้ยงที่ความเค็ม 14.3 ส่วนในพันส่วน กุ้งโพสต์ลาวา4 เลี้ยงที่ความเค็ม 10.3 ส่วนในพันส่วน กุ้งโพสต์ลาวา 5 เลี้ยงที่ความเค็ม 8.3 ส่วนในพันส่วน กุ้งโพสต์ลาวา 6 เลี้ยงที่ความเค็ม 4.5 ส่วนในพันส่วน และสำหรับกุ้งโพสต์ลาวา 7 เลี้ยงที่ความเค็ม 3.0 ส่วนในพันส่วน จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่ากุ้งจะมีความต้านทานต่อความเค็มต่ำเพิ่มขึ้นเมื่ออายุมากขึ้นโดยเพิ่มจากกุ้งระยะโพสต์ลาวา 2 จนถึง 7 นอกจากนี้ยังมีรายงานอื่นๆ ได้แก่

Charmantier และคณะ (1988) พบว่ากุ้งคุรุม่า *Penaeus japonicus* มีความสามารถในการทนต่อความเค็มต่ำเมื่ออายุเพิ่มขึ้นจากระยะโพสต์ลาวา 1 ไปจนถึงโพสต์ลาวา 6 และระดับความเค็มที่ทำให้กุ้งคุรุม่าตายเหลือ 50 เปอร์เซนต์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่ระยะ โพสต์ลาวา 1 คือ 25 ส่วนในพันส่วน และที่ระยะโพสต์ลาวา 6 คือ 7-10 ส่วนในพันส่วน นอกจากนี้ AQUACOP และคณะ (1991) อ้างโดย Samocha และคณะ (1998) ได้ทำการทดสอบความเครียดของกุ้งในระยะโพสต์ลาวา และจากการศึกษาชี้ให้เห็นว่า กุ้งในระยะโพสต์ลาวา 7 สามารถทนทานต่อความเครียดได้ดีกว่ากุ้งที่อายุอ่อนกว่าและยังเป็นอายุที่เหมาะสมสำหรับการขนส่งและการนำไปเพิ่มผลผลิต

7.3 ออกซิเจน

เนื่องจากออกซิเจนเป็นปัจจัยที่สำคัญในการดำรงชีวิตของสัตว์น้ำ และเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อขบวนการทางชีวเคมีต่างๆที่เกิดขึ้นในน้ำ ระดับออกซิเจนที่มีอยู่ในน้ำจึงมีผลกระทบโดยตรงต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำและคุณภาพน้ำซึ่งอาจมีผลต่อสิ่งมีชีวิตต่างๆในแหล่งน้ำและทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางร่างกายได้แก่ การเปลี่ยนแปลงของจำนวนเม็ดเลือด การเปลี่ยนแปลงสมดุลต่างๆในร่างกาย โดยพบว่า จากรายงานการวิจัยของ Zou และคณะ (1996) ได้ศึกษาผลของการขาดออกซิเจนที่มีต่อแลคเตทและระดับกลูโคสในเลือดของปูน้ำจืด *Eriocheir sinensis* พบว่าเมื่อให้ปูอยู่ในสภาพที่ขาดออกซิเจนจะทำให้ความเข้มข้นของแลคเตทในเลือดเพิ่มขึ้น และระดับกลูโคสก็เพิ่มขึ้นด้วย สาเหตุดังกล่าวนี้เกิดขึ้นเนื่องจาก ในสภาวะที่ขาดออกซิเจนสัตว์กลุ่ม ครัสตาเซียจะมีการเผาผลาญพลังงานแบบไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic glycolysis) ซึ่งจะทำให้ไกลโคเจนเปลี่ยนเป็นแลคเตท นอกจากนี้ Herrie (1980) อ้างโดย Zou และคณะ (1996) รายงานว่าสัตว์จะต้องใช้พลังงานอย่างมากเพื่อที่จะกำจัดแลคเตทที่สะสมอยู่ในร่างกายในภายหลัง และสาเหตุที่มีกลูโคสในเลือดสูงเกิดขึ้นเนื่องจากสัตว์จะต้องเปลี่ยนไกลโคเจนให้เป็นกลูโคสในปริมาณมากกว่าปกติเนื่องจากในการเผาผลาญพลังงานแบบไม่ใช้ออกซิเจนจะต้องใช้กลูโคสในปริมาณมากกว่าปกติเพื่อให้ได้พลังงานเพียงพอ ในขณะที่ Moullac และคณะ (1998) ศึกษาผลของสภาวะออกซิเจนต่ำต่อการเปลี่ยนแปลงของระบบภูมิคุ้มกันในกุ้ง พบว่าเมื่อให้กุ้งขาวอเมริกา (*Penaeus stylirostris*) อยู่ในสภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ (hypoxia) ที่ 1 มิลลิกรัมออกซิเจนต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำให้เกิดจำนวนเม็ดเลือดรวม (total haemocyte) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และเม็ดเลือดชนิด เซมิกรานูลาร์ (semi-granular cells : SGC) และเซลล์ไฮยาลิน (Hyalin cells : HC) มีความสามารถในสร้างซูเปอร์ออกไซด์แอนอิออนได้ลดลง นอกจากนี้เมื่อวัดกิจกรรมของเอนไซม์โปรฟีนอลออกซิเดส (prophenoloxidase activity) พบว่ามีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ

($p < 0.01$) จากนั้นเมื่อนำไปฉีดเชื้อวิบริโอ *Vibrio alginolyticus* พบว่ากลุ่มที่อยู่ในสภาพที่มีออกซิเจนปกติมีการตาย 32 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่กลุ่มที่อยู่ในน้ำที่มีออกซิเจนต่ำมีการตาย 48 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกันจากรายงานของ Direkbusarakom และ Donayadol (1998) ได้ศึกษาเกี่ยวกับผลจากระดับออกซิเจนต่ำที่มีต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ โดยกลุ่มควบคุมจะมีค่าออกซิเจนละลายน้ำ (dissolved oxygen) 6 ส่วนในล้านส่วน และกลุ่มที่ได้รับออกซิเจนต่ำจะมีค่าออกซิเจนละลายน้ำ ประมาณ 1.8 - 2 ส่วนในล้านส่วน ในระหว่างการทดลอง จะมีพีเอชอยู่ระหว่าง 7.9 - 8.1 และอุณหภูมิน้ำ 29 - 30 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บตัวอย่างเลือดมาศึกษาความสามารถในการจับกินของเม็ดเลือด (phagocytic activity) และประสิทธิภาพในการกำจัดแบคทีเรียในน้ำเลือด พบว่า ความสามารถในการจับกินของเม็ดเลือดของกลุ่มที่ได้รับออกซิเจนต่ำมีค่า 25 - 31เปอร์เซ็นต์ ต่ำกว่าในกลุ่มควบคุมซึ่งมีค่า 32 - 37 เปอร์เซ็นต์ ส่วนความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียในน้ำเลือดเป็นไปในทางเดียวกันคือ ในกลุ่มที่ได้รับออกซิเจนต่ำมีค่าต่ำกว่าในกลุ่มควบคุม 12.45 - 143.29 เปอร์เซ็นต์และอัตราการตายในกลุ่มที่ได้รับออกซิเจนต่ำคือ 17 - 37 เปอร์เซ็นต์ จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ เป็นปัจจัยที่สำคัญที่มีผลต่อสรีรวิทยา ทำให้กุ้งกุลาดำเกิดความเครียดและตายในที่สุด นอกจากนี้ยังมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำด้วย การศึกษาการจับกินสิ่งแปลกปลอมยังเป็นระบบภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ที่สำคัญใน ครัสตาเซีย ซึ่งจากผลก็แสดงให้เห็นว่า กุ้งที่ได้รับออกซิเจนต่ำ ทำให้ไปลดความสามารถของระบบภูมิคุ้มกัน จึงนำไปสู่การติดเชื้อแบคทีเรียได้ ซึ่งก็เป็นสาเหตุให้กุ้งตายในที่สุด

