ผลของไนไตรท์ต่อการตายและการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิดของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ที่เพาะเลี้ยงในน้ำความเค็มต่ำในบ่อดินจำลอง

Effect of nitrite on mortality and innate immunity response of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) reared in low-salinity water in simulated earthen pond

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์[1] ทศพร เสียงแจ้ว[2] และ วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย[2]

Subuntith Nimrat[1] Tossaporn Siangjow[2] and Verapong Vuthiphandchai[2]

[1]ภาควิชาจุลชีววิทยาและโครงการวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี 20131

[2]ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี 20131

[1]Department of Microbiology and Environmental Science Program, Faculty of Science, Burapha University, Chon Buri, 20131

[2]Department of Aquatic Science, Faculty of Science, Burapha University, Chon Buri, 20131

Corresponding author: subunti@buu.ac.th

Received: 5 Oct. 2020

Revised: 5 Oct. 2020

Accepted: 5 Mar. 2021

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินผลของไนไตรท์ต่อการตายและการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิดของกุ้งกุลาดำระยะวัยรุ่น (*Penaeus monodon*; น้ำหนักเฉลี่ย 5.8±0.9 กรัม และความยาวเฉลี่ย 10.4±1.1 เซนติเมตร) ที่เลี้ยงในน้ำความเค็มต่ำ (10-12 พีพีที) ที่อุณหภูมิ 23-25 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.1-7.7 และปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ 5.5-7.8 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยแบ่งกุ้งกุลาดำออกเป็น 2 ชุดการทดลอง ได้แก่ ชุดควบคุม (ไม่เติมไนไตรท์) และชุดทดสอบ (เติมไนไตรท์ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร) เลี้ยงเป็นระยะเวลา 21 วัน จากการศึกษาพบว่ากุ้งกุลาดำในชุดควบคุมมีการตายสะสมต่ำกว่ากุ้งกุลาดำในชุดทดสอบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยมีการตายสะสมในวันสุดท้ายของการทดลองเท่ากับร้อยละ 28.67±5.03 และ 34.67±5.03 ตามลำดับ ไนไตรท์มีผลต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด โดยทำให้ปริมาณเม็ดเลือดทั้งหมดลดลงและกิจกรรมเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสมีแนวโน้มลดลง ในขณะที่กิจกรรมเลคตินและไลโซไซม์มีค่าสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสภาวะการเพาะเลี้ยงที่มีไนไตรท์ความเข้มข้นสูงเกินค่าที่ยอมรับได้ในการเลี้ยงกุ้งในน้ำความเค็มต่ำ (< 4.5 mg/L) มีผลทำให้การตายเพิ่มขึ้นและมีผลต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิดของกุ้งกุลาดำระยะวัยรุ่น

คำสำคัญ: กุ้งกุลาดำ, ไนไตรท์, ภูมิคุ้มกัน, ไลโซไซม์, ฟีนอลออกซิเดส

Abstract

The objective of this study was to investigate effects of nitrite on mortality and immune response of juvenile black tiger shrimp, *Penaeus monodon* (average weight = 5.8±0.9 g and average length = 10.4±1.1 cm) cultured in low-salinity water (10-12 ppt) at 23-25 ºC, pH 7.1-7.7, and dissolved oxygen 5.5-7.8 mg/mL. Black tiger shrimp were divided into 2 treatments including control (no any addition) and treated shrimp (addition of 10-mg/L nitrite solution) and cultured for 21 days. Cumulative mortality of un-treated shrimp was significantly (P<0.05) lower than that of the nitrite-treated shrimp, which were 28.67±5.03% and 34.67±5.03%, respectively, at the end of experiment. Nitrite affected innate immunity response of the shrimp observed by a decrease in total haemocyte count and phenoloxidase activity, and conversely a significant (P<0.05) increase in lectin and lysozyme activities. Our results demonstrated that culture condition with high nitrite concentration over acceptable value for shrimp cultivation in low-salinity water (>4.5 mg/L) caused an increased mortality and a suppression of the innate immune ability of juvenile black tiger shrimp.

Keywords: *Penaeus monodon*, Nitrite, Immunity, Lysozyme, Phenoloxidase

บทนำ

กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) เป็นสัตว์น้ำที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย มีการส่งเสริมการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบพัฒนาหรือแบบหนาแน่นเพื่อเพิ่มผลผลิตโดยกรมประมงมาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2516 ซึ่งเป็นการเลี้ยงที่ใช้พันธุ์กุ้งจากโรงเพาะฟักจากพ่อแม่พันธุ์กุ้งจากธรรมชาติควบคู่กับการใช้เทคโนโลยีสมัยใหม่เข้าช่วยในการจัดการบ่อเพาะเลี้ยงให้มีระบบถ่ายเทน้ำ การควบคุมอุณหภูมิและการควบคุมโรค (Department of Fisheries, 2017; Suksileung, 1995) กุ้งกุลาดำเป็นหนึ่งในสินค้ากุ้งทะเลที่สร้างรายได้จากการส่งออกให้ประเทศได้อย่างมาก รองมาจากกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ในปี พ.ศ. 2558-2560 มีผลผลิตกุ้งกุลาดำประมาณ 12,500–13,500 ตัน คิดเป็นมูลค่าประมาณ 2.9–3.3 พันล้านบาท ปัจจุบันกุ้งกุลาดำมักเพาะเลี้ยงในพื้นที่น้ำกร่อยที่มีความเค็มต่ำ เพื่อลดปัญหาจากโรคระบาด เพิ่มการเจริญเติบโตของกุ้ง การจัดการฟาร์มที่ง่ายขึ้นและการพัฒนาระบบเพาะเลี้ยงแบบผสมผสานร่วมกับการทำเกษตรกรรม อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงที่ความเค็มต่ำทำให้กุ้งมีความไวต่อพิษของสารประกอบไนโตรเจนเพิ่มมากขึ้น (Romano and Zeng, 2013; Valencia-Castaneda *et al*., 2019) ตามปกติแล้วการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่ความเค็มต่ำในบ่อที่มีเนื้อที่จำกัดและกุ้งอยู่รวมกันอย่างหนาแน่นมักก่อให้เกิดการตกค้างของเศษอาหาร ของเสียที่เกิดจากการขับถ่ายและสารอินทรีย์ที่เกิดจากการย่อยสลายในระบบเพาะเลี้ยง ของเสียเหล่านี้เปลี่ยนรูปจากสารอินทรีย์ด้วยปฏิกิริยาแอมโมนิฟิเคชัน (ammonification) และไนทริฟิเคชัน (nitrification) เป็นสารอนินทรีย์ที่มีความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำ นั่นคือ แอมโมเนียและไนไตรท์

