

การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* Fabricius

Immunoenhancement of Black Tiger Shrimp *Penaeus monodon* Fabricius

คำนำ

กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius, 1798) เป็นสินค้าส่งออกที่ทำรายได้ให้กับประเทศไทย โดยในปี พ.ศ. 2547 มีมูลค่าการส่งออก 32,690.3 ล้านบาท (กระทรวงพาณิชย์, 2548) แต่เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งกุลาดำมักจะประสบปัญหาเรื่องโรคในการเลี้ยงตลอดมา เนื่องจากการเลี้ยงในปัจจุบันเป็นแบบพัฒนา (Intensive) มีการปล่อยกุ้งในอัตราความหนาแน่นสูง ทำให้มีของเสียจากการขับถ่ายในบ่อเลี้ยงเป็นปริมาณมาก ทำให้คุณภาพน้ำเปลี่ยนแปลงไป เมื่อคุณภาพน้ำเปลี่ยนแปลงไปเป็นสาเหตุทำให้กุ้งเกิดความเครียด และมีภูมิคุ้มกันลดลง ทำให้เชื้อโรคเข้าทำอันตรายกุ้งได้ นอกจากนี้การที่มีอาหารเหลือตกค้างในบ่อ ทำให้มีการสะสมของสารอินทรีย์ที่พื้นก้นบ่อ ทำให้เชื้อโรคเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว เป็นปัจจัยเสริมที่ทำให้กุ้งเป็นโรคได้ง่ายขึ้น

เมื่อเกิดโรคระบาดก็ได้มีการใช้สารปฏิชีวนะเพื่อทำการรักษาโรคเหล่านี้เป็นเวลานาน และมีการใช้อย่างพร่ำเพรื่อไม่มีการควบคุมปริมาณและชนิดของยาให้เหมาะสมกับการรักษาโรค ส่งผลต่อสัตว์โดยตรง คือการที่สัตว์ได้รับสารปฏิชีวนะเป็นเวลานาน ส่งผลให้จุลินทรีย์เกิดการดื้อยา ทำให้การใช้สารปฏิชีวนะในปริมาณเท่าเดิมไม่ได้ผลเท่าที่ควร นอกจากนี้การให้สารปฏิชีวนะเป็นเวลานานโดยไม่มีระยะเวลาให้ออกก้อให้เกิดสารตกค้างในเนื้อสัตว์ได้ ผู้บริโภคสัตว์เหล่านี้เข้าไป จะมีการสะสมสารปฏิชีวนะเหล่านี้ในระยะยาว อันตรายจะขึ้นอยู่กับว่าสารนั้นเป็นสารใด ซึ่งสารบางชนิดเมื่อเข้าไปสู่ร่างกายแล้วอาจถูกเปลี่ยนไปเป็นสารที่มีความเป็นพิษสูงกว่าสารตั้งต้น หรืออาจเป็นสารก่อมะเร็ง (วลัยพร, 2544)

สารต้านจุลชีพที่ประกาศาให้ใช้กับสัตว์น้ำเพื่อลดการเกิดโรคได้แก่ Oxytetracycline, Sulfadimethoxine + Ormethoprim, Sulfadimethoxine + Trimethoprim และ Enrofloxacin แต่ต้องใช้ในปริมาณที่ไม่เกินที่กำหนดจึงจะไม่ตกค้าง (นนทวิทย์, 2545) และไม่สร้างปัญหาตกค้างในเนื้อกุ้ง (สมปอง, 2545) ส่วนไนโตรฟูแรนและคลอแรมเฟนิคอล เป็นยาที่ห้ามใช้ในสัตว์ เนื่องจากเป็นยาอันตรายร้ายแรง ผู้ที่บริโภคเข้าไปจะสะสมและตกค้าง ก่อให้เกิดการดื้อยาและเป็นสารก่อมะเร็งในเม็ดเลือด (ลีลา, 2545)

จากสาเหตุดังกล่าวข้างต้นจึงมีการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ โดยพยายามลดการใช้สารปฏิชีวนะและสารเคมี แต่จะมุ่งเน้นถึงการเพิ่มภูมิคุ้มกันโรคให้กับกุ้งกุลาดำ โดยในปัจจุบันมีการใช้สารเสริมสุขภาพ ซึ่งเป็นแนวทางหนึ่งที่จะช่วยให้กุ้งมีความแข็งแรงในสภาพการเลี้ยงแบบพัฒนาที่กำลังดำเนินการอยู่ในปัจจุบัน สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันคือสารที่สัตว์ได้รับในปริมาณน้อยและมีผลในการทำให้เกิดความแข็งแรง มีภูมิคุ้มกันโรคสูงขึ้น เมื่อมีเชื้อโรคเข้าสู่ร่างกายก็จะสามารถป้องกันตัวเองได้ จึงลดปัญหาการเกิดโรคระบาดและการใช้ยาในเวลาเดียวกัน นอกจากการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันยังมีการนำวิตามินซีมาผสมอาหาร ซึ่งวิตามินซีมีบทบาทสำคัญในการสร้างคอลลาเจน ซึ่งเป็นสารสำคัญในการสร้างเนื้อเยื่อ ช่วยทำให้เปลือกแข็งแรง แผลหายเร็ว และผนังเส้นเลือดแข็งแรง มีบทบาทในการสร้างฮอร์โมนของการลอกคราบ ลดความเครียด สร้างภูมิคุ้มกัน กระตุ้นการกินอาหาร (อัครเดช, 2545)

นอกจากการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันและวิตามินซีแล้ว ยังมีการนำเอาจุลินทรีย์มาใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้ง ซึ่งการใช้จุลินทรีย์จะแบ่งออกเป็นวัตถุประสงค์หลัก 2 วัตถุประสงค์ คือ เพื่อควบคุมคุณภาพสิ่งแวดล้อมในบ่อกุ้ง และเพื่อใช้จุลินทรีย์เป็นอาหารเสริมในสัตว์ คือใช้เป็นโพรไบโอติก (probiotic) (มณจันทร์, 2540) โดยจุลินทรีย์ที่เลือกมาใช้นั้นควรมีคุณสมบัติต่าง ๆ คือ ไม่ควรเป็นจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคในกุ้ง (non pathogenic) หรือมีโอกาสก่อให้เกิดโรค ไม่ควรเป็นจุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมแล้วได้สารพิษ เจริญได้ดีในสถานะต่าง ๆ ในบ่อกุ้ง ทั้งที่มีค่าความเป็นกรดเป็นด่างสูง หรือต่ำ หรือที่มีค่าความเค็มที่เปลี่ยนแปลงไป ควรมีความสามารถยับยั้งการเจริญของสิ่งมีชีวิตที่ก่อให้เกิดโรคได้ อาจทำได้โดยการแย่งอาหารและที่อยู่ หรือยับยั้งโดยการหลั่งสารประเภทเอนไซม์ออกมาข้างนอกเซลล์ และควรที่จะมีความสามารถในการเปลี่ยนสารพิษให้เป็นสารที่มีพิษน้อยลงหรือไม่มีพิษ (วลัยพร, 2544)

โดยทั่วไปจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารจะทำหน้าที่เป็นโพรไบโอติก โดยสร้างโคโลนิทุกพื้นที่ของทางเดินอาหาร และเคลื่อนที่จากปากไปสู่ปลายทางคือทวารและจะไม่เคลื่อนที่ย้อนทาง บทบาทของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่เหล่านี้จะช่วยย่อยอาหาร ลดปริมาณจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหาร มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญระหว่างจุลินทรีย์ด้วยกัน และระหว่างจุลินทรีย์กับ host จุลินทรีย์เหล่านี้จะสร้าง acetic acid, lactic acid, propionic acid, volatile acid, วิตามิน, เอนไซม์, สารต้านแบคทีเรีย และสารประกอบเคมีที่ไม่ทราบชนิด (วลัยพร, 2544)

การใช้โพรไบโอติกเพื่อให้ได้ผลตามที่มุ่งหวัง จุลินทรีย์ที่ผ่านจากปากเข้าสู่ภายในระบบทางเดินอาหารของร่างกายจะต้องรอดชีวิตและสามารถยึดเกาะกับเยื่อบุผิวภายในอวัยวะต่าง ๆ ตามบริเวณหรือจุดที่จำเพาะเจาะจงที่ได้คัดเลือกสายพันธุ์ พร้อม ๆ กับมีการแข่งขันการเจริญเติบโตกับพวกจุลินทรีย์ประจำถิ่น มีการเพิ่มปริมาณ และผลิตสารเคมีที่เป็นประโยชน์ได้

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาผลของสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน 2 ชนิด คือ เบต้ากลูแคน และ เปปติโดกลัยแคน ต่อระบบภูมิคุ้มกันโรคของกุ้งกุลาดำ โดยมุ่งเน้นความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรียจำพวกที่ก่อให้เกิดโรค และผลต่อองค์ประกอบต่าง ๆ ทางภูมิคุ้มกันโรค
2. ศึกษาความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสมในการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันทั้ง 2 ชนิด ต่อสภาพการเลี้ยงจริง
3. ศึกษาคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* ที่ได้มาจากลำไส้กุ้งกุลาดำในการยับยั้งการเจริญเติบโต และแข่งขันการใช้สารอาหารในการเจริญเติบโตกับเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *Vibrio harveyi*
4. ศึกษาผลของการใช้แบคทีเรีย *Bacillus* ทั้งเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสม ที่ได้มาจากลำไส้กุ้งกุลาดำเพื่อใช้เป็นโพรไบโอติกในกุ้งกุลาดำ โดยดูผลต่อการเจริญเติบโต และระบบภูมิคุ้มกันโรค

การตรวจเอกสาร

กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius, 1798) หรือเรียกว่า กุ้งกุลาดำ กุ้งทะเล กุ้งเสือดำ กุ้งเสื่อ กุ้งลาย มีชื่อสามัญว่า Black tiger shrimp เป็นกุ้งทะเล ลำตัวสีแดงอมน้ำตาลถึงน้ำตาลเข้ม มีลายพาดขวางที่หลังประมาณ 9 ลาย และสีออกน้ำตาล เข้มข้างแถบสีขาว ด้านบนของกริมิฟิม 7-8 ซึ่งด้านล่างมี 3 ซึ่ง สันกริยาวเกือบถึงคาราเปส (carapace) มีสันตับ (hepatic crest) ยาวตรงขนานไปกับลำตัว หนวดยาวไม่มีลายชัดเจน ขาคืนมีสีแดงปนดำ ขาวายน้ำมีสีน้ำตาลปนน้ำเงิน โคนสีขาว ขาคืนคู่ที่ห้าไม่มี exopod ขนาดความยาวประมาณ 18-25 เซนติเมตร

พบกุ้งกุลาดำได้ทั่วไปในทวีปเอเชีย ในประเทศไทยพบแพร่กระจายทั่วไป พบมากบริเวณเกาะช้าง บริเวณนอกฝั่งชุมพร ถึงนครศรีธรรมราช และทางฝั่งอันดามันจะพบมากที่ภูเก็ต ระนอง ชอบอาศัยอยู่ในบริเวณที่มีดินเป็นทรายปนโคลน หรือทรายปนเปลือกหอยและหินปะการัง สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี อดทน โตเร็ว เมื่อมีรสชาติดี จึงนิยมนำมาทำการเพาะเลี้ยงเพื่อการค้า เป็นสัตว์เศรษฐกิจ และเป็นสินค้าส่งออกที่สำคัญ

