นิพนธ์ต้นฉบับ

ผลของรงควัตถุต่ออัตราการรอดและความต้านทานโรคในกุ้งกุลาดำวัยอ่อน

นพรัตน์ แท่นมาก[1] สุภฎา คีรีรัฐนิคม[2] กิจการ ศุภมาตย์[3] มะลิ บุณยรัตผลิน[4] และ อธิศักดิ์ เกลี้ยงประดิษฐ์[5]

Abstract

Tanmark, N.[1] Kiriratnikom, S.[1] Supamattaya, K.[1] Boonyaratpalin, M.[2] and Kliangpradit, A.[3]

Effect of dietary pigment on growth performance and disease resistance in black tiger shrimp post larva (*Penaeus monodon*, Fabricius)

Songklanakarin J. Sci. Technol., 2005, 27(Suppl. 1) : 45-53

Effects of dietary pigment on survival and disease (white spot syndrome virus: WSSV) resistance in black tiger shrimp post larva (*Penaeus monodon*, Fabricius) (PL15) for a 30-day period were studied. The results showed that not only was mean survival of black tiger shrimp (PL15) fed with supplementation of Lucarotene or Betatene at 125 mg/kg diet significantly higher (P<0.05) but also the body color was increased. There were no effects of dietary pigment on mean weight, percent weight gain and WSSV resistance.

[1]Department of Aquatic Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, [2]Aquatic Animal Nutrition Expert, Department of Fisheries, Kaset Klang, Bangkhen, Jatujak, Bangkok 10900, [3]BASF (Thai) Ltd. 23 Fl. Emporium Tower 622 Room 1-6 Sukumvit 24 Rd. Klongton, Klongtoey, Bangkok 10110 Thailand.

[1]วท.บ. (วาริชศาสตร์) นักวิชาการประมง ภาควิชาวาริชศาสตร์ [2]วท.ม. (วาริชศาสตร์) นักวิชาการประมง [3]Dr. rer. nat. (Aquatic animal Disease) รองศาสตราจารย์ ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112 [4]Ph.D. (Fish Nutrition) ผู้เชี่ยวชาญพิเศษด้านอาหารสัตว์น้ำ กรมประมง เกษตรกลาง บางเขน เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900 [5]วท.บ. (วิทยาศาสตร์) บ. บีเอเอสเอฟ (ไทย) จำกัด ชั้น 23 อาคารเอ็มโพเรี่ยม ทาวเวอร์ 622 ถ.สุขุมวิท 24 แขวงคลองตัน เขตคลองเตย กรุงเทพฯ 10110

Corresponding e-mail : kidchakan.s@psu.ac.th

รับต้นฉบับ 9 ตุลาคม 2545 รับลงพิมพ์ 21 เมษายน 2547

However, mean WSSV resistance of black tiger shrimp (PL15) fed diet containing Lucantin pink 50 mg/kg diet, *Spirulina* 30 g/kg diet or Betatene 125 mg/kg diet was higher than that of control.

Key words : carotenoid, growth, disease resistant, black tiger shrimp, *Penaeus monodon*

บทคัดย่อ

นพรัตน์ แท่นมาก สุภฎา คีรีรัฐนิคม กิจการ ศุภมาตย์ มะลิ บุณยรัตผลิน และ อธิศักดิ์ เกลี้ยงประดิษฐ์

ผลของรงควัตถุต่ออัตราการรอดและความต้านทานโรคในกุ้งกุลาดำวัยอ่อน

ว.สงขลานครินทร์ วทท. 2548 27(ฉบับพิเศษ 1) : 45-53

ศึกษาผลของรงควัตถุ 4 ชนิด ต่ออัตรารอดและความต้านทานโรคตัวแดงดวงขาวในลูกกุ้งกุลาดำวัยอ่อนระยะโพสต์ลาร์วา (PL15) โดยเลี้ยงลูกกุ้งในระบบน้ำไหลเวียน ให้อาหารเม็ดที่ผสมรงควัตถุต่าง ๆ 4 ชนิด คือ สูตรที่ 1 เป็นชุดควบคุมไม่ผสมรงควัตถุ สูตรที่ 2-6 ผสมรงควัตถุ โดยผสมลูแคนทินพิ้งค์ (Lucantin pink) 50 มก./กก. ผสมลูแคโรทีน (Lucarotene) 1.25 มก./กก. ผสมลูแคโรทีน (Lucarotene) 200 มก./กก. ผสมเบต้าทีน (Betatene) 125 มก./กก. และผสมสาหร่ายเกลียวทอง (*Spirulina*) 30 กรัม/กก. ตามลำดับ พบว่าลูกกุ้งที่ได้รับอาหารทดลองที่ผสมลูแคโรทีน 125 มก./กก. และที่ผสมเบต้าทีน 125 มก./กก. เป็นระยะเวลา 30 วัน มีเปอร์เซ็นต์การรอดสูงกว่าลูกกุ้งที่ได้รับอาหารทดลองที่ไม่ผสมรงควัตถุ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และมีสีเข้มกว่าลูกกุ้งที่ได้รับอาหารทดลองที่ไม่ผสมรงควัตถุ น้ำหนักเฉลี่ยและเปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติระหว่างอาหารทดลองทั้ง 6 สูตร ส่วนผลต่อความต้านทานโรคตัวแดงดวงขาวของลูกกุ้งที่ได้รับอาหารทั้ง 6 สูตร แม้ว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติแต่ค่าเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยอัตราการรอดตายหลังจากได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวของลูกกุ้งที่ได้รับอาหารผสมลูแคนทินพิ้งค์ 50 มก./กก. ผสมสาหร่ายเกลียวทอง 30 กรัม/กก. หรือผสมเบต้าทีน 125 มก./กก. มีแนวโน้มดีกว่าลูกกุ้งที่ได้รับอาหารที่ไม่ผสมรงควัตถุตามลำดับ