ไนไตรท์เป็นสารตัวกลางของปฏิกิริยาไนทริฟิเคชัน สารนี้มักปรากฏอยู่ใน 2 รูป คือ ionized nitrite (NO_2^-) และ nitrous acid (HNO_2) ขึ้นอยู่กับค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำ โดยไนไตรท์ในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำส่วนมากมักอยู่ในรูป ionized nitrite (NO_2^-) (Romano and Zeng, 2013) ไนไตรท์ที่อยู่ในรูปนี้มีความเป็นพิษต่อกุ้งน้ำจืดและกุ้งทะเล ทั้งนี้ระดับความเป็นพิษของไนไตรท์ขึ้นอยู่กับระยะการเจริญเติบโตของกุ้งและปัจจัย

สิ่งแวดล้อม ได้แก่ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ ความเค็มและอุณหภูมิ (Zweig *et al.,* 1999) โดยปริมาณที่ทำให้กุ้งกุลาดำระยะนอเพลียส ซูเอีย ไมซิส โพสลาวา วัยรุ่นและวัยชำที่ได้รับสารนาน 24 ชั่วโมง ตายไปเป็นจำนวนครึ่งหนึ่ง (lethal dose at 50%; LD_{50}) มีค่าเท่ากับ 5.00, 13.20, 20.65, 61.87, 215.85 และ 218 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (Chen and Chin, 1988; Chen and Lei, 1990; Chen *et al*., 1990) และความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้กุ้งขาวระยะวัยรุ่นที่เลี้ยงที่ความเค็ม 8 พีพีที ตายทั้งหมดภายใน 20 วัน (Furtado *et al*., 2016) เมื่อระบบเพาะเลี้ยงมีการสะสมของไนไตรท์เพิ่มมากขึ้นจะทำให้ระบบหายใจของกุ้งอ่อนแอ เกิดการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารชีวโมเลกุลในน้ำเลือด เช่น โปรตีนและกรดอะมิโนอิสระ กระตุ้นให้เกิดภาวะขาดออกซิเจนในเลือด (hypoxia) การทำงานของระบบภูมิคุ้มกันอ่อนแอ ส่งผลให้กุ้งกินอาหารและเจริญเติบโตลดลง เพิ่มความไวในการติดเชื้อก่อโรคและเป็นสาเหตุการตายของกุ้งเป็นจำนวนมาก (Xian *et al*., 2011; Romano and Zeng, 2013)

ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งแบ่งออกเป็น 2 ระบบหลัก ได้แก่ ระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์ (cellular immunity) และระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด (humoral immunity) ปัจจุบันหนึ่งในวิธีการที่ได้นำมาใช้เพื่อประเมินสุขภาพกุ้งคือการศึกษาเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งในการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม การเกิดโรคและปริมาณสารประกอบไนโตรเจนในน้ำ เพื่อใช้เป็นชีวดัชนี (biomakers) ที่ช่วยให้ทราบถึงสภาวะสุขภาพของกุ้งในบ่อเพาะเลี้ยงล่วงหน้าก่อนจะเกิดการระบาดของโรคหรือการตายของกุ้งจำนวนมาก (Sukrakanchana, 2007) โดยความเป็นพิษของไนไตรท์ต่อกุ้งกุลาดำระยะต่างๆ ได้มีการศึกษามาก่อนหน้านี้แล้ว (Chen and Chin, 1988; Chen and Lei, 1990; Chen *et al*., 1990; Xian *et al*., 2011, 2012) แต่การศึกษาส่วนใหญ่เป็นการศึกษาในกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในน้ำกร่อยความเค็ม 20 ส่วนในพันส่วน (พีพีที) และน้ำทะเลในระบบที่ไม่มีดิน ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงเป็นการศึกษาถึงผลของไนไตรท์ต่อการรอดชีวิตและการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิดของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในน้ำความเค็มต่ำ (10 พีพีที) ในระบบบ่อดินจำลอง

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. การเตรียมบ่อจำลองและการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