7.4 **พีเอช**

พีเอชของน้ำส่งผลโดยตรงต่อปริมาณและชนิดของสิ่งมีชีวิตในน้ำ การเปลี่ยนแปลงของพีเอชอาจมีสาเหตุเนื่องมาจากการผลิตและการใช้คาร์บอนไดออกไซด์ในแหล่งน้ำซึ่งเกิดจากการหายใจ การสังเคราะห์แสง รวมถึงการเน่าสลายของสารอินทรีย์ การเปลี่ยนแปลงพีเอชที่ไม่เหมาะสมจะส่งผลโดยตรงต่อสัตว์น้ำ โดยความเป็นกรดอาจทำให้เนื้อเยื่อเหงือกกุ้งถูกทำลาย พบว่าเกิดลักษณะเนื้อเยื่อตาย (necrosis) เกิดการสะสมเมลานินทำให้เห็นเป็นรอยแผลสีดำ (McVey, 1993) นอกจากนี้ยังทำให้เกิดความไม่สมดุลในกระบวนการแลกเปลี่ยนน้ำและเกลือแร่ และทำให้เลือดอยู่ในสภาวะเป็นกรด ระดับพีเอชอาจเป็นสาเหตุที่ไม่ทำให้สัตว์น้ำถึงตายแต่ก็มีผลต่อการเจริญเติบโตและความต้านทานโรคของสัตว์น้ำ

7.5 แอมโมเนีย ไนไตรท์ และไนเตรท

แอมโมเนียมีผลต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทั้งทางตรงและทางอ้อม การที่ในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำมีปริมาณแอมโมเนียเพิ่มขึ้นจะก่อให้เกิดผลคือ เป็นปุ๋ยให้กับแพลงก์ตอนพืชและพันธุ์ไม้น้ำ ซึ่งสามารถใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในการเจริญเติบโตแพร่พันธุ์ ทำให้เกิดอาหารธรรมชาติซึ่งอาจจะส่งผลให้ผลผลิตสัตว์น้ำเพิ่มขึ้น ซึ่งบางครั้งมีการเพิ่มปริมาณของแพลงก์ตอนพืชมากเกินไปจนมีผลต่อคุณภาพน้ำอื่นๆ เช่น การเปลี่ยนแปลงปริมาณออกซิเจน การเปลี่ยนแปลงพีเอชของน้ำ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อแพลงก์ตอนหนาแน่นมากๆ ตายลงและเน่าสลายก็จะทำให้น้ำขาดออกซิเจนและเกิดสารพิษชนิดต่างที่เป็นอันตรายต่อสัตว์น้ำ นอกจากนี้แอมโมเนียในปริมาณมากๆยังเป็นพิษต่อตัวสัตว์น้ำโดยตรง ซึ่งอาจจะมีผลทำให้อัตราการเจิญเติบโตและอัตราการรอดตายต่ำ หรือทำให้สัตว์น้ำตายในระยะเวลาสั้นๆหรือทำให้เกิดผลกระทบที่เกิดจากความเป็นพิษเรื้อรังอย่างอื่น แอมโมเนียที่ระดับต่ำในระดับ 0.09 มิลลิกรัม/ลิตร มีผลทำให้การเจริญเติบโตของกุ้งก้ามกรามลดลง (ยนต์, 2542)