กุ้งกุลาดำเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย แต่ด้วยสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปส่งผลให้การเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำในปัจจุบันประสบปัญหามากมาย เช่น ปัญหาโรคระบาด ได้แก่ แบคทีเรีย ไวรัส และปรสิต ปัญหาสารพิษที่ปนเปื้อนในน้ำ รวมทั้งปัญหาทางการค้าอันเนื่องมาจากการขยายตัวของธุรกิจเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลในหลายประเทศทั่วโลก ส่งผลให้ประเทศไทยมีคู่แข่งทางการค้าเพิ่มขึ้นและมีการแข่งขันผลิตกุ้งที่มีลักษณะตรงกับความต้องการของตลาด เช่น กุ้งที่มีสีแดงเข้มเป็นที่ต้องการ ของตลาดและขายได้ราคาดีกว่ากุ้งที่มีสีอ่อนทั้งในตลาดญี่ปุ่น (Yamada *et al*., 1990) และนิวซีแลนด์ (Bird and Savage, 1990) จึงได้มีผู้ทดลองใช้รงควัตถุผสมในอาหารกุ้งเพื่อเพิ่มสีของกุ้งให้เข้มขึ้น ซึ่งพบว่ารงควัตถุช่วยเสริมสร้างสีของกุ้งคุรุม่าโตเต็มวัย (Yamada *et al*., 1990) และกุ้งกุลาดำโตเต็มวัยให้เข้มขึ้นได้ (มะลิ และคณะ, 2543) นอกจากกุ้งแล้วยังพบว่ามีการใช้ในปลาซัลมอน (Wathne *et al*., 1998) ปลาเทร้าท์ (Sommer *et al*., 1991) ปลานิล (Katsuyama and Matsuno, 1988) รวมทั้งปลาสวยงาม เช่น ปลาทองและปลาคาร์พ (Bird and Savage, 1990) และเพื่อเสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งโตเต็มวัย โดยช่วยให้ความต้านทานโรคติดเชื้อแบคทีเรียเพิ่มขึ้นได้ เนื่องจากรงควัตถุอาจเป็นตัวช่วย ป้องกันมิให้เม็ดเลือดกุ้งถูกทำลายจากอนุมูลอิสระหรืออาจช่วยในการสร้างเม็ดเลือดกุ้ง (มะลิ และคณะ, 2543) นอกจากนี้ยังช่วยให้กุ้งลดความเครียดเนื่องจากการเปลี่ยนแปลง สภาพแวดล้อมได้อีกด้วย (Chien *et al*., 2003) ในปลาเรนโบว์เทร้าท์พบว่าการเสริมรงควัตถุในอาหารทำให้ความว่องไวของซีรัมแอนติโปรติเอส (serum antiprotease) และซีรัมคอมพลีเม้นต์ (serum complement activity) เพิ่มมากขึ้น (Thomson *et al*., 1995) ส่วนผลของรงควัตถุต่อความต้านทานต่อโรคติดเชื้อที่เกิดจากไวรัส

โดยเฉพาะโรคตัวแดงดวงขาว และผลของรงควัตถุต่อกุ้งกุลาดำวัยอ่อนยังมีข้อมูลน้อยมาก ทั้งๆ ที่ระยะวัยอ่อนก็เป็นช่วงระยะเวลาที่มีความสำคัญ เพราะถ้ากุ้งวัยอ่อนมีสุขภาพดีมีระบบภูมิคุ้มกันโรคที่ดีก็จะส่งผลให้มีอัตราการรอดสูงขึ้นส่งผลให้เกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงได้ผลผลิตมากขึ้นและมีกำไรมากขึ้นในที่สุด

การวิจัยนี้ได้ศึกษาผลของรงควัตถุ 4 ชนิด ได้แก่ ลูแคนทินพิ้งค์ ลูแคโรทีน เบต้าทีน และสาหร่ายเกลียวทอง ต่ออัตราการรอด และความต้านทานโรคตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำวัยอ่อน (*Penaeus monodon*, Fabricius) ระยะโพสต์ลาวา (PL15) เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. สัตว์ทดลอง