เตรียมบ่อไฟเบอร์กลาสขนาดความกว้างxยาวxสูงเท่ากับ 75x119x45 เซนติเมตร จำนวน 6 บ่อ ที่มีระบบเติมอากาศและระบบหมุนเวียนน้ำ จากนั้นเติมดินจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำลงในบ่อที่เตรียมไว้ให้มีความหนาประมาณ 5 เซนติเมตรจากพื้นบ่อ เติมน้ำทะเลความเค็ม 10 พีพีที ให้ระดับน้ำต่ำจากขอบบ่อลงมา 5 เซนติเมตร ปล่อยกุ้งกุลาดำระยะวัยรุ่น (น้ำหนักเฉลี่ย 5.8±0.9 กรัม และความยาวเฉลี่ย 10.4±1.1 เซนติเมตร) ลงเลี้ยงในบ่อๆ ละ 50 ตัว (ความหนาแน่น 56 ตัวต่อตารางเมตร) เลี้ยงกุ้งเป็นเวลา 3 วันก่อนเริ่มต้นการทดลอง ให้อาหารเม็ดวันละ 4 มื้อ โดยกำหนดให้บ่อที่ 1-3 เป็นบ่อควบคุม (ไม่มีการเติมสารใด ๆ ลงไปในน้ำ) และบ่อที่ 4-6 เติมสารละลายโซเดียมไนไตรท์ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันเริ่มต้นการทดลองเพียงครั้งเดียว โดยสารละลายไนไตรท์เตรียมได้จากการละลายโซเดียมไนไตรท์ (Merck, Darmstadt, Germany) ในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ก่อนนำมาใช้งาน ไนไตรท์ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ถูกนำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้เนื่องจากเป็นความเข้มข้นที่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตาย ความเสียหายระดับเซลล์และกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไมและกุ้งกุลาดำได้ (Xian *et al*., 2011; Furtado *et al*., 2016)

2. การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

เก็บตัวอย่างน้ำในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำในวันเริ่มต้นการทดลอง วันที่ 7, 14 และ 21 ของการทดลอง โดยวัดคุณภาพน้ำ ได้แก่ ค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยเครื่อง pH meter (Metrohm 913, Metrohm AG, Herisau, Switzerland) ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ (dissolved oxygen) อุณหภูมิและความเค็ม โดยใช้เครื่องมือวัดคุณภาพน้ำ YSI Model 85/10 FT (YSI, Yellow Springs, OH, USA) รวมทั้งวิเคราะห์ปริมาณไนไตรท์ในน้ำด้วยเทคนิค diazotization โดยใช้สารละลายโซเดียมไนไตรท์เป็นสารละลายมาตรฐานและวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร (Strickland and Parsons, 1972)

3. การวิเคราะห์การตายสะสมของกุ้งกุลาดำ

บันทึกจำนวนกุ้งกุลาดำที่ตายในแต่ละวันจนครบระยะเวลา 21 วันของการทดลอง คำนวณการตายสะสมของกุ้งกุลาดำ (%) ในวันเริ่มต้นการทดลอง และวันที่ 7, 14 และ 21 ของการทดลอง

4. การวิเคราะห์การตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิดของกุ้งกุลาดำ

ดูดเลือดกุ้งกุลาดำจากไซนัส (ventral sinus) ด้วยเข็มฉีดยาเบอร์ 25G (Nipro hypodermic needle, Osaka, Japan) โดยสุ่มเก็บตัวอย่างเลือดจากกุ้งกุลาดำครั้งละ 10 ตัว ที่เลี้ยงทั้งในบ่อควบคุมและบ่อทดสอบ จากนั้นนับปริมาณเม็ดเลือดทั้งหมด (total haemocyte count) ด้วย haemocytometer (Boeco, Germany) และกล้องจุลทรรศน์ นำตัวอย่างเลือดกุ้งที่เหลือปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บเฉพาะน้ำเลือด (hemolymph) มาวิเคราะห์กิจกรรมเลคติน โดยทดสอบความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม (hemagglutination test) ในจานไมโครไตเตอร์ ชนิด 96 หลุม ตามวิธีการของ Tunkijjanukij *et al.* (1997) กิจกรรมไลโซไซม์ โดยทดสอบกิจกรรมไลโซไซม์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย คือ *Micrococcus lysodeiktikicus* ด้วยวิธี turbidimetric assay เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายไลโซไซม์จากไข่ขาวของไก่ ตามวิธีของ Hikima *et al.* (2003) และกิจกรรมเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสด้วยเทคนิค Spectrophotometry ตามวิธีการของ Perazzolo and Barracco (1997)

5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้แสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยเทคนิค Student's *t* test ที่ระดับนัยสำคัญ $P<0.05$ ด้วยโปรแกรม IBM statistics SPSS 15

ผลการวิจัย

1. การตายของกุ้งกุลาดำ

กุ้งกุลาดำในชุดควบคุมมีการตายสะสมอยู่ระหว่างร้อยละ 0–28.67±5.03 ซึ่งต่ำกว่ากุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในบ่อทดลองที่มีไนไตรท์สูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในบ่อทดลองที่มีไนไตรท์สูงเริ่มตายภายใน 2 ชั่วโมงของการทดลอง (ร้อยละ 13.33±3.06) จากนั้นเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนมีค่าเท่ากับร้อยละ 34.67±5.03 ในวันที่ 21 ของการทดลอง (Figure 1)