อนุกรมวิธานของกุ้งกุลาดำ (SEAFDEC, 1988)

Phylum Arthropoda

Class Crustacea

Subclass Malacostraca

Order Decapoda

Suborder Dendrobranchiaie

Superfamily Penaeoidea

Family Penaeidae

Genus *Penaeus*

Species *monodon*

วงจรชีวิต

กุ้งกุลาดำเมื่อเจริญเติบโตเป็นกุ้งใหญ่ (adult) จะชอบอาศัยอยู่ตามหน้าดิน (bottom dwelling) กินอาหารจำพวกพืชและสัตว์ที่ตายแล้ว หรือยังมีชีวิตอยู่ วงจรชีวิตจะเริ่มในทะเลลึก กุ้งกุลาดำจะอาศัยอยู่ในพื้นที่ท้องทะเลที่เป็นทราย ความลึก 30-40 เมตร โดยแม่กุ้งจะวางไข่ในทะเล

แล้วไข่จะฟักออกมาเป็นตัวในบริเวณที่วางไข่ จากนั้นลูกกุ้งจะเคลื่อนตัวเข้าไปอาศัยอยู่ในบริเวณชายฝั่งที่เป็นน้ำกร่อย ซึ่งเป็นบริเวณที่มีอาหารธรรมชาติสมบูรณ์ ขณะเคลื่อนที่เข้าชายฝั่งลูกกุ้งจะมีการเจริญเติบโตขึ้นเรื่อย ๆ โดยวิธีลอกคราบ (molting) เมื่อลูกกุ้งเจริญเติบโตถึงขั้น postlarva ก็จะเข้าหากินบริเวณน้ำกร่อยพอดี ลูกกุ้งจะหากินเลี้ยงตัวเองในบริเวณนี้ จนกระทั่งเติบโตถึงขั้นเป็นกุ้งใหญ่ก็จะอพยพสู่ทะเลลึก เพื่อทำการสืบพันธุ์วางไข่ต่อไป (นิเวศน์, 2529)

ระยะการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ มี 4 ระยะ (ประจวบ และ สุพันธ์, 2531)

1. ระยะนอเพียส (nauplius) เป็นระยะแรกของลูกกุ้งหลังฟักออกจากไข่ รูปร่างคล้ายกระสวย มีระยะยาว 3 คู่ ใช้ในการเคลื่อนไหว ลำตัวยังไม่แบ่งเป็นข้อปล้อง ระยะนอเพียสจะลอกคราบทั้งหมด 6 ครั้ง ใช้เวลาประมาณ 2-3 วัน มีขนาด 0.3-0.33 มิลลิเมตร ลักษณะนิสัยจะว่ายน้ำเข้าหาแสง ในระยะนี้ยังไม่กินอาหารและชอบกระแสน้ำที่หมุนเวียนอยู่เสมอ เมื่อมีการลอกคราบครั้งสุดท้ายในระยะนอเพียส จะมีขนาดประมาณ 0.6 มิลลิเมตร แล้วพัฒนาเข้าสู่ระยะซุเอีย

2. ระยะซุเอีย (zoea, protozoea) ระยะนี้จะมีการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจน โดยส่วนหัวจะมีขนาดใหญ่ มีลำตัวยาวขึ้นและแยกจากส่วนของลำตัวอย่างเด่นชัด ระยะซุเอียมีการลอกคราบ 3 ครั้ง แต่แต่ละครั้งจะมีลักษณะที่แตกต่างกันคือ ระยะซุเอียหนึ่ง มีส่วนของตาติดกับหัว ระยะซุเอียสอง ส่วนของหัวจะมีก้านตาโผล่ให้เห็นชัดเจน ระยะซุเอียสามจะมีแพนหาง (uropod) เกิดขึ้นเป็นสองแฉก (bilobed) และลูกกุ้งจะเริ่มว่ายน้ำไปข้างหน้าอย่างต่อเนื่องได้ ซึ่งลักษณะการเคลื่อนไหวจะเป็นแบบขึ้น-ลง ในระยะซุเอียจะเริ่มกินอาหารซึ่งได้แก่พวกแพลงก์ตอนพืช ซึ่งมีขนาดประมาณ 50-100 ไมครอน เช่น *Chaetoceros* sp. และ *Skeletonema* sp. เป็นต้น ลูกกุ้งจะอยู่ในระยะซุเอียประมาณ 3-4 วัน ลอกคราบครั้งสุดท้ายมีขนาด 1-3.3 มิลลิเมตร แล้วจึงพัฒนาเข้าสู่ระยะไมซิส

3. ระยะไมซิส (mysis) เป็นระยะที่การพัฒนาของขาว่ายน้ำ (pleopod) มีการลอกคราบ 3 ครั้ง ทำให้เกิดความแตกต่างกัน แบ่งได้เป็น 3 ระยะ คือ ระยะไมซิสหนึ่งจะพบว่าส่วนของขาว่ายน้ำเป็นปุ่มนูน (pleobases) ระยะไมซิสสองจะพบว่าส่วนของขาว่ายน้ำจะพัฒนาขึ้นลักษณะเป็นดิ่ง แต่ยังไม่มีส่วนปล้อง (segment) ระยะไมซิสสามส่วนของขาว่ายน้ำจะพัฒนาขึ้นเป็นปล้องอย่างสมบูรณ์ ลูกกุ้งในระยะไมซิสจะว่ายน้ำแบบติดตัวขึ้นและห้อยหัวลง ระยะนี้เริ่มกินแพลงก์ตอนสัตว์ เช่น อาร์ทีเมียขนาดเล็ก ลูกกุ้งจะอยู่ในระยะไมซิสประมาณ 4-7 วัน เมื่อลอกคราบครั้งสุดท้ายจะมีขนาดประมาณ 3.3-5.0 มิลลิเมตร จากนั้นจะพัฒนาเข้าสู่ระยะโพสท์ลาร์วา

4. ระยะโพสท์ลาร์วา (postlarva) จะมีรูปร่างเหมือนตัวเต็มวัย มีการพัฒนาอวัยวะต่าง ๆ สมบูรณ์ ลูกกุ้งในระยะโพสท์ลาร์วาจะว่ายน้ำนานตามแนวยาวและมักเกาะตามผนังหรือก้นบ่อ เริ่มให้อาหารเม็ดและอาหารเสริมได้มีขนาดตั้งแต่ 5.5 มิลลิเมตรขึ้นไป โดยทั่วไปการเพาะฟักมักจะอนุบาลลูกกุ้งจนถึงระยะโพสท์ลาร์วาที่ 7 ถึง ระยะโพสท์ลาร์วาที่ 20 จึงนำไปเลี้ยงในบ่อดิน

ระบบภูมิคุ้มกันโรคของกุ้งกุลาดำ

สัตว์น้ำในกลุ่มอาร์โทรพอด (arthropod) ไม่มีระบบภูมิคุ้มกันโรคแบบเฉพาะเจาะจง ซึ่งทำงานโดยแอนติบอดี (antibody) แต่การป้องกันตัวของสัตว์น้ำกลุ่มนี้เป็นแบบไม่จำเพาะเจาะจง (non-specific immune response) (กิจการ และคณะ, 2543จ) ระบบภูมิคุ้มกันโรคของกุ้งกุลาดำสามารถแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ

1. ระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์ (cellular immunity) เซลล์ที่มีบทบาทสำคัญคือเซลล์เม็ดเลือด 3 ชนิด คือ ไฮยาลินเซลล์ (hyaline cell) เซมิกรานูลาร์ (semi granular) ลาร์จกรานูลาร์ (large granular) และเซลล์จับกินที่อยู่กับที่ (fix phagocyte) กระจายอยู่ตามเนื้อเยื่อ ต่อมมน้ำเหลือง กล้ามเนื้อหัวใจ และอวัยวะอื่น ๆ ซึ่งมีวิธีการหลายวิธี ได้แก่ การจับกินเชื้อโรค (phagocytic activity) และ การห่อหุ้มตัวเชื้อหรือสิ่งแปลกปลอม (nodule formation and encapsulation)

2. ระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด (humoral immunity) ระบบนี้เกิดจากการทำงานของหลาย ๆ ปฏิกริยา เช่น การเกิดการแข็งตัวของเลือด (blood clotting) การเกิดเมลานิน (melanin formation) และ opsonization (Hoffmann *et al.*, 1999) ระบบที่สำคัญคือโปรเฟโนออกซิเดสแอกติเวตติ้งซิสเต็ม (prophenol oxidase activating system) และเลคติน (lectin) ซึ่งคอยดักจับสิ่งแปลกปลอม

การแข็งตัวของเลือด

การแข็งตัวของเลือดเป็นปฏิกริยาที่สำคัญทั้งในสัตว์มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลัง เพื่อที่จะป้องกันการสูญเสียเลือดจากบาดแผล เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นโดยเม็ดเลือดชนิดไฮยาลินเซลล์ ซึ่งมีกรานูลอยู่ภายใน เมื่อกรานูลถูกปล่อยออกมาแล้วแตกออก สารเคมีที่ถูกปล่อยออกมาจะไปกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของโคแอกกูโลเจน (coagulogen) ซึ่งเป็นสารที่ทำให้เกิดการจับตัวเป็นก้อน โดยเป็นโปรตีนหลักเกี่ยวกับการแข็งตัวของเลือดซึ่งอยู่ในน้ำเลือดของ

ครัสเตเชียนหลายชนิด ทำให้เกิดการแข็งตัวของเลือด การที่เลือดไม่สามารถแข็งตัวได้ อาจเกิดมาจาก การที่เม็ดเลือดชนิดไฮยาไลน์เซลล์มีปริมาณลดลงจากการติดเชื้อจุลินทรีย์

Iwanaga (1993) ได้ทำการศึกษากระบวนการแข็งตัวของเลือดในกลุ่ม Chelicerate โดยศึกษา horseshoe crab *Tachypleus tridentatus* พบว่าระบบที่ทำให้เกิดการจับตัวเป็นก้อน (coagulation system) ประกอบไปด้วยโปรตีน 5 ชนิด ซึ่งทำให้เกิดการแข็งตัวของเลือดได้ ได้แก่ serine proteinase zymogen factors C, B, G, proclotting enzyme และ clottable protein coagulogen ซึ่ง factors C จะเป็นโปรตีนที่ไวต่อการกระตุ้นของ Lipopolysaccharide (LPS) และ factors G จะเป็นโปรตีนที่ไวต่อการกระตุ้นของ β -1,3-glucan

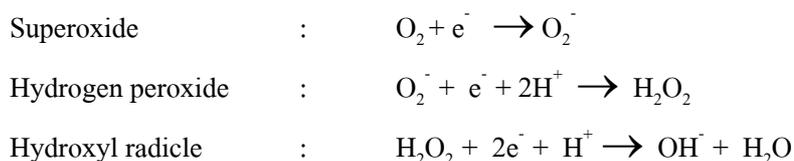
ฟาโกไซโตซิส (Phagocytosis)

