บทที่ 5
อภิปรายและสรุปผล

แบคทีเรียแกรมลบที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้สามารถจำแนกชนิดเป็น *Vibrio ginolyticus* (Shewan and Veron, 1974, Bergey's manual of determination,8th) อแบคทีเรียเจริญบนอาหารวุ้นซื่อ TCBS จะสร้างโคโลนีสีเหลือง ซึ่งเป็นชนิดที่เกิด ษรุนแรงน้อยกับสัตว์น้ำเรียกว่า non pathogenic (ข่าวกุ้ง 2540) และตลอดการ เลองครั้งนี้ การฉีดและแช่กุ้งด้วยแบคทีเรีย กุ้งกุลาดำมีอัตราการรอดตาย 98 % คุณ บัติของแบคทีเรียในการเจริญบนอาหารวุ้นที่มีเกลือแกงพบว่า แบคทีเรียสามารถ ทน นและเจริญในอาหารที่มีเกลือแกงปนในความเข้มข้นกว้างช่วง 1-10 % แต่ไม่ มารถเจริญเมื่อไม่มีเกลือแกงในอาหารเลย ซึ่งเป็นลักษณะของแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* องการเกลือแกงในการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในปริมาณ 2 % (Buxton and ser, 1977)

เม็ดเลือดกุ้งกุลาดำสามารถจำแนกออกเป็นสามชนิดคือ Hyaline cell (HY), all granule hemocyte (SGH) ที่มีแกรนูลขนาดเล็กและ Large granule nocyte (LGH) ที่มีแกรนูลขนาดใหญ่ ความแตกต่างในการจัดจำแนกชนิดในการ เลองครั้งนี้ ใช้การย้อมสี Haemalum-Eosin แล้วจำแนกความแตกต่างลักษณะทาง phology ของเม็ดเลือดดังนี้ ขนาดของเม็ดเลือดและนิวเคลียส ขนาดและการติดสี แกรนูลการมีและไม่มีแกรนูลการมี pseudopodia และ inclusion body ในการ นกชนิดของเม็ดเลือดของรายงานอื่นๆ ได้ใช้เทคนิคด้านอื่นประกอบพิจารณาร่วม cytochemical and functional criteria (Hose and Martin, 1989; Hose et al, 2; Tsing et al, 1989; Le Moullac et al, 1997) และการใช้ความจำเพาะของ noclonal antibody ในการจำแนกคุณสมบัติ antigenic and function racteristics ของเม็ดเลือด (Bachere et al, 1995) ผลการจำแนกชนิดของเม็ด กุ้งกุลาดำของการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับรายงานอื่น ที่จำแนกกลุ่มเม็ดเลือด ulocyte คือ SGH และ LGH ในกุ้ง *P. japonicus* และ *P. monodon* (Tsing et al,) และในกุ้ง *P. stylirostris* (Le Moullac et al, 1997)) และในกุ้ง *S. ingentis* กุ้ง *P. califoriensis* (Martin and Graves, 1985) โดยทุกรายงานจะใช้ความแตก

ต่างขนาดของแกรนูลในการจำแนก ส่วนเม็ดเลือดชนิด HY มีความแตกต่างในการใช้ชื่อและคุณสมบัติในการจำแนก ในรายงานของ Tsing et al (1989) ได้ใช้ชื่อ Undifferential hemocyte (UH) อันเนื่องจากการไม่มีแกรนูลเมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา แต่ถ้าส่องด้วยกล้อง electron microscopy พบว่าส่วนน้อยของเม็ดเลือดที่ไม่มีแกรนูลในกุ้ง *P. japonicus* และ *P. monodon* และยังได้รายงานเพิ่มเติมอีกว่าเม็ดเลือด UH ไม่สามารถตรวจพบในกุ้ง *P. aspersus* และกุ้งก้ามกราม เมื่อส่องดูด้วยกล้อง electron microscopy แต่สามารถพบได้ถ้าส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา

ค่าเฉลี่ย Total hemocyte counts (THC) ของเม็ดเลือดได้ถูกใช้ในการเปรียบเทียบความสัมพันธ์กับการลอกคราบและหลังการติดเชื้อแบคทีเรีย *V. alginolyticus* กับกุ้งปกติ(กลุ่มควบคุมฉีดด้วยน้ำเกลือ) ผลการทดลองพบว่าค่าเฉลี่ยของ THC ในกุ้งกุลาดำของการทดลองครั้งนี้มีค่า 26.6 ล้านเซลล์ต่อมิลลิลิตร (SD= 11.2 ล้านเซลล์ต่อมิลลิลิตร) จากกุ้งกุลาดำตัวอย่าง 77 ตัว ซึ่งค่า THC มีค่าใกล้เคียงกับ Penaieds ในรายงานอื่นๆดังนี้ จากกุ้ง *L. stylirostris* ค่าของ THC เท่ากับ 27.4 ล้านเซลล์ต่อมิลลิลิตร (SD= 9.3 ล้านเซลล์ต่อมิลลิลิตร) จากจำนวนกุ้ง 97 ตัว (Goarant and Boglio, 2000) จากกุ้ง *S. ingentis* ค่าของ THC เท่ากับ 27.0 ล้านเซลล์ต่อมิลลิลิตร จากจำนวนกุ้ง 34 ตัว((Martin et al, 1993) จากกุ้งกุลาดำ ค่าของ THC เท่ากับ 23.3 ล้านเซลล์ต่อมิลลิลิตร (SD=1.4 ล้านเซลล์ต่อมิลลิลิตร) เมื่อนับด้วย Haemocytometer และเมื่อนับด้วย The Cell-Dyn 3000 Flow Cytometer ค่าของ THC เท่ากับ 21.0 ล้านเซลล์ต่อมิลลิลิตร (SD= 0.79 ล้านเซลล์ต่อมิลลิลิตร) จากจำนวนกุ้ง 40 ตัว (Owens and O'Neill, 1997) สำหรับความสัมพันธ์ของระยะการลอกคราบของกุ้งกุลาดำกับค่า THC ของการทดลองครั้งนี้มีความผันแปรตามระยะของคราบ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Le Moullac et al (1997) ศึกษาในกุ้ง *P. stylirostris* พบว่าระยะคราบช่วง intermolt (Stage C) มีค่า THC ต่ำกว่าระยะคราบช่วง postmolt (Stage B) และระยะคราบช่วง premolt (Stages D0 D1 D2) การปลดปล่อยของเม็ดเลือดจากอวัยวะผลิตเม็ดเลือดในระหว่างระยะการลอกคราบของกุ้ง *S. ingentis* โดยศึกษาอัตราการแบ่งตัว (Mitotic rates) ของ Haematopoietic stem cells ในอวัยวะผลิตเม็ดเลือดซึ่งพบว่าชนิดของเม็ดเลือดและปริมาณที่ถูกผลิตและมีการปลด ปล่อยออกสู่กระแสเลือดมีความ

พันธ์กับกิจกรรมของอวัยวะผลิตเม็ดเลือดและหน้าที่ของเม็ดเลือดชนิดนั้นๆ (Martin al, 1993)