b

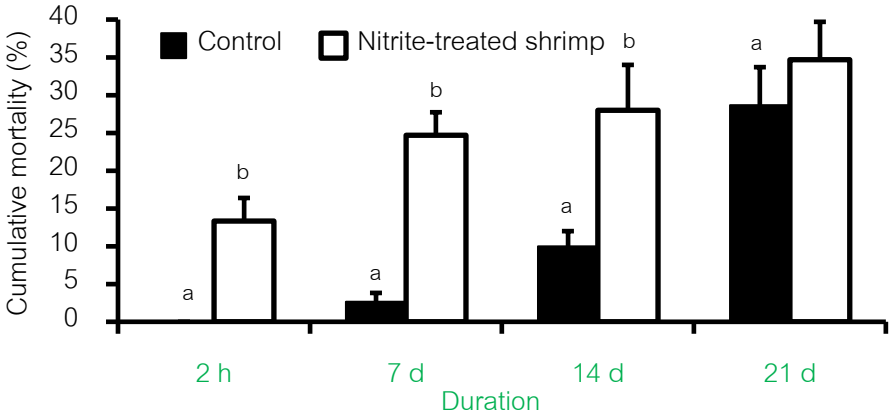

Figure 1 Cumulative mortality (%) of untreated and nitrite-treated black tiger shrimp during a 21-day culture. Superscript letters indicate significant difference (*P*<0.05) between treatments.

2. คุณภาพน้ำในการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

อุณหภูมิ ความเค็ม ค่าความเป็นกรด-ด่างและปริมาณออกซิเจนละลายน้ำมีค่าใกล้เคียงกันในแต่ละช่วงเวลาและไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*P*>0.05) ระหว่างบ่อควบคุมและบ่อทดสอบตลอดเวลาการทดลอง 21 วัน โดยอุณหภูมิมีค่าอยู่ในช่วง 23.03±0.02–25.07±0.02 และ 23.00±0.00–25.60±0.00 องศาเซลเซียส ความเค็มอยู่ในช่วง 10.33±0.54–12.00±0.00 และ 10.00±0.00–12.67±0.27 พีพีที ความเป็นกรด-ด่างมีค่าอยู่ในช่วง 7.10±0.01–7.73±0.06 และ 7.24±0.10-7.58±0.27 และปริมาณออกซิเจนละลายน้ำมีค่าอยู่ในช่วง 5.50±0.29–7.83±0.10 และ 6.67±0.24–7.82±0.39 มิลลิกรัมต่อลิตร ในบ่อควบคุมและบ่อทดสอบ ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงกุ้งทะเล (Van Wyk *et al.*, 1999)

เมื่อเติมสารละลายไนไตรท์ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในบ่อพบว่าปริมาณไนไตรท์ที่ตรวจวัดได้ภายใน 2 ชั่วโมงของการทดลอง มีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 13.16±0.14 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*P*<0.05) กับบ่อควบคุม (3.01±0.61 มิลลิกรัมต่อลิตร) จากนั้นปริมาณไนไตรท์ในบ่อทดสอบมีค่าลดลงอย่างต่อเนื่องจนมีปริมาณต่ำที่สุดในวันที่ 21 ของการทดลอง (2.26±2.93 มิลลิกรัมต่อลิตร; Figure 2a)

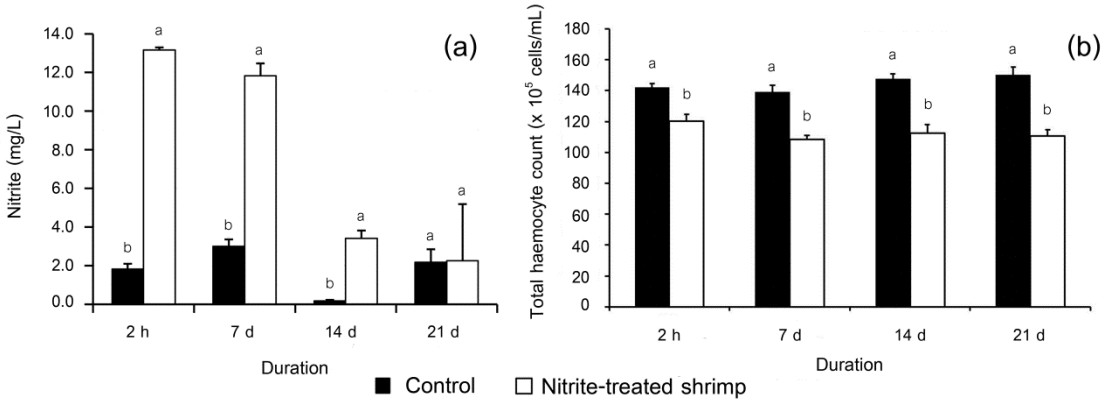

Figure 2 Concentration of nitrite in culture water (a) and total haemocyte count (b) of untreated and nitrite-treated black tiger shrimp during a 21-day trial. Bars with letters indicate significant difference (*P*<0.05) between treatments.