ฟาโกไซโตซิสนับเป็นด่านแรกในการป้องกันเมื่อมีสิ่งแปลกปลอมผ่านชั้นผิวปกคลุมเข้ามาสู่ร่างกาย ฟาโกไซท์ (phagocytes) เป็นเม็ดเลือดขาวที่สามารถทำให้สิ่งแปลกปลอมที่เป็นเซลล์หรือสิ่งมีชีวิตเล็ก ๆ ซึ่งอาจเป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรคได้สลายตัวโดยกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม ตัวอย่างของเม็ดเลือดขาวได้แก่ macrophages และ granulocytes

กระบวนการเกิดการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม เป็นกระบวนการที่ไม่เฉพาะเจาะจง เริ่มจากการยึดกันระหว่างสิ่งแปลกปลอมกับผิวของเซลล์ หลังจากนั้นผิวของเซลล์จะเว้าเข้าไป เกิดเป็นฟาโกโซม (phagosome) ซึ่งจะสัมผัสกับไลโซโซม (lysosome) ที่อยู่ในเซลล์ ภายในไลโซโซมบรรจุเอนไซม์หลายชนิดที่เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายเรียกว่า acid hydrolases ซึ่งรวมถึงเอนไซม์ DNases, RNases, proteases, phosphatases และ lipases ที่สามารถไปลดขนาดของโมเลกุลสิ่งแปลกปลอมทั้งหลายให้เหลือเป็นหน่วยย่อย ๆ

เมื่อเซลล์ฟาโกไซท์ร่วมกับไลโซโซม จะเกิดเป็นฟาโกไลโซโซม (phagolysosome) และมีการแตกตัวของออกซิเจน (oxygen burst) น้ำตาลที่ถูกเก็บสะสมไว้ ที่ใช้ในการสร้าง NADPH จะรวมเข้ากับออกซิเจน เกิดเป็น toxic peroxide (H_2O_2) และ superoxide (O_2^-) การแตกตัวของออกซิเจนสามารถที่ผลิตออกซิเจนในรูปแบบที่เป็นพิษ จำนวนโมเลกุลทั้งหมดจะมีความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาสูง และมีการทำลายอนุภาคภายในฟาโกไลโซโซม โดยกลไกทางเคมีอย่างไม่เฉพาะเจาะจง หลังจากทำการย่อยสลายแล้วก็จะปล่อยส่วนที่ถูกทำลายแล้วออกมาจากเซลล์

การเพิ่มจำนวนอิเล็กตรอนโดยมี NADPH เป็นตัวให้อิเล็กตรอนทำให้เกิดอนุภาคต่าง ๆ



ภายในไลโซโซม จะมีค่า pH เป็นกรด เพราะเยื่อผิวของไลโซโซม จะปั๊มไฮโดรเจนไอออน (H^+) เข้าไปในไลโซโซม เพื่อที่จะรักษาระดับค่าความเป็นกรดเป็นด่างให้ได้ 4.8 ซึ่งเป็นค่าความเป็นกรดเป็นด่างที่โปรตีนหลายชนิดเสื่อมสภาพไป (denature) และง่ายต่อการทำให้แตกออก การเป็นกรดนี้จะเป็นการเร่งให้เกิดการสร้างสารประกอบออกซิเจนบางชนิดที่เป็นพิษเช่น peroxide

ระยะเวลาในการเกิดกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมตั้งแต่เริ่มจนถึงการเกิดฟาโกไลโซโซม และการกระตุ้นการเกิดกระบวนการแตกตัวของออกซิเจนจะใช้เวลาหลายชั่วโมง เวลาสำหรับการเกิดการแตกตัวของอนุภาคสิ่งแปลกปลอมจะแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ชนิดของสิ่งแปลกปลอมที่เข้าไป ระดับของการกระตุ้นเซลล์ที่ทำหน้าที่กลืนกินสิ่งแปลกปลอม กระบวนการนี้บางครั้งสามารถเกิดได้ในเวลาไม่กี่ชั่วโมง หรือบางครั้งอาจใช้เวลาเป็นวัน (Terry, 2001)

โนดูลฟอร์มเมชัน (nodule formation) และ เอนแคปซูลชัน (encapsulation)

โดยทั่วไปกระบวนการฟาโกไซโตซิสจะทำลายเชื้อจุลินทรีย์ที่มีขนาดเล็ก โดยเซลล์เม็ดเลือดเดี่ยว ๆ ส่วนโนดูลฟอร์มเมชัน และ เอนแคปซูลชัน เป็นการห่อหุ้มล้อมตัวเชื้อหรือสิ่งแปลกปลอม ซึ่งมีวิธีการที่ซับซ้อนมากกว่า สามารถทำให้สิ่งแปลกปลอมที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคที่มีขนาดใหญ่ หรือมีจำนวนมากถูกกำจัดไป การเกิดโนดูลจะใช้เมื่อมีสิ่งแปลกปลอมเข้ามาเป็นจำนวนมาก ส่วนการห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอมโดยเอนแคปซูลชัน จะเกิดเมื่อสิ่งแปลกปลอมนั้นมีขนาดใหญ่

ในขบวนการเกิดก้อนโนดูลนั้น จะเห็นการรวมตัวของเซลล์เม็ดเลือด เพื่อที่จะโอบล้อมสิ่งแปลกปลอม หลังจากนั้นจะเกิดการทำลายสิ่งแปลกปลอมซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส โดยการเกิดเมลานิน (melanin) (Lee, 2001)

กระบวนการเอนแคปซูลจะคล้ายกับโนคลูฟอร์เมชัน แต่เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นเพื่อต้านทานต่ออนุภาคที่มีขนาดใหญ่ เช่น เชื้อรา หนอนตัวกลม ไข่ของปรสิต และระยะตัวอ่อน (Gunnarsson and Lackie, 1985; Hoffmann *et al.*, 1996; Koizumi *et al.*, 1999; Gillespie *et al.*, 1997)

ระบบโปรฟีนอลออกซิเดสแอกติเวติง ซิสเต็ม

เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase) เป็นเอนไซม์ที่เกิดจากการกระตุ้นระบบโปรฟีนอลออกซิเดส (prophenoloxidase) ของครัสตาเซียโดยไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide : LPS) เปปติโดไกลแคน (peptidoglycan : PG) และ เบต้ากลูแคน (β -1,3-glucan) ซึ่งเป็นส่วนประกอบผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย ฟีนอลออกซิเดส จะไป oxidize สารกลุ่มฟีนอล (phenol) ให้เป็นสารประกอบควิโนน (quinone) แล้วเปลี่ยนไปเป็นเมลานินได้ในที่สุดหน้าที่ของเมลานินจะช่วยในการยับยั้งหรือป้องกันการเจริญเติบโตของพวกเชื้อแบคทีเรีย สารต่อต้านแบคทีเรีย (antibacterial substances) เป็นสารประกอบขั้นสุดท้ายที่ได้จากกระบวนการของระบบโปรฟีนอลออกซิเดส เช่นเดียวกับเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส รวมทั้งคุณสมบัติในการป้องกันการเจริญเติบโตของพวกแบคทีเรียและเชื้อรา (Smith and Chisholm, 1992; Soderhall and Cerenius, 1992; Bacher *et al.*, 1995)

จากการศึกษาของ กิจการ และคณะ (2543 จ) พบว่าความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสที่วิเคราะห์ได้จากเม็ดเลือดและน้ำเลือดกึ่งมีค่าแตกต่างกัน โดยพบปริมาณเอนไซม์ดังกล่าวค่อนข้างสูงในเม็ดเลือด และปริมาณต่ำในน้ำเลือดกึ่งกุลาดำ ปริมาณที่พบในเม็ดเลือดมีค่า 352.72 ± 152.30 หน่วย/นาที่/มิลลิกรัมโปรตีน ในขณะที่ในน้ำเลือดมีค่า 32.23 ± 6.04 หน่วย/นาที่/มิลลิกรัมโปรตีน

ในสิ่งมีชีวิตพวกกุ้งพบว่าความว่องไวของเอนไซม์ในระบบโปรฟีนอลออกซิเดส จะมีมากในถุง (vesicle) ซึ่งอยู่ภายในไซโตพลาสซึมของเม็ดเลือดเช่นใน *Astacus astacus* และใน *Procambarus clarki* (กิจการ และคณะ, 2543 จ อ้างถึง Smith and Soderhall, 1983; กิจการ และคณะ, 2543 จ อ้างถึง Johansson and Soderhall, 1985; Lanz *et al.*, 1993) ในขณะที่กิจการ และคณะ (2543 จ) อ้างถึง Sung *et al.* (1996) และ Parazzolo and Barracco (1997) ซึ่งพบว่าโปรฟีนอลออกซิเดสของกุ้งกุลาดำ กุ้งก้ามกราม และกุ้งขาว ส่วนใหญ่จะอยู่ในไซโตพลาสซึมของเม็ดเลือดในกลุ่มแกรนูลาร์ (granular haemocyte) นอกจากนี้แล้วยังพบเอนไซม์ชนิดนี้มีการแพร่กระจายอยู่ในเนื้อเยื่อ

หลายส่วนของตัวกุ้ง (กิจการ และคณะ, 2543 จ อ้างถึง Hose *et al.*, 1987; กิจการ และคณะ, 2543 จ อ้างถึง Soderhall, 1982; กิจการ และคณะ, 2543 จ อ้างถึง Soderhall *et al.*, 1990)

เซลล์และเนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมในกุ้งกุลาดำ

กิจการ และคณะ (2543 ง) พบว่า เหนือก ต่อม้ำเหลือง หัวใจ ตับ ตับอ่อน และเนื้อเยื่อเกี่ยวพันสามารถกำจัดสิ่งแปลกปลอมได้ดี ส่วนกล้ามเนื้อและระบบประสาทกำจัดได้เพียงเล็กน้อย โดยพบเซลล์เม็ดเลือด และเซลล์ที่จับกินอยู่กับที่ทำหน้าที่ในการดักจับสิ่งแปลกปลอมในเนื้อเยื่อดังกล่าว กลไกการกำจัดสิ่งแปลกปลอมเกิดขึ้นโดยเริ่มจากมีเซลล์เดี่ยวเข้ามาล้อมจับแล้วมีเซลล์เม็ดเลือดเข้ามารายล้อมมากขึ้นจนกลายเป็นลักษณะที่เรียกว่าโนคูลฟอร์เมชัน และเอนแคปซูลชัน สุดท้ายมีการสร้างเมลาโนซิน และถูกกำจัดออกนอกร่างกาย

ระบบภูมิคุ้มกันโรคของสิ่งมีชีวิตกลุ่มครัสเตเชียนในการต่อต้านสิ่งแปลกปลอมมีทั้งกิจกรรมที่เกิดขึ้นโดยการตอบสนองของเซลล์และของเหลวในร่างกาย (cellular and humoral response) (กิจการ และคณะ, 2543 ง อ้างถึง Rabin, 1970) ซึ่งกิจกรรมที่เกิดขึ้นมีหลายแบบคือ โปรตีนชนิดต่าง ๆ ในซีรัม เช่น แอกลูตินิน (agglutinin) ฮีโมไลซิน (hemolysin) ไลโซซายม์ (lysozyme) และโปรตีนที่ช่วยในการแข็งตัวของเลือด (clotting protein) เซลล์เม็ดเลือดซึ่งจะก่อให้เกิดกระบวนการเกาะกลุ่ม (adhesion) ฟาโกไซโตซิส การห่อหุ้มโดยวิธีเอนแคปซูลชัน และการสร้างเม็ดสี (melanization) และระบบอื่นที่เกี่ยวข้อง เช่น การแข็งตัวของเลือด และสมานแผล และระบบโปรตีนออกซิเดสแอคติเวติง ซิสเต็ม (Martin *et al.*, 1993)

เนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งคือต่อม้ำเหลือง (lymphoid organ) อวัยวะสร้างเม็ดเลือด (haemopoietic tissue) รวมทั้งอวัยวะต่าง ๆ ที่มีเซลล์จับกินอยู่กับที่กระจายอยู่ (Johnson, 1987)

จากการศึกษาของ กิจการ และคณะ (2543 ง) พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เม็ดเลือดกุ้งหลังจากที่ได้รับสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกายโดยจำนวนเม็ดเลือดจะลดลงทันทีในช่วง 1 ชั่วโมงแรก หลังจากที่ได้รับสิ่งแปลกปลอม ซึ่งในชุดควบคุมนับได้ $3.36 \pm 1.85 \times 10^4$ เซลล์/ลูกบาศก์มิลลิเมตร ในขณะที่ชุดที่ได้รับการฉีดเซลล์ยีสต์มีจำนวนเม็ดเลือด $2.12 \pm 1.96 \times 10^4$ เซลล์/ลูกบาศก์มิลลิเมตร และจำนวนเม็ดเลือดในชุดทดลองจะลดลงอย่างต่อเนื่องในช่วง 2 และ 3 ชั่วโมงที่ 2 และที่ 3 คือมีค่า

$1.95 \pm 1.21 \times 10^4$ และ $1.28 \pm 0.44 \times 10^4$ เซลล์/ลูกบาศก์มิลลิเมตร ตามลำดับ และหลังจากชั่วโมงที่ 4 เป็นต้นไป ปริมาณเม็ดเลือดจะไม่มีเปลี่ยนแปลง และจะอยู่ในระดับต่ำคงที่เมื่อเทียบกับชุดควบคุม โดยที่ปริมาณเม็ดเลือดในชุดควบคุมจะปกติอยู่ในระดับ $3.28 \pm 1.26 \times 10^4$ เซลล์/ลูกบาศก์มิลลิเมตร จากนั้นปริมาณเม็ดเลือดในกึ่งที่ได้รับเซลล์ยีสต์จะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นภายใน 24 ชั่วโมง หลังจากฉีดยีสต์และจะเข้าสู่ระดับปกติเมื่อเทียบกับชุดควบคุมภายใน 48 ชั่วโมง นอกจากนั้นพบว่าเหงือก หัวใจ และต่อมน้ำเหลือง เป็นบริเวณที่มีการกำจัดสิ่งแปลกปลอมได้ดี โดยเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการดักจับสิ่งแปลกปลอมจะมีเซลล์เม็ดเลือด และเซลล์ที่จับกินอยู่กับที่ โดยเมื่อฉีดยีสต์เข้าไปในตัวกึ่ง จะพบเซลล์ของยีสต์ในเนื้อเยื่อบริเวณดังกล่าวภายใน 1 ชั่วโมง ในระยะแรกของการจับกินจะมีเซลล์จับกินที่อยู่กับที่ และเซลล์เม็ดเลือดเดี่ยว ๆ เข้ามาจับกิน หลังจากผ่านไป 3-9 ชั่วโมง มีเซลล์เม็ดเลือดเข้ามาห้อมล้อมส่วนที่ถูกจับกินมากยิ่งขึ้น จนเห็นเป็นกลุ่มใหญ่ขึ้นที่เรียกว่า โนคูลูฟอร์เมชัน ซึ่งจากปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นจะมีผลทำให้ปริมาณเม็ดเลือดในระบบไหลเวียนลดน้อยลง และเมื่อเวลาผ่านไป 24-48 ชั่วโมง หลังจากฉีดยีสต์เข้าสู่ตัวกึ่งหรือมากกว่านั้น จะพบว่ามีเม็ดเลือดเข้ามาห้อมล้อมในส่วนที่ถูกจับกินมากยิ่งขึ้นจนกลายเป็นแคปซูลขนาดใหญ่ ซึ่งลักษณะดังกล่าวจะค่อย ๆ ถูกกำจัดออกไป เมื่อสิ่งแปลกปลอมถูกกำจัดออกนอกร่างกายเม็ดเลือดที่ถูกสร้างขึ้นมาก็กลับเข้าไปในระบบหมุนเวียน ปริมาณเม็ดเลือดจึงค่อย ๆ เพิ่มมากขึ้นจนเข้าสู่ภาวะปกติ

พบลักษณะของโนคูลูฟอร์เมชัน หรือแอนแคปซูลชัน กระจายอยู่ทั่วไปตามเนื้อเยื่อต่าง ๆ เช่น ต่อมน้ำเหลือง ตับและตับอ่อน หัวใจ เหงือก ซึ่งกระบวนการกำจัดสิ่งแปลกปลอมก็จะมีเซลล์เม็ดเลือดในระบบไหลเวียน และเซลล์จับกินกับที่ เข้ามาเกี่ยวข้องเป็นหลัก ในระยะสุดท้ายของการกำจัดสิ่งแปลกปลอมก็จะมีการสร้างเมลานินขึ้น เนื่องจากกระบวนการของโปรตีนออกซิเดส

Fontaine and Lightner (1974) พบว่าหลังจากฉีดอนุภาคของสีคาร์มีน (carmine) เข้าไปในเนื้อเยื่อกึ่งทะเล (*Penaeus setiferus*) ภายใน 1 ชั่วโมง จะมีการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดเข้ามาห้อมล้อมอนุภาคสี เซลล์ที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดอนุภาคสีก็จะมีทั้งเม็ดเลือด และเซลล์จับกินกับที่ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ โดยอนุภาคสีสามารถตรวจพบคงอยู่ในตัวกึ่งได้นาน 33 วัน

กิจการ และคณะ (2543 ง) รายงานว่า เซลล์จับกินกับที่เมื่อตรวจสอบโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่ากระจายอยู่ตามเนื้อเยื่อหลายส่วน เช่น หัวใจ เหงือก ทางเดินอาหาร ลักษณะของเซลล์จับกินกับที่ต่างจากเม็ดเลือดกึ่งคือไม่พบแกรนูลภายในไซโตพลาสซึม มีเวคคิวโอลขนาดใหญ่อยู่ในไซโตพลาสซึม และมักพบเศษเซลล์ (debris) และลักษณะของไมเซลลิน ฟิกเกอร์

(myelin figure) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการจับกินสิ่งแปลกปลอม และเกิดออตฟาจิคเวคคิวโอล (autophagic vacuoles) จากโครงสร้างที่พบแสดงให้เห็นว่ากระบวนการกำจัดสิ่งแปลกปลอมจากตัวกึ่งเกิดขึ้นได้ในเนื้อเยื่อเกือบทุกส่วนของร่างกาย ในกรณีที่สิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายเป็น สิ่งไม่ก่อให้เกิดโรคและไม่มีผลทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อต่าง ๆ ที่ตอบสนองสิ่งแปลกปลอมนั้น กึ่งก็สามารถจะทำลายและขับออกมาภายนอกตัวได้ แต่ถ้าสิ่งแปลกปลอมนั้นเป็นเชื้อโรค เช่น แบคทีเรียหรือไวรัสที่สามารถสร้างสารฮีโมไลซินย่อยสลายเม็ดเลือด สร้างเอนไซม์ไคตินเนส (chitinase) ย่อยสลายเปลือกกุ้งรวมถึงอนุภาคของไวรัส เชื้อรา และโปรโตซัวชนิดต่าง ๆ ที่เข้าทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อโดยตรง หรือสร้างสารรบกวนกิจกรรมของเซลล์และเนื้อเยื่อในการกำจัด สิ่งแปลกปลอมก็จะทำให้ระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายกึ่งลดลงและก่อให้เกิดโรคได้

เซลล์เม็ดเลือด (haemocytes) ในกึ่งกุลาดำ

เซลล์เม็ดเลือดของครัสเตเชียนแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มหลัก โดยใช้การมีหรือไม่มีกรานูลของ เซลล์เป็นหลัก คือเซลล์ไฮยาลิน และเซลล์ที่มีกรานูล (granular haemocyte) (กิจการ และคณะ, 2543 ก)

1. เซลล์ไฮยาลิน เป็นเซลล์เม็ดเลือดที่มีขนาดเล็กที่สุด รูปร่างแบน กลม ผิวเรียบ บางครั้ง อาจพบคล้ายรูปกระสวย หรือพระจันทร์เสี้ยว มีนิวเคลียสขนาดใหญ่อยู่ตรงกลางเซลล์ มีไมโทคอนเดรีย (mitochondria) สมูทเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม (smooth endoplasmic reticulum, SER) และร์ฟเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม (rough endoplasmic reticulum, RER) น้อย พบไซโตพลาสซึม กรานูล (cytoplasmic granules) เพียงเล็กน้อยหรือไม่มีเลย ลักษณะโครงสร้างไม่พบไมโครวิลไล (microvilli) หรือเท้าเทียม (pseudopodium) ที่ผิวเซลล์ ขนาดของเซลล์มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 6.4-8.3 ไมครอน (ในกรณีที่ เป็นเซลล์กลม) หรือมีความกว้าง 2.5-3.6 ไมครอน ยาว 6.8-13.9 ไมครอน (ในกรณีที่ เป็นเซลล์รูปรีหรือรูปกระสวย) หน้าที่เกี่ยวข้องกับการจับกินสิ่งแปลกปลอม หรือฟาโกไซโตซิส

2. เซลล์เซมิกรานูล (semigranular cell) มีรูปร่างเป็นรูปไข่หรือรูปกระสวย นิวเคลียสอยู่ตรงกลางหรือขอบ พบ SER และ RER ได้มาก มีไซโตพลาสซึมกรานูลมากขึ้น เป็นเซลล์ที่เกาะพื้นผิวแก้วได้ดี มีส่วนยื่นของเซลล์ (cell process) หรือเท้าเทียมค่อนข้างมาก บริเวณผิวเซลล์อาจพบไมโครวิลไลได้เล็กน้อย ขนาดของเซลล์มีความกว้าง 4.2-6.8 ไมครอน และยาว 9.0-14.2 ไมครอน

ลักษณะของกรานูลภายในไซโตพลาสซึม มีขนาดเล็กและพบจำนวนน้อย สังเกตเห็นได้ไม่ชัดเจน จากผิวหนังนอก ทำหน้าที่โดยตรงในการสร้างโนดูล และเอนแคปซูลชั้น รวมทั้งในระบบโปรตีนออกออกซิเดส