ปริมาณเม็ดเลือดในกระแสเลือดของกุ้งกุลาดำมีความผันแปรหลังการทำให้เกิด ิดเชื้อ *V. alginolyticus* การลดลงของค่า THC ถูกสังเกตได้รวดเร็วเมื่อสุ่มตัวอย่าง เดกุ้งที่ 6 ชั่วโมงหลังการฉีดแบคทีเรียเข้าร่างกาย ส่วนการแช่กุ้งในน้ำที่มีแบคทีเรีย THC ก็ลดลงเช่นเดียวกันเมื่อสุ่มตัวอย่างเลือดกุ้งที่ 1 วัน การลดลงของปริมาณเม็ด ดมีสาเหตุเป็นไปได้ว่าเมื่อกุ้งเกิดบาดแผลจากการฉีด เม็ดเลือดจะมาสะสมล้อม บริเวณบาดแผลเพื่อหยุดยั้งการไหลของเลือดออกจากร่างกาย ทั้งต้องทำหน้าที่ใน กินสิ่งแปลกปลอมไม่ว่าจะเป็นแบคทีเรียที่มีชีวิตหรือตายซึ่งเรียกว่า Phagocytosis cuchau and Mengeot, 1978; Ratchiffe and Rowley, 1979; Martin et al, 3; Goarant and Boglio, 2000) นอกจากบริเวณบาดแผลที่เกิดการติดเชื้อแล้ว มี งานว่าเม็ดเลือดกำจัดสิ่งแปลกปลอมออกสู่นอกร่างการทางเหงือก แต่อวัยวะ ective gland ไม่มีส่วนเกี่ยวข้อง(Martin et al, 1993) ดังนั้นเม็ดเลือดกุ้งในกระแส ดจึงลดลงเพราะเม็ดเลือดส่วนใหญ่จะไปอยู่ที่เนื้อเยื่อบาดแผลและเนื้อเยื่อเหงือก าเมื่อสุ่มตัวอย่างเลือดกุ้งในวันที่ 2 พบว่าค่า THC กลับมามีปริมาณปกติก่อนการ ชื้อและใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม ซึ่งแสดงว่าการรักษาบาดแผลและกำจัดสิ่งแปลก มบางส่วนได้ประสบความสำเร็จ ระยะเวลาที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณเม็ดเลือดสู่ ปกติมีความแตกต่างกันไป จากการทดลองในกุ้ง *S. ingentis* จะใช้เวลา 72-96 ง (Martin et al, 1993) และในกุ้ง *L. stylirostris* จะใช้เวลา 4 วัน (Goarant and io, 2000) ต่อมาเมื่อสุ่มตัวอย่างเลือดกุ้งกุลาดำในวันที่ 3 และวันที่ 6 พบว่าค่า ในกลุ่มติดเชื้อจะสูงกว่ากลุ่มควบคุม แสดงว่าร่างกายกุ้งมีการเพิ่มปริมาณเม็ด มากขึ้น เพราะแบคทีเรียอาจมีค้างอยู่ในร่างกายกุ้งโดยเฉพาะแบคทีเรียที่มีชีวิต เรถเจริญเติบโตและแบ่งตัวเพิ่มปริมาณในร่างกายสัตว์ได้ มีหลักฐานการแบ่งตัว ม็ดเลือดใน ร่างกายกุ้ง *P. japonicus* เพิ่มปริมาณสามเท่าตัว หลังจากกุ้งถูก นด้วยสารกระตุ้น Lipopolysaccharide จากแบคทีเรีย *Salmonella abortus* และ inosuppressive lymphocyte mitogen (ISM) protein จากเชื้อรา *Candida ans* (Sequeira et al, 1996) สำหรับการสุ่มตัวอย่างเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำในวันที่ 7

า THC จะลดลงอีกครั้งอันอาจเนื่องมาจากการกำจัดแบคทีเรีย ซึ่งสามารถพบเม็ดเือด Granulocyte มีการแตกตัว ของแกรนูล (Degranulation) และเม็ดเลือดมีการเอมสลาย

ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของเม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำหลังการติดเชื้อ *V. ginolyticus* โดยพบว่าอัตราส่วนของเม็ดเลือดจำนวน 200 เซลล์เพื่อแยกเป็นชนิด yaline cell (HY) ต่อชนิด Granulocyte (SGH+LGH) มีความผันแปรแตกต่างอย่างมีนัยะสำคัญโดยอัตราของ HY มีแนวโน้มลดลงและอัตราของ Granulocyte มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจากกลุ่มควบคุมเมื่อสุ่มนับตัวอย่างชนิดเม็ดเลือดตลอด 7 วันหลังการติดเชื้อ ในกลุ่มควบคุมอัตราของ HY ต่อ Granulocyte มีค่า 75 % ต่อ 25 % ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการศึกษาในกุ้ง *P. stylirostris* มีค่า 80 % ต่อ 14-23 % (Le Moullac et al,1997) เมื่อมีสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกาย การผลิตชนิดเม็ดเลือดประเภทใดของกุ้งขึ้นอยู่กับน้าที่ของเม็ดเลือดนั้นๆ ในกระแสเลือด อย่างไรก็ตามมีการรายงาน ขัดแย้งเกี่ยวกับน้าที่ของเม็ดเลือดของสัตว์ Decapod ดังต่อไปนี้ Soderhall and Cerenius (1993) ยงานเม็ดเลือด HY มีหน้าที่ในการ Phagocytosis และเม็ดเลือด Granulocyte มีน้าที่เกี่ยวกับ Encapsulation, Cytotoxicity, The ProPO activating system ซึ่งขัดงกับรายงานของ Hose and Martin (1989) และ Hose et al (1990)ที่กล่าวว่าเม็ดเด HY มีหน้าที่เกี่ยวข้องใน การกระตุ้นน้ำเลือดหลังเกิดบาดแผล ในขณะที่เม็ดเลือด anulocyte เท่านั้นที่ทำหน้าที่ Phagocytosis และ Encapsulation ในการทดลองติดเชื้อใน กุ้ง *S. ingentis* ต่อ แบคทีเรียแกรมลบที่อาศัยในน้ำทะเลชนิด *ophaga* sp พบว่าเม็ดเลือด SGH ส่วนใหญ่ทำหน้าที่ Phagocytosis และน้อยในเม็ดเลือด LGH และเม็ดเลือด HY ไม่มี ส่วนเกี่ยวข้องเลย (Hose and Martin 9) เมื่อพิจารณาอัตราเม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำหลังการติดเชื้อ *V. alginolyticus* การทดลองครั้งนี้พบว่าเม็ดเลือด Granulocyte ที่มีการแตกตัวของแกรนูล อย่างเคือเม็ดเลือดชนิด SGH (พบน้อยมากใน LGH) หลังจากแกรนูลแตกตัวจะปลดยเอนไซม์ Lysozyme (Hose and Martin, 1989) และ Prophenoloxidase Moullac et al, 1997; Tsing et al, 1989) จึงมีความเป็นไปได้ว่าเม็ดเลือด HY จะ

มีหน้าที่ในการ Phagocytosis และการแข็งตัวของเลือดบริเวณบาดแผลในระยะเริ่มแรก เมื่อสุ่มตัวอย่างที่ 6 และ 12 ชั่วโมง ค่า HY มีแนวโน้มลดลงในกระแสเลือดกุ้งกุลาดำ เพราะถูกใช้ไปในหน้าที่เหล่านั้น และเมื่อเวลาผ่านไปเมื่อสุ่มตัวอย่างเลือดจะพบการแตกตัวของแกรนูลอย่างมากมายของเม็ดเลือด SGH และค่า Granulocyte มีการเพิ่มในอัตราที่แตกต่างอย่างมีนัยยะสำคัญกับกลุ่มควบคุม ระบบการกำจัดสิ่งแปลกปลอมออกจากร่างกายกุ้งด้วยระบบ The ProPO activating system (แกรนูลจะมีการแตกตัว) เป็นระบบที่มีประสิทธิภาพสูงในสัตว์ Decapod (Soderhall and Cerenius 1993; Le Moullac et al, 1997; Tsing et al, 1989) โดยสารกระตุ้นที่รายงานทำให้เกิดการแตกตัวของแกรนูลในเม็ดเลือด SGH คือสาร Polysaccharide จากแบคทีเรีย และสารโปรตีน ที่มีคุณสมบัติ 76 KD factor และ β-1,3-glucan (Soderhall and Cerenius 1993) อย่างไรก็ตามสาร Beta-glucan เป็นสารกระตุ้นในกุ้งกุลาดำระยะสั้นเท่านั้นหลังจาก กุ้งกุลาดำถูกทำให้เกิดการติดเชื้อ Vibriosis (Sung et al, 1994) มีการรายงานกิจ กรรมของ The ProPO activating system มีการเปลี่ยนตามระยะลอกคราบของกุ้งที่พบว่าระยะก่อนการลอกคราบ (Premolt) กิจกรรมของ Phenoloxidase จะต่ำดังนั้น จึงเป็นเหตุผลที่ว่าโอกาสที่กุ้งเกิดการติดเชื้อได้ง่ายอันเนื่องจากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายต่ำ ซึ่งการทดลองในกุ้ง *P. stylirostris* ต่อโรค Viriosis กุ้งมีอัตราการตาย 48 % (Le Moullac et al, 1997)