3. ผลของไนไตรท์ต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิดของกุ้งกุลาดำ

ปริมาณเม็ดเลือดทั้งหมดของกุ้งกุลาดำในชุดควบคุมค่อนข้างคงที่อยู่ระหว่าง 138.8±4.6–150.0±5.1x 10^5 cells/mL ในขณะที่กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในบ่อทดลองที่มีไนไตรท์สูงมีปริมาณเม็ดเลือดทั้งหมดลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*P*<0.05) ตลอดระยะเวลา 21 วันของการทดลอง โดยมีค่าเท่ากับ 108.5±2.6 – 120.5±4.3 x10^5 cells/mL (Figure 2b)

ความสามารถของเลคตินที่ทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในบ่อทดลองที่มีไนไตรท์สูงในวันแรกของการทดลองมีค่าเท่ากับ 3,584.00±2,346.28 ไตเตอร์ และเพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 7 ของการทดลอง (10,240.00± 886.81 ไตเตอร์) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*P*<0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (Figure 3a) หลังจากนั้นในวันที่ 14 ของการทดลองกิจกรรมเลคตินมีค่าลดลงเท่ากับ 512.00±221.7 ไตเตอร์ จนกระทั่งตรวจไม่พบในวันสุดท้ายของการทดลอง

กิจกรรมไลโซไซม์ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในบ่อทดลองที่เติมไนไตรท์มีค่าสูงสุดในวันแรกของการทดลอง (0.0091±0.0037 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อนาที) ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*P*<0.05) กับชุดควบคุม (Figure 3b) จากนั้นกิจกรรมไลโซไซม์ของกุ้งกุลาดำในบ่อที่เติมไนไตรท์มีค่าลดลงอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งตรวจไม่พบในที่สุด ในขณะที่กิจกรรมไลโซไซม์ในบ่อควบคุมมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*P*<0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งกุลาดำในบ่อที่เติมไนไตรท์

กิจกรรมเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในกุ้งกุลาดำในบ่อควบคุมและบ่อที่เติมไนไตรท์มีค่าใกล้เคียงกันในวันเริ่มต้นจนถึงวันที่ 14 ของการทดลอง (Figure 3c) กิจกรรมเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสของชุดควบคุมมีค่าสูงสุด (0.0114± 0.0015 หน่วยต่อนาที) ในวันที่ 21 ของการทดลอง ในขณะที่กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในบ่อทดลองที่มีไนไตรท์สูงตรวจไม่พบกิจกรรมเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส

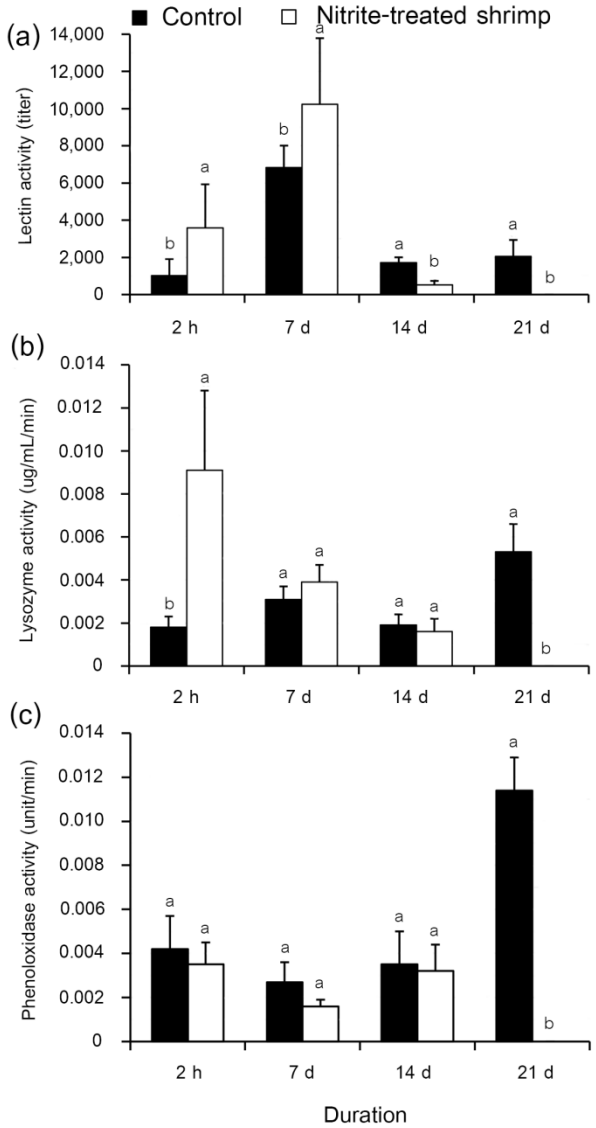

Figure 3 Activities of lectin (a), lysozyme (b) and phenoloxidase (c) of untreated and nitrite-treated black tiger shrimp during a 21-day trial. Bars with letters indicate significant difference ($P<0.05$) between treatments.

วิจารณ์ผล

การศึกษาในครั้งนี้ชี้ให้เห็นได้ว่าการตายสะสมของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในบ่อทดลองที่มีไนไตรท์สูงเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 7 วันแรกของการทดลอง ทั้งนี้น่าจะเกิดจากความเป็นพิษของไนไตรท์ เนื่องจากในช่วงเวลาดังกล่าวไนไตรท์ในน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งกุลาดำมีปริมาณสูง (>10 มิลลิกรัมต่อลิตร) ความเป็นพิษของไนไตรท์ต่อการเจริญเติบโตและการรอดชีวิตของกุ้งทะเลได้มีการศึกษาอย่างกว้างขวางก่อนหน้านี้ โดยไนไตรท์มีปริมาณ (dose) ที่ทำให้กุ้งกุลาดำระยะนอเพลียส ซูเอีย ไมซิสและโพสลาวาที่เลี้ยงในน้ำทะเลและได้รับสารนาน 24 ชั่วโมง ตายไปเป็นจำนวนครึ่งหนึ่ง (lethal dose at 50%; LD_{50}) เท่ากับ 5.00, 13.20, 20.65 และ 61.87 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (Chen and Chin, 1988) ส่วนกุ้งกุลาดำระยะวัยรุ่นที่เลี้ยงที่ความเค็ม 20 พีพีที และอุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส มีค่า LD_{50} เท่ากับ 218 มิลลิกรัมต่อลิตร (Chen *et al*., 1990) และกุ้งขาวที่เลี้ยงที่ความเค็ม 8