3. เซลล์จากรานูล (large granular cell) มีขนาดใหญ่ที่สุด รูปร่างเป็นรูปไข่ คล้ายกับเซลล์เซมิกรานูล แต่ขนาดของเซลล์จะโตกว่า นิวเคลียสอยู่บริเวณขอบ มี SER และ RER ปานกลาง และพบไซโตพลาสซึมกรานูลมาก ขนาดของกรานูลในไซโตพลาสซึมมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7-1.0 ไมครอนซึ่งใหญ่กว่ากรานูลในเซมิกรานูล ลักษณะการยึดของเท้าเทียมหรือส่วนยื่นของเซลล์ชนิดนี้ เห็นได้ชัดเจน ขนาดของเซลล์มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 8-10 ไมครอน ความยาว 12.2-14.6 ไมครอน และความกว้าง 7.2-7.8 ไมครอน มีหน้าที่หลักในการทำงานในระบบโปรตีนออกออกซิเดส (Soderhall and Cerenius, 1992)

การศึกษาปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของกิ้งกูดดำ

การศึกษาปัจจัยสิ่งแวดล้อมบางประการต่อองค์ประกอบเลือดและระบบภูมิคุ้มกันของกิ้งกูดดำ โดย กิจการ และคณะ (2543 ข) พบว่า ในสภาพที่ความเป็นกรดเป็นด่างของน้ำต่ำกว่าปกติ คือมีค่าเท่ากับ 6.0 จะไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณเม็ดเลือดรวม และความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส แต่มีผลให้ค่าความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียในน้ำเลือดลดลง แตกต่างจากชุดควบคุมที่มีค่าความเป็นกรดเป็นด่างปกติ คือมีค่าเท่ากับ 7.8

จากการศึกษาผลของปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ (DO) ที่มีต่อระบบภูมิคุ้มกันพบว่าในสภาวะที่ออกซิเจนที่ละลายน้ำต่ำ (0.9-1.2 มิลลิกรัม/ลิตร) มีผลให้ปริมาณเม็ดเลือดรวม ความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ค่าความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียในน้ำเลือด และความสามารถของเม็ดเลือดในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมลดลงเมื่อเทียบกับสภาวะที่มีออกซิเจนละลายน้ำปกติ (5.0-5.8 มิลลิกรัม/ลิตร)

ผลของอุณหภูมิต่อระดับภูมิคุ้มกันพบว่าในสภาวะที่อุณหภูมิต่ำ (25 องศาเซลเซียส) มีผลให้ปริมาณเม็ดเลือดรวม ความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส และค่าความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียในน้ำเลือดลดลงกว่ากลุ่มควบคุมที่เลี้ยงในสภาวะอุณหภูมิสูง (30 องศาเซลเซียส)

การศึกษาผลของโรคติดเชื้อต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ

การศึกษาผลของโรคติดเชื้อ 3 ชนิด คือ โรคติดเชื้อแบคทีเรียเรืองแสง (*Vibrio harveyi*) โรคติดเชื้อไวรัสดวงขาว (WSSV) และโรคติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง (YHV) ต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบเลือดและระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ พบว่าโรคติดเชื้อทั้ง 3 ชนิดทำให้ระบบภูมิคุ้มกันลดลงทั้งปริมาณเม็ดเลือดรวม ความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส และความว่องไวของเม็ดเลือดในจับกินสิ่งแปลกปลอม โดยที่โรคติดเชื้อไวรัสส่งผลให้ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำลดลงได้มากกว่าโรคติดเชื้อแบคทีเรีย (กิจการ และคณะ, 2543 ก)

เม็ดเลือดของกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง พบว่าการติดเชื้อดังกล่าวทำให้ลักษณะของเม็ดเลือดมีการเปลี่ยนแปลงอย่างเห็นได้ชัด คือจะสร้างเท่าเทียมน้อยลง ลักษณะโครงสร้างของผิวเซลล์จะเรียบ เซลล์จะหดตัวเล็กลง เซลล์เกาะพื้นได้ไม่ดี นิวเคลียสมีการแตกตัวออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ (karyorrhexis) ทำให้เกิดการตายของเซลล์ (กิจการ และคณะ, 2543 ก)

เม็ดเลือดที่ติดเชื้อไวรัสดวงขาว พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เม็ดเลือดอย่างชัดเจนคือระยะแรกของการติดเชื้อจะเกิดการเปลี่ยนแปลงของโครมาตินภายในนิวเคลียสทำให้จางลง (chromatin liquefaction) ขนาดนิวเคลียสมีขนาดใหญ่ขึ้น ออร์แกเนลต่าง ๆ ภายในไซโตพลาสซึมลดจำนวนลง รวมทั้งกรานูลก็จะลดจำนวนลงเช่นเดียวกัน เซลล์เม็ดเลือดจะเปลี่ยนเป็นเซลล์กลมและผิวเซลล์จะเรียบขึ้น ในบางครั้งอาจพบลักษณะของโนคูลฟอร์เมชัน ซึ่งเกิดจากเซลล์เม็ดเลือดปกติเข้ามาจับกินเม็ดเลือดที่ติดเชื้อไวรัส และเกาะกันเป็นกลุ่ม (กิจการ และคณะ, 2543 ก)

Supamattaya *et al.* (1994) พบว่าหลังจากการติดเชื้อไวรัสดวงขาวและหัวเหลืองจะทำให้ปริมาณเม็ดเลือดในระบบไหลเวียนลดลงอย่างมาก รวมทั้งค่าความว่องไวของฟีนอลออกซิเดสก็ลดลงด้วย เนื่องจากจำนวนกรานูลในไซโตพลาสซึมของเซลล์เม็ดเลือดลดลง

Parrazzolo and Barracco (1997) พบว่า แอคติวิตีของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสขึ้นอยู่กับการทำงานของเม็ดเลือดชนิดที่มีกรานูล และเอนไซม์บางส่วนในซีรัม เมื่อมีการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองและดวงขาว จะส่งผลให้กรานูลในเม็ดเลือดลดลงจึงทำให้ความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสลดลงด้วย

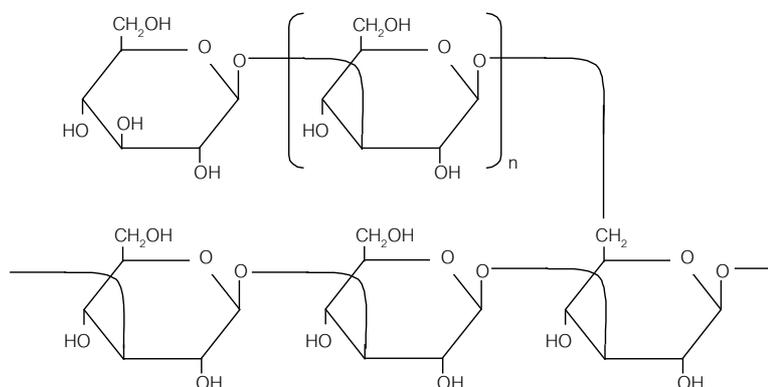
สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Immunostimulant)

เบต้ากลูแคน เปปติโดกลัยแคน และไลโปโพลีแซคคาไรด์ สามารถกระตุ้นการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดให้สูงขึ้นได้ (Goldenberg *et al.*, 1984; Smith *et al.*, 1984) โดยสารเหล่านี้จะเป็นตัวกระตุ้นในกระบวนการเปลี่ยนโปรฟีนอลออกซิเดส ซึ่งเป็นโปรเอนไซม์ (proenzyme) ไปเป็นฟีนอลออกซิเดส โดยมีซีรีนโปรติเอส (serine protease) เป็นตัวช่วย ฟีนอลออกซิเดสจะมีบทบาทสำคัญในขั้นตอนการกำจัดสิ่งแปลกปลอมในร่างกายกึ่ง เช่นเป็นตัวเร่งให้เลือดแข็งตัว มีความไวในการเกาะผิวของสิ่งแปลกปลอมและดึงดูดให้เม็ดเลือดมาจับกินได้เร็วขึ้น

ถ้ากึ่งกลูตาได้รับการกระตุ้นด้วยสารที่เป็นส่วนประกอบของไลโปโพลีแซคคาไรด์ และเปปติโดกลัยแคน ซึ่งมีอยู่ในผนังเซลล์แบคทีเรียในระดับที่เหมาะสมก็สามารถทำให้ระบบภูมิคุ้มกันในตัวกึ่งสูงขึ้นและป้องกันโรคติดเชื้อในกึ่งได้มากขึ้น (กิจการ และคณะ, 2543จ อ้างถึง Unestam and Soderhall, 1977)

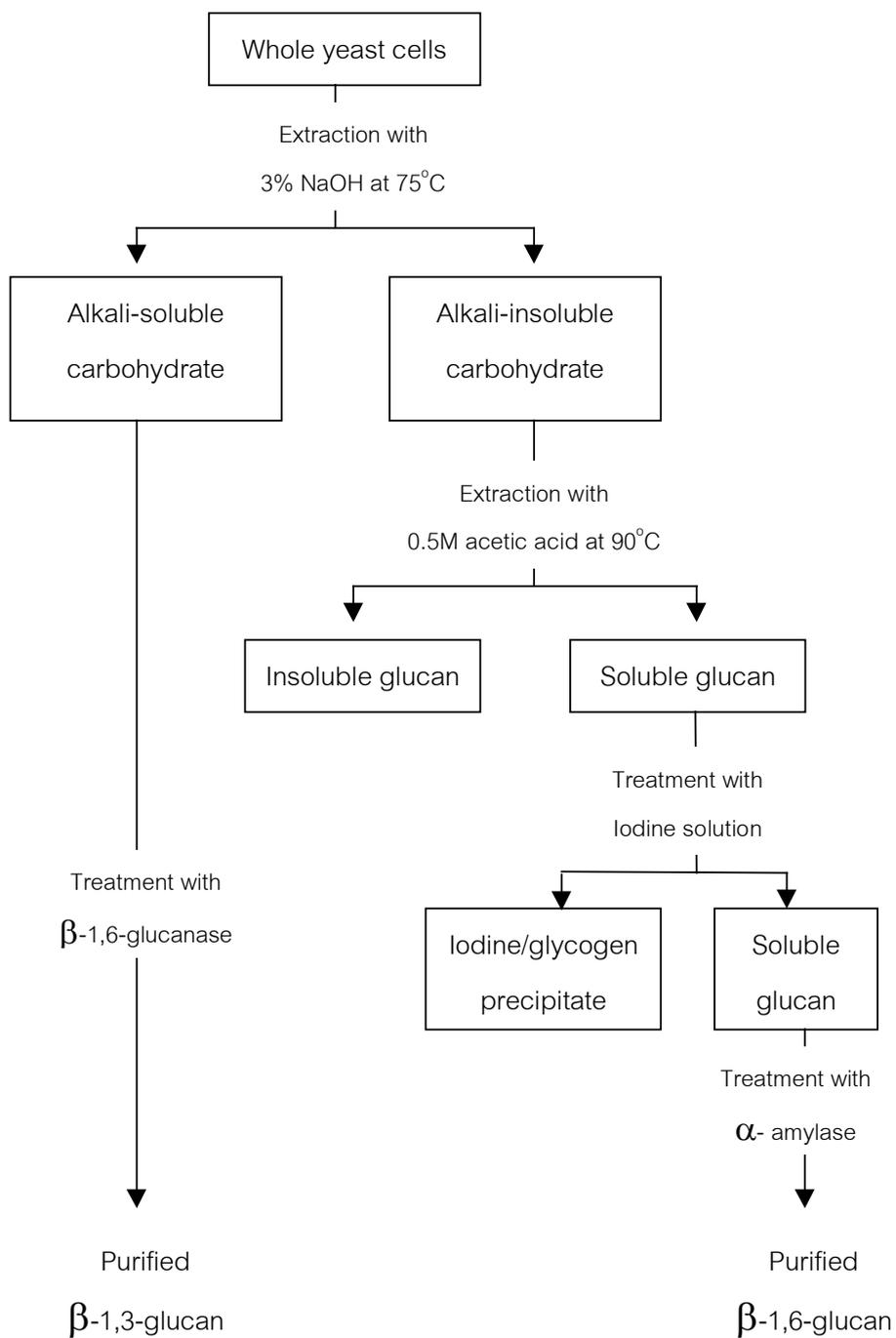
Sritunyalucksana *et al.* (1999) ได้ทำการทดลองโดยให้กึ่งกลูตากินอาหารผสมส่วนประกอบของผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ ได้แก่ เปปติโดกลัยแคน ไลโปโพลีแซคคาไรด์ และเบต้ากลูแคน เพื่อดูคุณสมบัติการตกตะกอนของเลือด ปฏิกริยาต่อต้านแบคทีเรีย และปฏิกริยาฟีนอลออกซิเดส จากการทดลองพบว่าไลโปโพลีแซคคาไรด์ มีผลต่อกลไกการแข็งตัวของเลือด และปฏิกริยาด้านทานแบคทีเรีย