กุ้งกุลาดำวัยอ่อนระยะโพสต์ลาร์วา (PL15) จากฟาร์มที่ไม่เคยมีประวัติการเกิดโรคนำมาตรวจการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรส (polymerase chain reaction) เมื่อไม่พบการติดเชื้อดังกล่าว ก็นำมาเลี้ยงด้วยอาหารผง ที่ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จากนั้นคัดตัวที่มีขนาดใกล้เคียงกันเพื่อนำไปใช้ทดลองในข้อ 3 และ 4 ต่อไป

2. อาหารทดลอง

สร้างสูตรอาหารทดลองจำนวน 6 สูตรให้มีระดับโปรตีนไขมันและคุณค่าทางโภชนาการอื่นๆ เท่ากันยกเว้นรงควัตถุต่างกัน คือ สูตรที่ 1 ไม่ผสมรงควัตถุ สูตรที่ 2-6 ผสมรงควัตถุซึ่งได้รับจากบริษัท BASF ในแต่ละสูตรดังนี้ สูตรที่ 2 ผสมลูแคนทินพิ้งค์ 50 มก./กก. สูตรที่ 3 ผสมลูแคโรทีน 125 มก./กก. สูตรที่ 4 ผสมลูแคโรทีน 200 มก./กก. สูตรที่ 5 ผสมเบตาทีน 125 มก./กก. และสูตรที่ 6 ผสมสาหร่ายเกลียวทอง 30 กรัม/กก. ทำการชั่งวัสดุอาหารตาม สูตรใน Table 1 ผสมและอัดเม็ด หลังจากนั้นอบแห้งในตู้อบ ที่อุณหภูมิ 60° C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และนำมาถูกับตะแกรงมุ้งลวดขนาดประมาณ 0.6 มม. ให้อาหารแตกออกเป็นเกล็ดขนาดพอเหมาะต่อการจับกินของกุ้งระยะโพสต์ลาร์วา และนำมาอบอีกครั้งจนกว่าความชื้นในอาหารต่ำกว่า 10% จากนั้นจึงเก็บใส่ถุงพลาสติกแช่ในตู้เย็นเพื่อใช้ทดลองต่อไป

3. การศึกษาผลของรงควัตถุต่อการรอดตาย

นำลูกกุ้งในข้อ 1 ที่มีน้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้น 6.1 มก. แล้วปล่อยลงเลี้ยงในถังไฟเบอร์กลาสความจุ 100 ลิตร และมีน้ำบรรจุ 85 ลิตร ถังละ 200 ตัว แบ่งเป็น 6 ชุดการทดลองตามสูตรอาหารในข้อ 2 ชุดการทดลองละ 5 ซ้ำ แต่ละชุดการทดลองมีระบบน้ำไหลเวียนไปสู่การกรองด้วยเส้นใยสังเคราะห์แล้วลงสู่ถังพักซึ่งมีระยะกักพักชลศาสตร์ (hydraulic retention times) 0.47 ชั่วโมง แล้วจึงไหลกลับสู่ถังเลี้ยง ให้อาหารวันละ 5 มื้อโดยปริมาณอาหารที่ให้จะให้เกินพอและดูดตะกอนก่อนให้อาหารมื้อต่อไป ทำการตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำทุกสัปดาห์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง วัดโดยเครื่อง พีเอชมิเตอร์ ความเค็มวัดโดยแฮนด์รีแฟรกโตมิเตอร์ ค่าความเป็นด่างทั้งหมดใช้วิธีของ APHA (1998) แอมโมเนียและไนไตรท์ใช้วิธีของ Strickland และ Parsons (1977) เมื่อครบ 30 วัน นับจำนวนกุ้งที่เหลือรอดและชั่งน้ำหนักกุ้งในแต่ละถัง เพื่อคำนวณอัตราการรอดตาย น้ำหนักเฉลี่ยและเปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (% weight gain) ของกุ้งแต่ละชุดการทดลอง รวมทั้งสังเกตความเข้มของสีกุ้งโดยการนำไป ต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที แล้วจึงเปรียบเทียบกับชุดสีมาตรฐาน (Salmo Fan)

4. การวิเคราะห์รงควัตถุ

เมื่อสิ้นสุดการทดลองนำลูกกุ้งแต่ละชุดการทดลองมาแช่แข็งโดยใช้ไนโตรเจนเหลว และทำให้แห้งโดยใช้เครื่อง freeze dry แล้วจึงนำส่งห้องปฏิบัติการของบริษัท BASF เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณรงควัตถุโดยวิธีการดังต่อไปนี้

4.1 การวิเคราะห์ปริมาณเบตาแคโรทีน (β-carotene) และ แคนทาแซนทีน (Canthaxanthin)

นำตัวอย่างบดละเอียด 1 กรัม เติม EDTA 1 กรัม ย่อยด้วยโปรเนส (pronase) 20 มก. ทริปซิน (trypsin) 50 มก. และ เปปซิน (pepsin) 50 มก. ที่ 50°C 10 นาที จึงเติม 2 : 5 : 1 ของ ethanol : cyclohexane : ethyl acetate ปริมาตร 140 มล. เขย่า 10 นาที ทำให้เกิดการแยกชั้นโดยเติมสารละลายเกลืออิ่มตัว 70 มล. แยกเฉพาะ

Table 1. Composition of diet for black tiger shrimp post larva 15 (*Penaeus monodon*, Fabricius).