พีพีที พบว่าไนไตรท์ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้กุ้งทั้งหมดตาย (Furtado *et al*., 2016) ตามปกติแล้วไนไตรท์เป็นสารที่ขัดขวางการขนส่งก๊าซออกซิเจนระหว่างเซลล์ โดยเข้าไปจับฮีโมไซยานิน (hemocyanin) เปลี่ยนเป็นเมทธีโมไซยานิน (methemocyanin) หรือดีออกซีฮีโมไซยานิน (deoxyhemocyanin) ซึ่งไม่สามารถลำเลียงก๊าซออกซิเจนไปยังอวัยวะต่างๆ ได้ ทำให้ปริมาณ hemolymph oxyhemocyanin และโปรตีนในเลือดลดลง ส่งผลให้เกิดภาวะขาดออกซิเจนและกุ้งตายในที่สุด (Romano and Zeng, 2013; Furtado *et al*., 2016) โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเลี้ยงกุ้งในน้ำความเค็มต่ำเช่นเดียวกับการศึกษาครั้งนี้จะทำให้ความเป็นพิษของไนไตรท์เพิ่มขึ้น เนื่องจากการแข่งขันระหว่างไนไตรท์และคลอไรด์ไอออนเพื่อเข้าไปภายในเซลล์โดยผ่านช่องขนส่ง (ion transport channel) เดียวกัน คือ HCO_3^-/Cl^- exchanger ที่อยู่บริเวณเซลล์เหงือก ในน้ำทะเลความเค็มต่ำไนไตรท์จะถูกลำเลียงเข้าสู่เซลล์ได้มากขึ้นเนื่องจากมีความเข้มข้นของคลอไรด์ไอออนต่ำ (Tomasso, 2012) ไนไตรท์ความเข้มข้นสูงยังสร้างความเสียหายต่อเซลล์เหงือกกุ้ง เนื่องจากเหงือกเป็นอวัยวะที่สัมผัสกับน้ำตลอดเวลา Dutra *et al*. (2017) ได้รายงานว่าไนไตรท์ความเข้มข้น 8 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลทำให้เกิดความผิดปกติของการไหลเวียนเลือดและโครงสร้างเหงือกของกุ้งก้ามกรามอะเมซอน (*Macrobrachium amazonicum*) ได้แก่ การเพิ่มจำนวนการหนาขึ้นและบวมของเซลล์เยื่อบุ การรวมกันของเส้นเหงือกและการตายของเนื้อเยื่อเซลล์เหงือก เป็นต้น ความเสียหายของโครงสร้างเหงือกเหล่านี้ส่งผลให้เนื้อเยื่อและอวัยวะต่างๆ เกิดสภาวะขาดออกซิเจน และมีผลต่อการควบคุมปริมาณน้ำในเลือด การรักษาสมดุลความเป็นกรด-ด่าง การแลกเปลี่ยนก๊าซ การขับแอมโมเนียและทำให้ระบบภูมิคุ้มกันอ่อนแอ และในกรณีรุนแรงสามารถทำให้กุ้งตายได้ (Romano and Zeng, 2013; Dutra *et al*., 2017) นอกจากนี้ไนไตรท์ความเข้มข้นสูงยังทำให้เกิดความเสียหายในระดับจุลพยาธิวิทยา ได้แก่ การบวมของเซลล์ การเกิดช่องว่างภายในไซโตพลาสซึมและการตายของเซลล์ลำไส้และ hepatopancreas ของกุ้งทะเล (Wu *et al*., 1999) ดังนั้นผลของไนไตรท์ต่อโครงสร้างเหงือกและระบบทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในน้ำความเค็มต่ำจึงควรมีการศึกษาต่อไปในอนาคต

จากการวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียซึ่งเป็นสารที่มีความเป็นพิษต่อกุ้งในน้ำของทั้ง 2 ชุดการทดลอง พบว่าแอมโมเนียมีค่าสูงกว่าค่าปลอดภัย (safe concentration; <0.13 มิลลิกรัมต่อลิตร; Zweig *et al*., 1999) สำหรับกุ้งกุลาดำตลอดระยะเวลาการทดลอง (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ทั้งนี้อาจเกิดจากการเปลี่ยนเศษอาหารตกค้างและสารอินทรีย์ในบ่อไปเป็นแอมโมเนียด้วยปฏิกิริยาแอมโมนิฟิเคชันโดยอาศัยกิจกรรมของแบคทีเรียที่อยู่ในระบบเพาะเลี้ยง ส่งผลให้อัตราการตายสะสมของกุ้งกุลาดำในชุดควบคุมค่อนข้างสูง แต่ยังน้อยกว่ากุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในบ่อทดลองที่มีไนไตรท์สูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ทั้งๆ ที่แอมโมเนียของทั้ง 2 ชุดการทดลองมีปริมาณสูงเช่นเดียวกัน ผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าไนไตรท์มีผลต่อการรอดชีวิตของกุ้งกุลาดำที่เพาะเลี้ยงในน้ำความเค็มต่ำ