เบต้ากลูแคน



โครงสร้างของเบต้ากลูแคน

(Poly-[1-6]-beta -D-Glucopyranosyl-[1-3]-beta D-Glucopyranose) (Dijkgraaf *et al.*, 2002)



ขั้นตอนการสกัดสารเบต้ากลูแคน (Dijkgraaf *et al.*, 2002)

การกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกึ่งกลูตาดีเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของความต้านทานต่อสิ่งแปลกปลอมต่าง ๆ ที่เข้ามายังตัวกึ่ง สารเบต้ากลูแคนสามารถที่จะเข้าไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของกึ่งให้มีประสิทธิภาพเพิ่มสูงขึ้น โดยสารเบต้ากลูแคนจะทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นระบบโปรพีโอ (proPO หรือ prophenoloxidase activating system) ให้กำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ตัวกึ่งได้ (มฤตติ และคณะ, 2543 อ้างถึง Knaap, 1993)

สารเบต้ากลูแคนสามารถสกัดได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น รา แบคทีเรีย และยีสต์ สำหรับ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นยีสต์ที่มีกลูแคนเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ประมาณ 29 เปอร์เซ็นต์ สามารถที่จะสกัดสารเบต้ากลูแคนเพื่อนำไปใช้ในการกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันในกึ่งกลูตาดีได้ (มฤตติ และคณะ, 2543)

มฤตติ และคณะ (2543) ได้ทำการทดลองเลี้ยงกึ่งกลูตาดีในห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 45 วัน โดยผสมอาหารกึ่งกลูตาดี 4 สูตร คือ สูตรที่ 1 เป็นอาหารชุดควบคุม สูตรที่ 2 เป็นอาหารที่ผสมผนังเซลล์ยีสต์ โดยใช้ผนังเซลล์เท่ากับ 8.4 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม สูตรที่ 3 เป็นอาหารที่ผสมสารเบต้ากลูแคนที่ยังไม่ผ่านขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ (crude glucan) 1.7 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม สูตรที่ 4 เป็นอาหารที่ผสมสารเบต้ากลูแคนที่ผ่านขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ (pure glucan) 1 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม พบว่ากึ่งกลูตาดีที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ผสมสารเบต้ากลูแคนที่ผ่านขั้นตอนการทำบริสุทธิ์มีปริมาณเม็ดเลือดรวมสูงกว่ากึ่งกลูตาดีในกลุ่มทดลองอื่น แสดงว่าสารเบต้ากลูแคนจะสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดีที่สุดเมื่ออยู่ในรูปที่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์แล้ว ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องจากสารเบต้ากลูแคนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จะประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเล็ก เช่น กลูโคส ซึ่งง่ายต่อการดูดซึมเข้าสู่ระบบเลือดของกึ่ง แตกต่างจากสารเบต้ากลูแคนที่ยังไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ที่มีอนุภาคขนาดใหญ่ประกอบอยู่ ดังนั้นการดูดซึมเข้าสู่ระบบเลือดจะเป็นไปได้ช้ากว่าสารเบต้ากลูแคนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ (มฤตติ และคณะ, 2543 อ้างถึง Manners *et al.*, 1973) จึงทำให้การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในกึ่งเกิดได้ช้าตามไปด้วย เช่นเดียวกับการใช้ผนังเซลล์ผสมในอาหารเพราะผนังเซลล์มีองค์ประกอบที่มีขนาดใหญ่ ส่วนกึ่งในชุดควบคุมระบบภูมิคุ้มกันจะมีน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับกึ่งในชุดการทดลองอื่น ๆ ที่มีการผสมสารเบต้ากลูแคนในอาหาร

กึ่งกลูตาดีที่ได้รับสารเบต้ากลูแคนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ผสมในอาหาร สามารถที่จะกำจัดเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุด ทั้งนี้เป็นผลเนื่องจากสารเบต้ากลูแคนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในกึ่ง ส่งผลให้ระบบภูมิคุ้มกันในกึ่งเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็ว และมีประสิทธิภาพ

ทันทีที่กึ่งได้รับเชื้อแบคทีเรียเข้าสู่ร่างกาย โดยเห็นได้จากการฉีดเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* เข้าในตัวกึ่ง เพื่อทดสอบความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรียพบว่ากึ่งที่ได้รับสารเบต้ากลูแคนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มีอัตราการรอดตายสูงสุด และอัตราการรอดตายของกึ่งในชุดการทดลองที่ได้รับสารเบต้ากลูแคนมีอัตราการรอดสูงกว่ากึ่งในชุดควบคุม ทั้งนี้เป็นผลเนื่องจากกึ่งได้รับสารเบต้ากลูแคน ส่งผลให้ระบบภูมิคุ้มกันของกึ่งสามารถกำจัดเชื้อโรครอกนอกร่างกายมากขึ้น (มฤดี และคณะ, 2543)

Devaraja *et al.* (1998) พบว่ากึ่งกุลาคำที่ได้รับอาหารที่ผสมกลูแคนระดับ 0.1 เปอร์เซ็นต์ เพียงวันเดียว สามารถชักนำให้เม็ดเลือดและน้ำเลือดฆ่าไวรัสได้สูงขึ้น

Vargas-Albores *et al.* (1998) พบว่าสารประกอบจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียและเชื้อรา คือ ไกลโคโพลีแซคคาไรด์ และสารเบต้ากลูแคน จะมีผลให้ระบบภูมิคุ้มกันแบบเซลล์ลูลาร์ เช่น ฟาโกไซโตซิส เมลาโนไซตัน เอ็นแคปซูลชัน และกระบวนการแข็งตัวของเลือดกึ่งสูงขึ้น

มฤดี และคณะ (2543) อ้างถึง Knaap (1993) ซึ่งรายงานว่ สารพวกไมโครเบียลโพลีแซคคาไรด์ (microbial polysaccharide) เช่น เปปติโดกลัยแคน ไกลโคโพลีแซคคาไรด์ และเบต้ากลูแคน จะมีผลในการกระตุ้นที่ฮิมอลิมพ์ให้เกิดการเชื่อมต่อของเบต้า 1,3 กลูแคน และ เบต้า 1,3 กลูแคนบายดิง โปรตีน (β -1,3 glucan binding protein) ให้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน (complex) แล้วไปกระตุ้นที่เมมเบรน รีเซปเตอร์ (membrane receptor) ของเซมิเกรนูลาร์เซลล์ ให้เกิดการหลั่งสารต่าง ๆ ออกมา เช่นเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ซึ่งทำให้เกิดการออกซิไดส์สารฟีนอลให้เป็นควิโนน แล้วเปลี่ยนเป็นเมลานินที่ทำหน้าที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคที่เข้าสู่ร่างกาย

มฤดี และคณะ (2543) อ้างถึง Sung *et al.* (1994) ซึ่งพบว่ากึ่งกุลาคำที่แช่ในสารละลายเบต้ากลูแคนเข้มข้น 0.5 และ 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร แล้วนำมาแช่ในสารละลายเชื้อแบคทีเรีย *V. vulnificus* ความเข้มข้น 5×10^7 CFU/มิลลิลิตร นาน 12 ชั่วโมง จะต้านทานเชื้อได้นาน 18 วัน

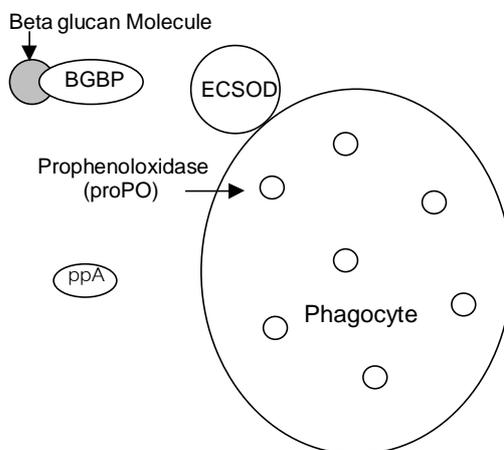
Itami *et al.* (1994) รายงานว่าความว่องไวของเม็ดเลือดในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมของกึ่ง kuruma (*P. japonicus*) ที่ได้รับอาหารที่ผสมเบต้า 1,3 กลูแคน 0.01 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 วัน หรือระดับ 0.005 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 วัน มีค่าสูงขึ้น และยังพบว่าความสามารถในการต้านทานเชื้อโรคได้สูงกว่ากึ่งในชุดควบคุม

Supamattaya *et al.* (2000) ได้ทดลองเลี้ยงกุ้งกุลาดำ 3 ขนาด น้ำหนักเฉลี่ย 0.6, 1.5 และ 6.5 กรัม โดยใช้อาหารผสมสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (β -glucan : MacroGard® ซึ่งได้มาจาก *Saccharomyces cerevisiae*) 4 ระดับ คือ 0, 0.25, 0.50 และ 1.0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 10 สัปดาห์ พบว่าไม่มีผลต่อการเจริญเติบโต อัตราการรอดตาย และการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ในกุ้งทดลองทั้ง 3 ขนาด เมื่อทดสอบความสามารถในการต้านทานโรคติดเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ของกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันระดับต่าง ๆ กันเป็นเวลา 6 สัปดาห์ ในกุ้งกุลาดำขนาด 0.6 กรัม และ 5 สัปดาห์ ในกุ้งกุลาดำขนาด 6.5 กรัม พบว่ากุ้งกุลาดำมีอัตราการรอดสูงขึ้น เมื่อได้รับอาหารผสมสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปริมาณสูงขึ้น โดยกุ้งกุลาดำขนาด 0.6 กรัม ที่ได้รับอาหารผสมสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน 0, 0.25, 0.50 และ 1.0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีอัตราการรอด 50, 68, 69 และ 81 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนกุ้งกุลาดำขนาด 6.5 กรัม มีอัตราการรอด 33, 33, 60 และ 73 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ปริมาณเม็ดเลือดรวม และการผลิตซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออนของเม็ดเลือด กุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันทั้ง 4 ระดับ พบว่าค่าสูงสุดได้จากชุดการทดลอง ที่ได้รับอาหารผสมสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน 1.0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม

ความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียในน้ำเลือดของกุ้งกุลาดำหลังจากได้รับอาหารผสมสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน 1.0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียในน้ำเลือดได้ดี ในขณะที่กุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชุดการทดลองอื่น ๆ มีค่าใกล้เคียงกับชุดควบคุม และพบว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันทั้ง 3 ระดับคือ 0.25, 0.50 และ 1.0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 11 สัปดาห์ จะมีค่าความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียในน้ำเลือดสูงกว่ากุ้งในชุดควบคุม

จากการทดลองของ Suphantharika *et al.* (2003) ได้ทดลองใช้ brewer's yeast β -glucan (BYG) ซึ่งมีปริมาณของคาร์โบไฮเดรตและกลูแคนอยู่สูง โดยมีคาร์โบไฮเดรต 92 เปอร์เซ็นต์ และกลูแคน 51 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/น้ำหนัก) และมีโปรตีนในปริมาณต่ำ 1.6 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ทดลองแบบ *in vivo* พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในการที่ BYG จะไปเพิ่มฟีนอลออกซิเดสแอกติวิตีในเลือดของกุ้งกุลาดำ โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้ใช้ BYG เช่นเดียวกับการทดลองแบบ *in vivo* ซึ่งให้โดยการกิน 0.2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ในอาหารเป็นเวลา 3 วัน พบว่าไปเพิ่มฟีนอลออกซิเดสแอกติวิตีของกุ้งกุลาดำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาการกระตุ้นโดยเบต้ากลูแคน



ขั้นตอนที่ 1 เบต้ากลูแคนเชื่อมกับ BGBP เพื่อที่จะสร้าง opsonin โดยที่

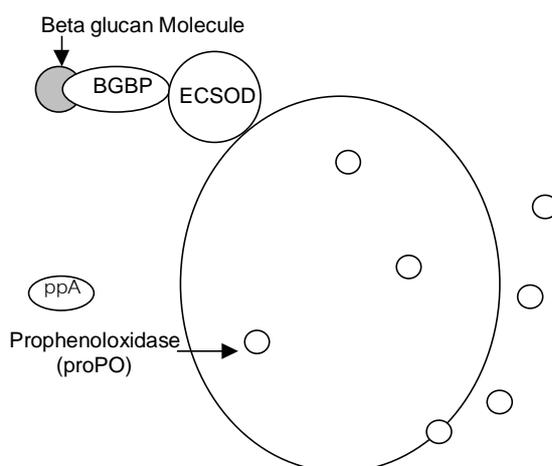
ProPO = prophenoloxidase เป็นเอนไซม์ที่ยังไม่ active

ECSOD = Extracellular super oxide dismutase เป็น โมเลกุลที่เกาะกับผิวเซลล์

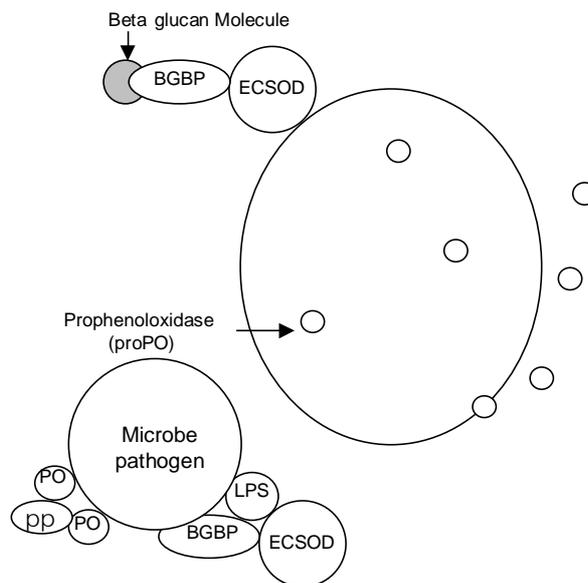
BGBP = beta glucan binding protein เป็น โปรตีนที่สามารถจำแนกแบบ (pattern recognition protein)

ppA = proPO activating enzyme จะอยู่ในสภาพพร้อมทำงานเมื่อมีจุลินทรีย์

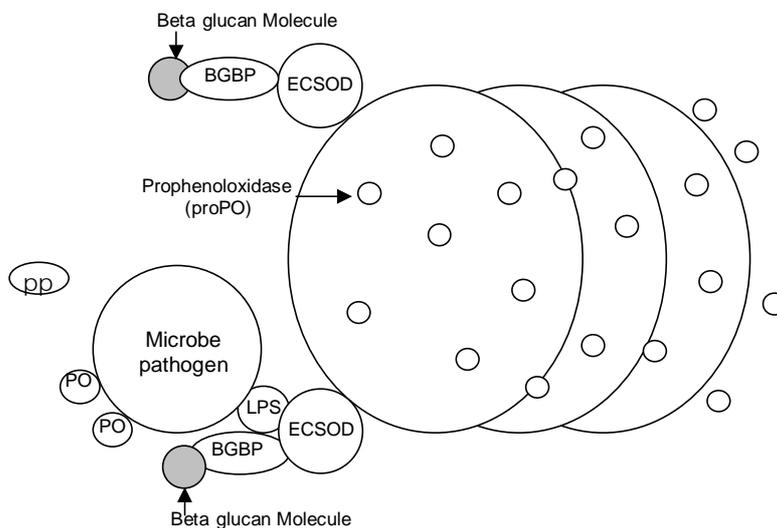
LPS = lipopolysaccharides เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ของแบคทีเรีย



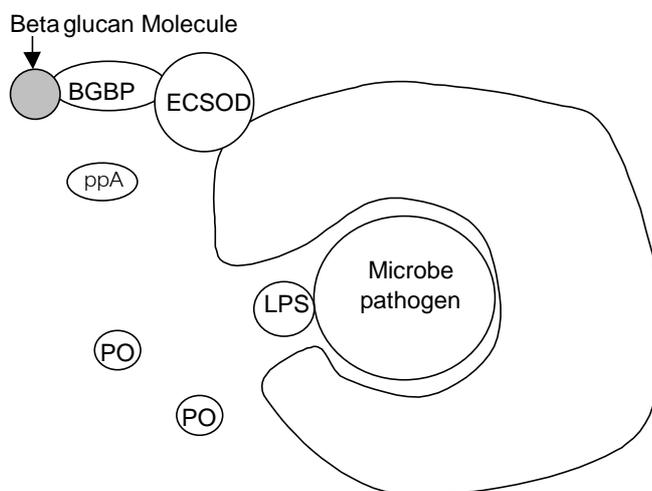
ขั้นตอนที่ 2 opsonin จะทำการเชื่อมกับ ECSOD เป็น โมเลกุลที่เกาะกับผิวเซลล์ ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันสูงขึ้น โดยที่ยังไม่มีเชื้อโรคเข้ามาในระบบเลือด



ขั้นตอนที่ 3 opsonin จะทำการเชื่อมกับเชื้อโรคที่ถูกล้อมจับไว้ (encapsulates microbe) ProPO จะเปลี่ยนไปเป็น PO โดยการกระตุ้น ppA

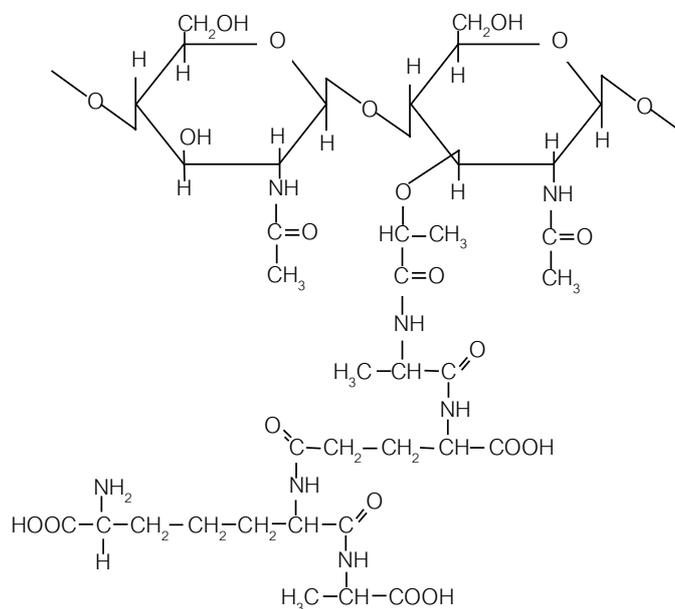


ขั้นตอนที่ 4 BGBP จะเชื่อมกับ ESCOD receptor site เชื้อจุลินทรีย์ถูกสารพิษจาก PO เข้าทำลาย เซลล์ที่ทำหน้าที่กลืนกินสิ่งแปลกปลอมเพิ่มจำนวนขึ้น



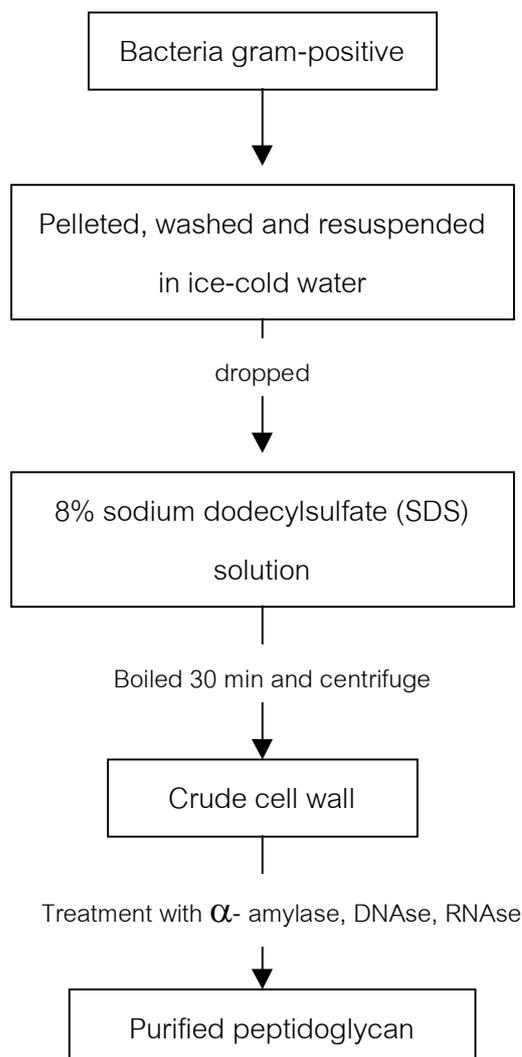
ขั้นตอนที่ 5 เซลล์ที่ทำหน้าที่กลืนกินสิ่งแปลกปลอมจะกลืนกินสิ่งแปลกปลอมเข้าไป และปล่อยสารที่เป็นพิษมากขึ้นออกมา