ไนไตรท์ในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำปกติจะเป็นผลิตผลที่เกิดจากกระบวนการเปลี่ยนแปลงของแอมโมเนียในสภาพที่มีออกซิเจน หรือบางครั้งอาจเกิดจากกระบวนการเปลี่ยนแปลงของไนเตรทในสภาพขาดออกซิเจน ดังนั้นแหล่งที่มาของไนไตรท์ในสภาพปกติจึงมาจากการออกซิไดซ์แอมโมเนียและสูญเสียไปโดยการถูกออกซิไดซ์ไปเป็นไนเตรท และแหล่งที่มาในสภาพที่ขาดออกซิเจนจะได้จากการรีดิวซ์ไนเตรทและสูญเสียไปโดยถูกรีดิวซ์ต่อเป็นก๊าซไนโตรเจน ไนตรัสออกไซด์ หรือแอมโมเนีย การสะสมไนไตรท์จะเกิดขึ้นได้เมื่อแหล่งน้ำหรือบ่อมีการเน่าสลายของสารอินทรีย์และปล่อยแอมโมเนียออกมามาก ในสภาวะที่มีออกซิเจน แอมโมเนียจะถูกเปลี่ยนเป็นไนไตรท์และในกรณีที่น้ำมีพีเอชสูงกว่า8.0 ประสิทธิภาพการเปลี่ยนไนไตรท์ให้เป็นไนเตรทจะลดลงทำให้เกิดการสะสมไนไตรท์ในน้ำ ซึ่งไนไตรท์เป็นสารพิษที่เป็นพิษต่อสัตว์น้ำ ไนไตรท์จะถูกดูดซึมเข้าสู่สัตว์น้ำผ่านทางเหงือก เมื่อไนไตรท์ถูกดูดซึมเข้าไปในตัวปลาจะไปทำปฏิกิริยากับฮีโมโกลบินในเลือด ทำให้ไม่สามารถขนถ่ายออกซิเจนได้ ระดับความเข้มข้นที่ปลอดภัยต่อกุ้งกุลาดำอยู่ที่ระดับ 4.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ไนไตรท์ในระดับความเข้มข้นที่ต่ำกว่าระดับที่ทำให้สัตว์น้ำตาย จะทำให้สัตว์น้ำอ่อนแอและติดโรคได้ง่าย

จากรายงานการวิจัยของ Prosser (1991) อ้างโดย Alcaraz และคณะ(1997) พบว่าแอมโมเนียทำให้ความสามารถของกุ้งในการทนต่ออุณหภูมิที่สูงขึ้นได้น้อยลงและที่ความเข้มข้นสูงสุดของแอมโมเนียพบว่ามีอัตราการตาย 30 % การสูญเสียความสมดุลเป็นการตอบสนองที่ขึ้นอยู่กับระบบประสาท แอมโมเนียเป็นสารประกอบที่เป็นพิษต่อระบบประสาทโดยทำให้สารสื่อประสาทไม่สามารถทำงานได้ และไนไตรท์ทำให้ลดความสามารถในการทนต่ออุณหภูมิในกุ้งขาว

(*Penaens setiferus*) ไนไตรท์มีต่อการตอบสนองต่ออุณหภูมิในปลากดอเมริกัน (*Ictalurus punctatus*) เพราะเกิดการสร้าง methaemoglobin แล้วทำให้ความสามารถในการนำออกซิเจนภายไปสู่ในเนื้อเยื่อต่ำซึ่งเป็นสาเหตุของการขาดออกซิเจน(hypoxia)ในเนื่อเยื่อ ในครัสตาเซียเชื่อว่าไนไตรท์จะทำให้เกิดการสร้าง methaemocyanin ทำให้เกิดการขาดออกซิเจนในเนื้อเยื่อและทำให้กระบวนการหายใจ (respiratory metabolism) ไม่สมบูรณ์ นอกจากนี้การที่กุ้งสามารถทนต่ออุณหภูมิสูงสุดที่จุดวิกฤตมีค่าลดลง เนื่องจากเกิดการออกซิไดส์ฮีโมไซยานินและทำให้เกิดการขาดออกซิเจนในร่างกาย นอกจากนี้การเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิน้ำระหว่างการทดลองความสามารถในการทนต่ออุณหภูมิสูงสุดของกุ้ง ทำให้เพิ่มอัตราเมตาบอลิซึม และเกิดการสะสมแอมโมเนียและไนไตรท์ในน้ำก็ยิ่งทำให้เป็นพิษต่อกุ้ง