Ingredient (g/kg)	Diet no.					
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
Fish meal	280	280	280	280	278	250
Shrimp head meal	100	100	100	100	100	100
Squid meal	50	50	50	50	50	50
Wheat gluten	60	60	60	60	60	60
Soybean meal	100	100	100	100	100	100
Wheat flour	200	200	200	200	200	200
Rice flour	101	100.5	99.75	99	96.75	101
Fish oil	20	20	20	20	20	20
Lecithin	20	20	20	20	20	20
Cholesterol	5	5	5	5	5	5
Vitamin-mix	3.3	3.3	3.3	3.3	3.3	3.3
Choline	3	3	3	3	3	3
Vitamin E	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Vitamin C	1	1	1	1	1	1
Mineral	40	40	40	40	40	40
BHT	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Zeolite	15	15	15	15	15	15
Lucantin Pink (10%)	0	0.5	0	0	0	0
Lucarotene (10%)	0	0	1.25	2.0	0	0
Betatene (2%)	0	0	0	0	6.25	0
Spirulina	0	0	0	0	0	30
Total	**1,000**	**1,000**	**1,000**	**1,000**	**1,000**	**1,000**

สารละลายส่วนบนออกมากรองด้วยเมมเบรนที่มีขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร แล้วจึงฉีดสารดังกล่าว 20 ไมโครลิตร เข้าสู่ระบบ High performance liquid chromatography (HPLC) ที่ใช้คอลัมน์ Lichrosorb Si 60 (Merck) ในอัตราเร็ว 0.65 มล./นาที แล้วชะ (elude) ด้วย 5 : 1 ของ cyclohexane : ethyl acetate ตรวจสอบสารด้วย UV-Vis detector (Visi-Duo, Linear Instruments Corp.) ที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร คำนวณปริมาณสารโดยเทียบกับ β-carotene และ canthaxanthin มาตรฐาน (BASF Fine Chemical Division, 1998)

4.2 การวิเคราะห์ปริมาณแอสตาแซนทีน (Astaxanthin)

นำตัวอย่างบดละเอียด 10 กรัม สกัดด้วย 2 : 5 ของ ethanol : butyl methyl ether ปริมาตร 140 มล. เขย่า 10 นาที ทำให้เกิดการแยกชั้นโดยเติมสารละลายเกลืออิ่มตัว 70 มล. แยกเฉพาะสารละลายส่วนบนออกมาระเหยด้วยโซเดียมซัลเฟต จึงเติม 86 : 14 ของ n-heptane : acetone ลงไป กรองด้วยเมมเบรนที่มีขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร แล้วจึงฉีดสารดังกล่าว 50 ไมโครลิตร เข้าสู่ระบบ HPLC ที่ใช้คอลัมน์ Lichrosorb Si 60 (Merck) แล้วชะด้วย 86 : 14 ของ n-heptane : acetone ในอัตราเร็ว 2 มล./นาที ตรวจสอบสารด้วย diode array detector ที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร คำนวณปริมาณสารโดยเทียบกับ citranaxanthin มาตรฐาน (BASF Fine Chemical Division, 1999)

5. การศึกษาผลของรงควัตถุต่อความต้านทานโรคตัวแดงดวงขาว

นำกุ้งที่มีขนาดเท่าๆ กันถังละ 20 ตัว จำนวน 3 ซ้ำของแต่ละชุดการทดลองในข้อ 1 ซึ่งได้รับอาหารทดลอง

แต่ละสูตรมาแล้วเป็นระยะเวลา 30 วัน ปล่อยลงถังชนิดเดียวกัน กับข้อ 1 แต่มีน้ำทะเลที่ผ่านการฆ่าเชื้อบรรจุถังละ 12 ลิตร เติมเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ให้ได้ความเข้มข้น 2×10^{-4} แช่ไว้ 3 ชั่วโมง แล้วจึงเติมน้ำทะเลที่ผ่านการฆ่าเชื้อจนได้ 85 ลิตร ให้อาหารทดลองเหมือนกับการทดลองในข้อ 3 ทำการบันทึกจำนวนกุ้งที่รอดตายและตักตัวที่ตายออกจนครบ 10 วัน คำนวณอัตราการรอดตายของกุ้ง ส่วนกุ้งที่ตายนำไปตรวจหาเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยวิธีปฏิกริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรส เพื่อยืนยันสาเหตุการตาย

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การศึกษาผลของรงควัตถุต่อการรอดตาย