ไนไตรท์เป็นสารประกอบไนโตรเจนที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการเมแทบอลิซึมของสัตว์หลายชนิดและเป็นแหล่งสะสม (storage pool) ของไนตริกออกไซด์ที่ใหญ่ที่สุด โดยไนตริกออกไซด์จัดเป็นสารที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิดของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังและสัตว์มีกระดูกสันหลัง (Liao *et al*., 2012) ดังนั้นจึงมีความน่าสนใจเป็นอย่างยิ่งในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างไนไตรท์กับการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิดของกุ้งทะเล เนื่องจากกุ้งทะเลเป็นสัตว์น้ำที่ได้รับอิทธิพลของไนไตรท์จากน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงอยู่เป็นประจำ ตามปกติแล้วการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันที่สำคัญกลไกหนึ่งของสัตว์น้ำกลุ่มครัสเตเชียนคือ การผลิตเซลล์

เม็ดเลือดเข้าสู่น้ำเลือด เซลล์เม็ดเลือดมีบทบาทสำคัญต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน เช่น การแข็งตัวของเลือด (coagulation) กระบวนการกลืนทำลาย (phagocytosis) กระบวนการห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอม (encapsulation) และการผลิตเม็ดสีเมลานินของระบบโพรฟีนอลออกซิเดส (Xian *et al*., 2012) การศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าไนไตรท์มีผลทำให้ปริมาณเม็ดเลือดทั้งหมดของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในน้ำความเค็มต่ำลดลงอย่างมีนัยสำคัญ สอดคล้องกับการศึกษาของ Xian *et al*. (2011) ที่พบการลดลงของเม็ดเลือดทั้งหมดในกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในน้ำทะเลความเค็ม 20 พีพีทีและได้รับไนไตรท์ความเข้มข้น 10-20 มิลลิกรัมต่อลิตร การเพาะเลี้ยงในน้ำที่มีไนไตรท์สูงยังเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) การผลิตอนุมูลอิสระออกซิเจน (reactive oxygen species) และไนตริกออกไซด์มากเกินไป ความเสียหายต่อดีเอ็นเอและการตายของเซลล์เม็ดเลือด ส่งผลต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันและสุขภาพของกุ้งอ่อนแอ (Xian *et al*., 2011, 2012) กลไกเหล่านี้อาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในน้ำความเค็มต่ำและเติมไนไตรท์ในการศึกษาครั้งนี้มีการตายสะสมสูงกว่ากุ้งกุลาดำในชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งควรมีการศึกษากลไกเหล่านี้ต่อไป

การศึกษาในครั้งนี้ยังพบว่าไนไตรท์ทำให้กิจกรรมเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสมีแนวโน้มลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม สอดคล้องกับการศึกษาในกุ้งขาว (*L. vannamei*) ที่พบการลดลงของกิจกรรมเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสเช่นเดียวกันหลังได้รับไนไตรท์ความเข้มข้นสูงกว่า 4.9 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันและสุขภาพกุ้งอ่อนแอลง (Tseng and Chen, 2004) การลดลงของกิจกรรมเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในการศึกษาครั้งนี้อาจเกิดจากการลดลงของปริมาณเม็ดเลือดทั้งหมด เนื่องจากเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสเป็นเอนไซม์ในระบบโพรฟีนอลออกซิเดสที่ต้องอาศัยการทำงานของเซลล์เม็ดเลือด ไนไตรท์ยังส่งผลให้การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด ได้แก่ กิจกรรมเลคตินและกิจกรรมไลโซไซม์ในเลือดของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในน้ำความเค็มต่ำในการศึกษาครั้งนี้มีค่าสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในช่วง 7 วันแรกของการทดลอง ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่ตรวจพบไนไตรท์ในปริมาณสูง (>10 มิลลิกรัมต่อลิตร) การศึกษาก่อนหน้านี้ชี้ให้เห็นว่าการได้รับไนไตรท์ปริมาณสูงทำให้กุ้งขาวจีน (*Fenneropenaeus chinensis*) มีกิจกรรมเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสและไลโซไซม์ลดลง (Wu *et al*., 1999) นอกจากนี้ไนไตรท์ยังมีผลต่อกิจกรรมเอนไซม์อื่นๆ อีกด้วย เช่น เอนไซม์คะตาเลสและปริมาณมาลอนไดแอลดีไฮด์ (malondialdehyde) เป็นต้น (Liao *et al*., 2012)

จากผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าไนไตรท์มีผลทำให้อัตราการตายเพิ่มสูงขึ้นและมีผลต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิดของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในน้ำความเค็มต่ำ ดังนั้นระบบการเพาะเลี้ยงกุ้งจึงควรมีการจัดการที่มีประสิทธิภาพ สามารถลดปริมาณสารประกอบไนโตรเจนในระบบ เช่น การปรับความหนาแน่นกุ้งให้เหมาะสม การปรับปริมาณอาหารเพื่อลดของเสียเหลือทิ้ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งเศษอาหารและโปรตีน และการกำจัดสารอินทรีย์ภายในบ่อเป็นประจำ เป็นต้น รวมถึงการเติมโพรไบโอติกที่มีความสามารถในการย่อยสลายแอมโมเนียและไนไตรท์ในน้ำเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดสารประกอบไนโตรเจนและส่งเสริมสุขภาพของกุ้งกุลาดำ

สรุปผล

ไนไตรท์ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าปริมาณไนไตรท์ที่ยอมรับได้ (<4.5 mg/L) ในการเพาะเลี้ยงกุ้งในน้ำความเค็มต่ำมีผลทำให้อัตราการตายของกุ้งกุลาดำเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) และไนไตรท์ยังมีผลต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิดของกุ้งกุลาดำ โดยทำให้ปริมาณเม็ดเลือดทั้งหมดและกิจกรรมเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสลดลง และทำให้กิจกรรมของเลคตินและเอนไซม์ไลโซไซม์ในเลือดมีค่าสูงขึ้น

เอกสารอ้างอิง

Chen, J.C., and Chin, T.S. 1988. Acute toxicity of nitrite to tiger prawn, *Penaeus monodon*, larvae. Aquaculture 69: 253-262.