จากการศึกษาการวิจัยในครั้งนี้สามารถสรุปผลได้ดังนี้

. แบคทีเรียที่เจริญบนอาหารวุ้นเฉพาะชื่อ TCBS มีโคโลนีสีเหลือง และจำแนก ได้ว่าเป็นชนิด *Vibrio alginolyticus*

. ชนิดของเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำถูกจำแนกออกเป็นสามชนิดได้ดังนี้ Hyalince cell (HY), mall granule hemocyte (SGH), และ Large granule hemocyte (LGH) โดยการอมสีเม็ดเลือดและจากการส่องเลือดกุ้งสดด้วยกล้องจุลทรรศน์

3. เม็ดเลือดกุ้งกุลาดำทั้งสามชนิดมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างหลังการติดเชื้อ *Vibrio alginolyticus* รวมทั้งการแตกตัวของแกรนูลของเม็ดเลือด SGH และ LGH

4. ปริมาณเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำในหนึ่งวงจรการลอกคราบถูกศึกษาสุ่มนับปริมาณเม็ดเลือดใช้ค่าปริมาณ Total hemocyte counts (THC) เป็นตัวเปรียบเทียบ ซึ่งพบว่า ค่าปริมาณ THC มีการผันแปรแตกต่างกันไปในแต่ละระยะคราบของกุ้ง

5. ปริมาณเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำมีความผันแปรเมื่อทำให้เกิดการติดเชื้อ *Vibrio alginolyticus* โดยพบว่าที่ 6 ชั่วโมงหลังการฉีดแบคทีเรียเข้าร่างกาย ซึ่งปริมาณค่า THC ลดลง 16 % และปริมาณเม็ดเลือดจะกลับสู่สภาพปกติในวันที่สอง จากนั้นจะเพิ่มขึ้นกว่ากลุ่มควบคุม 50 % ในระหว่างวันที่สามและวันที่หก ในที่สุดปริมาณเม็ดเลือดจะลดลงต่ำสุดในวันที่เจ็ดของการทดลองในปริมาณ 52 %

6. ชนิดเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำมีความผันแปรเมื่อทำให้เกิดการติดเชื้อ *Vibrio alginolyticus* โดยใช้ความสัมพันธ์ระหว่างค่า HY:G(SGH+LGH) เมื่อนับชนิดของ เม็ดเลือดในปริมาณ 200 เซลล์ ซึ่งพบว่าค่าปริมาณ HY มีแนวโน้มลดลง และค่าปริมาณ Granulocyte มีแนวโน้มสูงขึ้นตลอดระยะการทดลอง 1-7 วันและชนิดของ Granulocyte ที่พบมากคือ SGH และมีการแตกตัวของแกรนูลเป็นส่วนใหญ่