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง พบว่าอัตราการรอดตายเฉลี่ยของกุ้งกุลาดำวัยอ่อนที่ได้รับอาหารทดลองสูตรที่ 3 มีค่าสูงที่สุดรองลงมาคือลูกกุ้งที่ได้รับอาหารทดลองสูตรที่ 5 สูตรที่ 4 สูตรที่ 6 สูตรที่ 1 และสูตรที่ 2 ตามลำดับ ชุดการทดลองที่ได้รับอาหารสูตรที่ 3 และ 5 ซึ่งผสมด้วยลูคาโรทีน 125 มก./กก. และเบต้าทีน 125 มก./กก. ตามลำดับ ทำให้กุ้งกุลาดำวัยอ่อนมีอัตรารอดสูงและมีความแตกต่างจากชุดควบคุม และชุดการทดลองอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% สำหรับกุ้งกุลาดำวัยอ่อนที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมลูแคนทินพิ้งค์ 50 มก./กก. อาหารลูแคโรทีน 200 มก./กก. หรือ ผสมสาหร่ายเกลียวทองปริมาณ 30 กรัม/กก. ให้ผลไม่แตกต่างจากชุดควบคุมที่ไม่ได้ผสมรงควัตถุ ($P>0.05$) ซึ่งมีอัตราการรอดอยู่ระหว่าง 42-55% ทั้งนี้อาจเนื่องจากระยะเวลาของการทดลองที่สั้นเกินไป ยังคงไม่เห็นความแตกต่าง Chien และ Jeng (1992) รายงานว่ากุ้งคุรุม่า (*Penaeus japonicus*) น้ำหนัก 6 กรัม ที่ได้รับอาหารเสริมรงควัตถุแอสตาแซนทีนเป็นระยะเวลา 4 เดือน มีอัตราการรอดสูงกว่ากุ้งที่ได้รับอาหารไม่มีการเสริมแอสตาแซนทีน ที่เป็นเช่นนี้ก็เพราะว่ารงควัตถุช่วยให้ปริมาณเม็ดเลือดในระบบไหลเวียนของตัวกุ้งเพิ่มสูงขึ้น (มะลิ และคณะ, 2543) ซึ่งมีส่วนช่วยให้การหายใจระดับเซลล์ของกุ้งดีขึ้น Chien และ Jeng (1992) จึงทำให้กุ้งสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้แม้ในสภาวะที่มีออกซิเจนลดต่ำลงก็ตาม เช่นเดียวกับไข่ปลาในครอบครัว ปลานิล แม่ปลาอมและฟักไข่ไว้ในปาก ซึ่ง Balon (1979) รายงานว่าไข่ปลาที่ฟักในสภาวะดังกล่าว จะมีปริมาณรงควัตถุมากกว่าไข่ปลาที่ฟักในสภาวะที่มีออกซิเจนสูงกว่า

ในส่วนของการเจริญเติบโตพบว่าน้ำหนักเฉลี่ยและเปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของกุ้งกุลาดำวัยอ่อนที่ได้รับอาหารทดลองทุกสูตรไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (Table 2) เช่นเดียวกับการศึกษาในกุ้งโตของมะลิ และคณะ (2543) ที่ศึกษาผลของแอสตาแซนทีนในกุ้งกุลาดำที่มีน้ำหนัก 1.05-1.07 กรัม รวมทั้งการศึกษาของ Yamada และคณะ (1990) ที่ศึกษาผลของแอสตาแซนทีนในกุ้งคุรุม่า (*Penaeus japonicus*) น้ำหนักเฉลี่ย 8 กรัม การศึกษาในปลาเทร้าท์ (*Oncorhynchus mykiss*) น้ำหนัก 0.1 กรัม (Sommer *et al.,* 1991) และปลาแซลมอน (*Salmo salar*) น้ำหนัก

Table 2. Effect of pigment supplemented diet on survival, growth and disease resistance in black tiger shrimp post larva (*Penaeus monodon*, Fabricius) after 4 weeks feeding.

Parameters	Experimental diets					
	1	2	3	4	5	6
Survival and growth						
- Survival (%)	53.7±9.0[a]	42.7±6.6[a]	60.2±12.4[b]	54.8±8.1[a]	57.6±12.3b	50.9±8.9[a]
- Average weight (g)	0.09±0.02[ns]	0.08±0.02[ns]	0.07±0.01[ns]	0.06±0.01[ns]	0.08±0.01[ns]	0.08±0.02[ns]
- Weight gain (%)	1403±292[ns]	1223±386[ns]	1086±1182[ns]	970±224[ns]	1137±211[ns]	1138±409[ns]
Disease resistance						
- Survival (%)	30.0±52.0[ns]	61.67±49.1[ns]	28.33±49.1[ns]	30.0±52.1[ns]	31.67±50.6[ns]	58.33±50.6[ns]

[NS] = not significant
Means not sharing a common superscript are significantly different ($P < 0.05$).