Chen, J.C. and Lei, S.C. 1990. Toxicity of ammonia and nitrite to *Penueus monodon* juveniles. J. World Aquac. Soc. 21: 300-306.

Chen, J.C., Liu, P.C., and Lei, S.C. 1990. Toxicities of ammonia and nitrite to *Penaeus monodon* adolescents. Aquaculture 89: 127-137.

Department of Fisheries. 2017. Statistics of marine shrimp culture 2015. Department of Fisheries Ministry of Agriculture and Cooperatives, Bangkok, Thailand. [in Thai]

Dutra, F.M., Rönnau, M., Sponchiado, D., Forneck, S.C., Freire, C.A., and Ballester, E.L.C. 2017. Histological alterations in gills of *Macrobrachium amazonicum* juveniles exposed to ammonia and nitrite. Aquat. Toxicol. 187: 115-123.

Furtado, P.S., Valenzuela, M.A.J., Fuentes, G.R., Campos, B.R., Wasielesky Jr., W., and Gaxiola G. 2016. Chronic effect of nitrite on the rearing of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* in two salinities. Mar. Freshw. Behav. Physiol. 49: 201-211.

Hikima, S., Hikima, J.I., Rojtinnakorn, J., Hirono, I., and Aoki, T. 2003. Characterization and function of kuruma shrimp lysozyme possessing lytic activity against *Vibrio* species. Gene 316: 87-195.

Liao, S., Li, Q., Wang, A., Xian, J., Chen, X., Gou, N., Zhang, S., Wang, L., and Xu, X. 2012. Effect of nitrite on immunity of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* at low temperature and low salinity. Ecotoxicology 21: 1603-1608.

Perazzolo, L.M., and Barracco, M.A. 1997. The prophenoloxidase activating system of the shrimp *Penaeus paulensis* and associated factors. Dev. Comp. Immunol. 21: 385-395.

Romano, N., and Zeng, C. 2013. Toxic effects of ammonia, nitrite, and nitrate to decapod crustaceans: a review on factors influencing their toxicity, physiological consequences, and coping mechanisms. Rev. Fish. Sci. 21: 1-21.

Strickland, J.D.H., Parsons, T.R., and Parsons, T.R. 1972. A manual of seawater analysis. Bulletin of the Fisheries Research Board, Ottawa, Canada.

Sukrakanchana, N. 2007. Effects of some environmental changes and infections on haemato-immunological parameters of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Thaksin University Journal 10(1): 34-46. [in Thai]

Suksileung, S. 1995. Aquaculture. Bangkok Supplementary Media Center, Bangkok. [in Thai]

Tomasso, J.R. 2012. Environmental nitrite and aquaculture: a perspective. Aquac. Int. 20: 1107-1116.

Tseng, I.T., and Chen, J.C. 2004. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under nitrite stress. Fish Shellfish Immunol. 17: 325-333.

Tunkijjanukij, S., Mikkelsen, H.V., and Olafsen, J.A. 1997. A heterogeneous sialic acid-binding lectin with affinity for bacterial LPS from horse mussel (*Modiolus modiolus*) hemolymph. Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol. 117: 273-286.

Valencia-Castaneda, G., Frias-Espericueta, M.G., Vanegas-Perez R.C., Chavez-Sanchez, M.C., and Paez-Osuna, F. 2019. Toxicity of ammonia, nitrite and nitrate to *Litopenaeus vannamei* juveniles in low-salinity water in single and ternary exposure experiments and their environmental implications. Environ. Toxicol. Pharmacol. 70: 103193.

Van Wyk, P., Davis-Hodgkins, M., Laramore, R., Main K.L., Mountain, J., and Scarpa, J. 1999. Farming marine shrimp in recirculating freshwater systems. Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Harbor Branch Oceanographic Institution, Tallahassee, Florida, USA.

Wu, Z.H., Liu, C.B., Liu, C.R., Wang, J.X., and Zhang, H.W. 1999. Histopathological research on chronic poisoning of *Penaeus chinensis* by nitrite and ammonia. J. Central China Normal Univ. 33: 119-122.

Xian, J.A., Wang, A.L., Chen, X.D., Gou, N.N., Miao, Y.T., Liao, S.A., and Ye, C.X. 2011. Cytotoxicity of nitrite on haemocytes of the tiger shrimp, *Penaeus monodon*, using flow cytometric analysis. Aquaculture 317: 240-244.

Xian, J.A., Wang, A.L., Hao, X.M., Miao, Y.T., Li, B., Ye, C.X., and Liao, S.A. 2012. *In vitro* toxicity of nitrite on haemocytes of the tiger shrimp, *Penaeus monodon*, using flow cytometric analysis. Comp. Biochem. Physiol. C 156: 75-79.

Zweig, R.D., Morton, J.D., and Stewart, M.M. 1999. Source water quality for aquaculture: a guide for assessment. World Bank, Washington D.C., USA. 62 p.