0.5 กก. (Wathne *et al*., 1998)

2. ปริมาณรงควัตถุในตัวกุ้ง

สีของกุ้งเมื่อได้รับอาหารทดลองเป็นระยะเวลา 30 วัน แม้ว่าการกระจายความเข้มสีบนลำตัวยังไม่ทั่วทั้งตัว และจะมีสีเข้มมากอยู่บริเวณส่วนท้ายของลำตัวเท่านั้น และพบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารทดลองสูตรที่ 4 ซึ่งผสมลูแคโรทีน 200 มก./กก. อาหารมีความเข้มสีสูงสุด รองลงมาคือ สูตรที่ 3 5 2 6 และสูตรที่ 1 ตามลำดับ (Figure 1) แสดงให้เห็นว่ารงควัตถุทั้ง 4 ชนิด ที่ผสมในอาหารทดลอง เมื่อกุ้งกินเข้าไปแล้วถูกดูดซึมและถูกสะสมไว้ในตัวของกุ้งได้จนสีของกุ้งต่างไปจากกุ้งที่ได้รับอาหารที่ไม่ได้ผสมรงควัตถุอย่างเห็นได้ชัด เช่นเดียวกับรงควัตถุชนิดอื่น โดยเฉพาะแอสตาแซนทีน ที่ให้ผลดีในด้านการเพิ่มสีของกุ้งกุลาดำ (มะลิ และคณะ, 2543) กุ้งคุรุม่า (Yamada *et al*., 1990) นอกจากนี้ยังรวมไปถึงปลาเทร้าท์ (Sommer *et al*., 1991) และปลาแซลมอน (Wathne *et al*., 1998) จากผลการทดลองจึงพบว่าการผสมรงควัตถุลูแคโรทีน 200 มก./กก. ให้ผลดีที่สุดในด้านการเพิ่มสีของลูกกุ้งเมื่อเปรียบเทียบกับการผสมลูแคนทีนพิงค์ 50 มก./กก. เบต้าทีน 125 มก./กก. หรือสาหร่ายเกลียวทองปริมาณ 30 กรัม/กก. อย่างไรก็ตาม หากผสมรงควัตถุลูแคโรทีน มากถึง 200 มก./กก. ก็จะทำให้อัตราการรอดของลูกกุ้งลดลง 5.4% เมื่อเปรียบเทียบกับอัตราการรอดของลูกกุ้งที่ได้รับอาหารผสมรงควัตถุลูแคโรทีน 125 มก./กก.

เมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์ปริมาณรงควัตถุในตัวกุ้ง (Table 3) เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารผสมเบต้าทีน (สูตรที่ 5) มีปริมาณแอสตาแซนทีนสูงกว่ากุ้งที่ได้รับอาหารสูตรที่ 4 อธิบายได้ว่าสีบนตัวกุ้งซึ่งปรากฏชัดบริเวณหางเป็นส่วนใหญ่ ประกอบกับกุ้งที่ได้รับอาหารทดลองสูตรที่ 4 มีน้ำหนักเฉลี่ยเมื่อสิ้นสุดการทดลองสูงกว่ากุ้งที่ได้รับอาหารทดลองสูตรที่ 5 จึงส่งผลให้ค่าความเข้มข้นของแอสตาแซนทีนในกุ้งที่ได้รับอาหารทดลองสูตรที่ 4 มีค่าน้อยกว่ากุ้งที่ได้รับอาหารทดลองสูตรที่ 5 และยังแสดงให้เห็นว่านอกจากกุ้งกุลาดำวัยอ่อนมีกลไกในการใช้แอสตาแซนทีนได้โดยตรงแล้วยังมีกลไกในการเปลี่ยนเบต้า-แคโรทีนให้เป็นแอสตาแซนทีนได้เช่นเดียวกับกุ้งคุรุม่า (Yamada, 1990) และสัตว์จำพวกครัสตาเชียนอื่นๆ (Boonyaratpalin *et al*., 2001)

Figure 1. Color of black tiger shrimp after 30 days period of feeding with dietary pigment. (T1 = control, T2-T6 = dietary pigment)
Remark : Samples was boiled 5 minute before being photographed.

Table 3. Pigment contents in shrimp.

Treatments	Pigment contents		
	Astaxanthin (ppm)	Canthaxanthin (ppm)	Carotene (ppm)
T1	31.6	0.8	-
T2	35.2	2.6	-
T3	38.3	2.9	-
T4	39.5	3.2	-
T5	44.6	2.9	-
T6	28.7	2.4	-

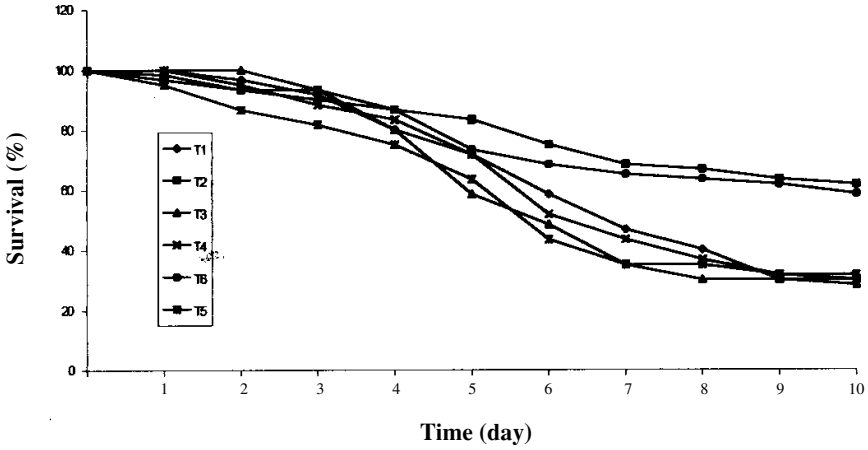

Figure 2. Mean percent survival of black tiger shrimp after 10 days period exposure by immersion to white spot syndrome virus (WSSV).

3. การศึกษาผลของรงควัตถุต่อความต้านทานโรคตัวแดงดวงขาว

ภายหลังจากแช่เชื้อ 3 วัน จำนวนกุ้งที่ตายเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ก่อนตายกุ้งมีอาการคล้ายกับกุ้งที่เป็นโรคตัวแดงดวงขาวในรายงานของ Sahul-Hameed และคณะ (1998) คือกุ้งไม่ค่อยกินอาหาร และเกาะพื้นถังเฉยๆ ไม่เคลื่อนไหว และปรากฏสีแดงตามลำตัว แพนหาง ขาเดินและขาว่ายน้ำ บางตัวสามารถมองเห็นจุดขาวบริเวณเปลือกคลุมหัวและลำตัว จนถึงวันที่ 7 กุ้งที่รอดตายบางส่วนจึงเริ่มกินอาหารได้มากขึ้น เมื่อครบ 10 วัน เปอร์เซ็นต์เฉลี่ยการรอดตายของกุ้งชุดการทดลองที่ได้รับอาหารสูตรที่ 2 มีค่ามากที่สุด รองลงมาคือกุ้งที่ได้รับอาหารทดลองสูตรที่ 6 สูตรที่ 5 ส่วนสูตรที่ 4 เท่ากับชุดควบคุม และสูตรที่ 3 เปอร์เซ็นต์เฉลี่ยการรอดของกุ้งต่ำที่สุด แม้ว่าเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยการรอดตายของกุ้งที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 6 สูตรไม่ต่างกัน (Table 2) แต่เมื่อพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยการรอดของกุ้งในแต่ละวัน (Figure 2) พบว่าตั้งแต่วันที่ 5 ของการทดลอง เปอร์เซ็นต์เฉลี่ยการรอดของกุ้งที่ได้รับอาหารทดลองสูตรที่ 2 และ 6 สูงกว่ากุ้งที่ได้รับอาหารสูตรอื่นๆ จนสิ้นสุดการทดลอง แสดงให้เห็นว่าการเสริมรงควัตถุในอาหารทดลองสูตรที่ 2 และ 6 และใช้เลี้ยงลูกกุ้งเป็นระยะเวลา 30 วัน มีแนวโน้มทำให้ลูกกุ้งทนทานต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวได้เช่นเดียวกับการใช้แอสตาแซนทีนต่อการต้านทานเชื้อแบคทีเรียเรืองแสง (*Vibrio harveyi*) ในกุ้งกุลาดำขนาด 12-15 กรัม (มะลิ และคณะ, 2543) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะกุ้งที่ได้รับอาหารเสริมรงควัตถุมีกลไกในการกำจัดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ดีกว่ากุ้งที่ได้รับอาหารชุดควบคุม ซึ่งไม่มีการผสมรงควัตถุ มะลิ และคณะ (2543)

ได้รายงานว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารเสริมรงควัตถุมีปริมาณเม็ดเลือดรวมสูงกว่ากุ้งที่ได้รับอาหารไม่ผสมรงควัตถุ ทำให้ปริมาณเม็ดเลือดในระบบไหลเวียนสูงขึ้น มีผลต่อการเพิ่มการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ นอกจากนี้รงควัตถุยังช่วยป้องกันการหืน (antioxidant action) ป้องกันมิให้องค์ประกอบของเซลล์ในตัวถูกทำลายจากอนุมูลอิสระได้อีกด้วย (Gabaudan, 1996)

3. คุณภาพน้ำ

พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่าง เปลี่ยนแปลงอยู่ระหว่าง 7.48-7.94 ความเค็มของน้ำอยู่ระหว่าง 9-12 ส่วนในพันส่วน โดยเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นเนื่องจากการระเหยของน้ำสู่บรรยากาศ ค่าความเป็นด่างทั้งหมด (total alkalinity) ลดลงอย่างต่อเนื่องหลังจากเริ่มการทดลองและมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วง 46-58 มก./ลิตร ปริมาณแอมโมเนีย และไนไตรท์ ค่อยๆ เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง อันเนื่องมาจากปฏิกริยาการย่อยสลายสารประกอบไนโตรเจนจากเศษอาหารกุ้งและมูลของกุ้งโดยแอมโมเนียอยู่ในช่วง 0.001-0.152 มก./ลิตร ส่วนไนไตรท์อยู่ในช่วง 0.033-1.83 มก./ลิตร

สรุป

อาหารกุ้งกุลาดำวัยอ่อนสามารถผสมรงควัตถุได้ สารรงควัตถุชนิดลูแคโรทีนและเบต้าทีน ราคาถูกกว่าลูแคนทินพิงค์มาก ถ้าใช้ผสมในปริมาณ 125 มก./กก. อาหารเป็นระยะเวลา 30 วัน นอกจากทำให้สีของลำตัวเข้มขึ้นแล้วยังส่งผลให้อัตราการรอดของลูกกุ้งกุลาดำวัยอ่อนสูงขึ้นอีกด้วย ในการศึกษาครั้งนี้ปริมาณของรงควัตถุในอาหารไม่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำวัยอ่อนแต่อย่างใด แต่มีแนวโน้มว่าจะทำให้เพิ่มความต้านทานต่อโรคตัวแดงดวงขาว

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องนี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก บริษัท BASF (ประเทศไทย) จำกัด

เอกสารอ้างอิง

มะลิ บุณยรัตผลิน กิจการ ศุภมาตย์ และ ชูศักดิ์ บริสุทธิ์. 2543. ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ: VIII. ผลของสารสี (astaxanthin) ต่อการเจริญเติบโต องค์ประกอบเลือด ระบบภูมิคุ้มกันโรคและความต้านทานโรคในกุ้งกุลาดำ. ว. สงขลานครินทร์ วทท. 22 (ฉบับพิเศษ): 633-639.

APHA, AWWA and WEF (APHA). 1995. Standard methods for the examination of water and wastewater. 19th ed. APHA, AWWA and WPCF. Washington D.C.

Balon, E.K. 1979. Early ontogeny of *Labeotropheus* Ahl, 1927 (Mbuna, Cichlidae, Lake Malawi), with a discussion on advanced protective styles in fish reproduction and development. Environ. Biol. Fish. 2: 147-176.

BASF Fine Chemical Division. 1999. QM-System No. 00222 QA000. MEP Analysis and Quality Control. BASF. 4 p.

BASF Fine Chemical Division. 1998. QM-System No. E106DA00. BASF Aktiengesellschaft. BASF. 9 p.

Bird, J.N. and Savage, G.P. 1990. Carotenoid pigmentation in aquaculture. Proceeding of the Nutrition Society of New Zealand. 15: 45-56.

Boonyaratpalin, M., Thongrod, S., Supamattaya, K., Britton, G. and Schlipalius, L.E. 2001. Effects of β-carotene source, *Dunaliella salina*, and-astaxanthin on pig-mentation, growth, survival and health of *Penaeus monodon*. Aquacult. Res. 32 (Suppl. 1): 182-190.

Chien, Y.H. and Jeng, S.C. 1992. Pigmentaion of kuruma prawn *Penaeus japonicus* Bate, by various pigment sources and levels and feeding regimes. Aquacult., 102: 333-346.

Chien, Y.H., Pan, C.H. and Hunter, B. 2003. The resistance to physical stresses by *Penaeus monodon* juveniles fed diets supplemented with astaxanthine. Aquacult. 216: 177-191.

Gabaudan, J. 1996. Dietary astaxanthin improves production yield in shrimp farming. Fish. Chimes. 16: 37-39.

Katsuyama, M. and Mutsuno, T. 1988. Carotenoid and vitamin A and metabolism of carotenoids, β-carotene, canthaxanthin, astaxanthin, zeaxanthin, lutein and tunaxanthin in tilapia *Tilapia nilotica*. Comp. Biochem. Phisiol. 90B: 131-139.

Sahul Hameed, A.S., Anilkumar, M., Stephen Raj, M.L. and Jayaraman, K. 1998. Studies on the pathogenicity of systemic ectodermal and mesodermal baculovirus and its detection in shrimp by immunological methods. Aquacult. 160: 31-45.

Sommer, T.R., Potts, W.T. and Morrissy, N.M. 1991. Utilization of microalgae astaxanthin by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquacult. 94: 79-88.

Strickland, J.D. and Parsons, T.R. 1977. A practical handbook of seawater analysis. Fish Res. B. of C. Bull. 167. 2nd ed. Ottawa.

Thomson, I., Choubert, G., Houlihan, D.F. and Secombes, C.J. 1995. The effect of dietary vitamin A and astaxanthin on the immunocompetence of rainbow trout. Aquacult. 133: 91-102.

Wathne, E., Bjerkeng, B., Storebakken, T., Vassvik, V. and Odland, A.B. 1998. Pigmentation of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed astaxanthin in all meals or in alternating meals. Aquacult. 159: 217-231.

Yamada, S., Tanaka, Y., Sameshima, M. and Ito, Y. 1990. Pigmentation of prawn (*Penaeus japonicus*) with carotenoids. I: Effect of dietary astaxanthin, β-carotene and canthaxanthin on pigmentation. Aquacult. 87: 323-330.