เปปติโดกลัยแคน



โครงสร้างของเปปติโดกลัยแคน

β -[1-4]-O-[2-acetamido-2-deoxy-beta-D-glucopyranosyl]- β -[1-4]- [2-acetamido-3-O-[D-1-carboxyethyl]-2-deoxy-beta-D-glucopyranosyl] (Heidrich and Vollmer, 2002)



ขั้นตอนในการสกัดสารเปปติโดกลัยแคน (Heidrich and Vollmer, 2002)

มะลิ และคณะ (2543) ได้ทดลองใช้สารสกัดจากผนังเซลล์แบคทีเรีย คือเปปติโดกลัยแคน 2 ชนิดคือ high molecular peptidoglycan (hm-PG) และ low molecular peptidoglycan (lm-PG) ที่สกัดจากเชื้อแบคทีเรีย *Bifidobacterium thermophilum* นำมาผสมอาหารให้กิ้งกูดำกิน 3 ระดับ ความเข้มข้นคือ 0 เปอร์เซ็นต์ 0.01 เปอร์เซ็นต์ hm-PG และ 0.0085 เปอร์เซ็นต์ lm-PG โดยให้กิ้งกูดำกินอาหารทดลองเป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่าเม็ดเลือดของกิ้งกูดำที่ได้รับอาหารผสมเปปติโดกลัยแคน มีความสามารถในการผลิตซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน ได้ดีกว่ากิ้งกูดำที่ได้รับอาหารปกติ แต่ไม่พบความแตกต่างของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในไซโตพลาสซึมของเม็ดเลือดกิ้งกูดำที่ได้รับอาหารทั้ง 3 ชุดการทดลอง

เมื่อวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียในน้ำเลือดของกึ่งกลาดำทั้ง 3 ชุด การทดลอง พบว่ากึ่งกลาดำที่ได้รับอาหารผสม PG จะมีความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียออกจากน้ำเลือดสูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ชุดควบคุมที่ไม่ได้รับเปปติโดกลัยแคน มีความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียออกจากน้ำเลือดเพียง 50 เปอร์เซ็นต์

กึ่งกลาดำที่ได้รับอาหารเสริมเปปติโดกลัยแคน มีความสามารถในการต้านทานเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ได้ดีกว่ากึ่งกลาดำชุดควบคุม โดยกึ่งกลาดำที่ได้รับอาหารเสริม hm-PG และ lm-PG มีอัตราการรอด 61 และ 70 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ชุดควบคุมมีอัตราการรอดเพียง 10 เปอร์เซ็นต์

เมื่อพิจารณาจากความสามารถในการผลิตซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน ของเม็ดเลือด และความต้านทานโรคแบคทีเรียของกึ่งกลาดำที่ได้รับอาหารทดลอง พบว่า lm-PG มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต้านโรคได้ดีกว่า hm-PG

โพรไบโอติก

โพรไบโอติก คือจุลินทรีย์ซึ่งอาจมีเพียงชนิดเดียว หรือเป็นส่วนผสมของจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถไปปรับปรุงคุณสมบัติของจุลินทรีย์ดั้งเดิมที่อาศัยอยู่ในลำไส้ของสัตว์นั้น โดยจุลินทรีย์เหล่านี้อาจอยู่ในรูปของเซลล์แห้งจากกระบวนการระเหิดแห้ง (freeze-dried cells) หรืออยู่ในรูปผลิตภัณฑ์หมักซึ่งนอกจากไปส่งเสริมการเจริญเติบโตแล้ว ยังทำให้สัตว์มีสุขภาพดีขึ้นด้วย

มีผู้ให้คำจำกัดความของโพรไบโอติกไว้หลายความหมายดังต่อไปนี้

Fuller (1992) โพรไบโอติกเป็นการเลี้ยงจุลินทรีย์ที่มีชีวิตในอาหาร ซึ่งจะไปมีผลต่อการปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ ซึ่งจากคำจำกัดความนี้โพรไบโอติกจะต้องเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิต และให้กับ host โดยการผสมอาหาร

Gram *et al.* (1999) ได้กล่าวว่าโพรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อสิ่งมีชีวิตโดยการปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในร่างกาย โดยที่ไม่จำเป็นต้องให้โพรไบโอติกโดยการผสมอาหาร

Salminen *et al.* (1999) ได้กล่าวว่าโพรไบโอติกเป็นกลุ่มของจุลินทรีย์ซึ่งไม่จำเป็นต้องมีชีวิต แต่ได้มาจากเซลล์ของจุลินทรีย์ และมีประโยชน์ต่อสิ่งมีชีวิตที่ได้รับโพรไบโอติกเข้าไป

Moriarty (1998) ได้กล่าวว่าโพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจะรวมถึงการใส่แบคทีเรียลงในบ่อ หรือถึงเลี้ยงสัตว์น้ำ

Maeda *et al.* (1997) ได้กล่าวว่าโพรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อร่างกายของสิ่งมีชีวิต โดยการทำงานแบบ biological control

อย่างไรก็ตามโพรไบโอติกต้องไม่ทำอันตรายต่อเจ้าบ้าน (Salminen *et al.*, 1999) และควรที่จะสามารถมีประสิทธิภาพในสภาพที่มีอุณหภูมิและความเค็มหลาย ๆ ช่วง (Fuller, 1992) วิธีการให้อาจให้โดยการผสมอาหาร การแช่ หรือโดยการฉีดเข้าไป นอกจากนี้ โพรไบโอติกนั้นจะต้องเป็นประโยชน์ต่อสิ่งมีชีวิตที่ได้รับเข้าไป รวมทั้งสามารถที่จะมีชีวิตอยู่ในระบบทางเดินอาหารได้

คุณสมบัติของโพรไบโอติก

คุณสมบัติที่สำคัญที่นำมาใช้สำหรับการคัดเลือกแบคทีเรียที่จะนำมาใช้เป็นโพรไบโอติกในสัตว์น้ำนั้น ควรมีคุณสมบัติต่อไปนี้ (อัครเดช, 2545) คือ

1. ควรเป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการต่อต้านแบคทีเรียที่ก่อโรคได้ โดยอาจแสดงผลในหลอดทดลองว่ามีความสามารถในการแข่งขันการใช้สารอาหารหรือผลิตสารเพื่อฆ่าหรือยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อโรค
2. มีความสามารถในการเกาะยึดลำไส้ได้ หรือสามารถอยู่ในลำไส้ได้ชั่วระยะเวลาหนึ่ง
3. ทำให้เจ้าบ้านแข็งแรงมีความต้านทานโรคโดยมีการยืนยันผลด้วยการทดสอบการต้านทานโรค (challenge test)
4. มีความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้

ประโยชน์ของโพไบโอติก

โดยทั่วไปจะใช้โพไบโอติกเพื่อต่อสู้กับผลกระทบจากความเครียดที่เกี่ยวข้องกับระบบการเลี้ยงแบบหนาแน่นหรือการเลี้ยงในระบบปิด ความเครียดเหล่านี้มักเกิดขึ้นอยู่ตลอดเวลา ดังนั้นจึงมีการใช้โพไบโอติกผสมในอาหารให้กึ่งกลาดำกินก่อนที่จะเกิดความเครียดขึ้น ตัวอย่างเช่น ในกรณีการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมของกึ่งกลาดำ ได้แก่การเปลี่ยนถ่ายน้ำ หรือมีการเปลี่ยนแปลงของสภาพอากาศ พบว่าการให้โพไบโอติกช่วยลดการเกิดความผิดปกติของระบบการย่อยอาหารลง อัตราการเจริญเติบโตต่อวันโดยเฉลี่ยเพิ่มขึ้น และอัตราการให้อาหารก็ลดต่ำลง ในขณะที่ได้น้ำหนักกึ่งเท่าเดิมหรือมากขึ้น เนื่องจากประสิทธิภาพในการนำอาหารไปเปลี่ยนเป็นเนื้อดีขึ้น โพไบโอติกยังใช้ได้ตลอดเวลาที่ไม่เกิดความเครียดเพื่อให้จุลชีพประจำถิ่นที่มีความสมดุลในทางลบกลับมาอยู่ในสมดุลทางบวกในเวลาเร็วที่สุดเท่าที่เป็นไปได้เพื่อลดอัตราการสูญเสียผลผลิตสถานการณ์ที่คล้ายกันนี้อาจเกิดขึ้นได้ในกรณีของลูกกึ่งกลาดำที่นำมาปล่อยลงสู่บ่อเลี้ยงใหม่ ๆ หรือการย้ายกึ่งจากบ่อหนึ่งไปสู่อีกบ่อหนึ่ง ซึ่งกึ่งจะต้องย้ายเข้าไปอยู่ในสภาพแวดล้อม และแหล่งอาหารใหม่ (อัครเดช, 2545)

สาเหตุอีกข้อหนึ่งที่ทำให้นิยมใช้โพไบโอติกในการเลี้ยงกึ่งคือ คุณสมบัติในการกระตุ้นการกินอาหาร โดยพบว่าความต้องการอาหารจะมากขึ้นกว่าไม่มีการใช้โพไบโอติก ซึ่งสามารถสังเกตเห็นความเปลี่ยนแปลงได้ชัดเจนจากปริมาณกึ่งที่เข้ามามากขึ้นกว่าปกติ รวมทั้งกึ่งจะยาวและใหญ่กว่าให้อาหาร โดยไม่มีโพไบโอติก นั่นย่อมแสดงว่ากึ่งได้รับอาหารมากขึ้น

การใช้โพไบโอติกเพื่อช่วยสร้างจุลชีพประจำถิ่นที่เป็นประโยชน์โดยเฉพาะอย่างยิ่งหากสัตว์ถูกเลี้ยงในสภาพแวดล้อมที่สกปรกมาก โพไบโอติกอาจช่วยแก้ปัญหาแรกเริ่มของประสิทธิภาพการดูดซึมอาหารเข้าไปใช้ประโยชน์ของสัตว์น้ำ และสร้างความสมบูรณ์เพื่อให้เกิดการเจริญเติบโตที่รวดเร็ว ข้อบ่งชี้ทั่วไปทำให้เห็นประโยชน์ของประโยชน์ของโพไบโอติกในการช่วยสร้างจุลชีพประจำถิ่นที่เป็นประโยชน์ขึ้นในระบบทางเดินอาหารของกึ่ง หรือประโยชน์ในการสร้างความสมดุลขึ้นมาใหม่อีกครั้งในสัตว์น้ำที่มีความเครียดสูง

การทำงานของโพรไบโอติก

ถึงแม้ว่าการใช้โพรไบโอติกจะมีใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมาเป็นเวลานานกว่า 10 ปีมาแล้วก็ตาม แต่สิ่งที่ยังเป็นข้อโต้แย้งกันอยู่เสมอคือกลไกการออกฤทธิ์ของโพรไบโอติก จึงได้มีการศึกษากลไกการทำงานในการทดลองต่าง ๆ ซึ่งผลการทดลองที่ได้จากสัตว์บก ได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในสัตว์น้ำ โดยเฉพาะในกลุ่มของแบคทีเรีย *lactic acid bacteria* ที่สามารถลดการเจริญของเชื้อที่ก่อโรคราในรากพืชได้แก่ *fluorescent Pseudomonas spp.* ถึงแม้ว่าการศึกษานี้จะเป็นการศึกษาที่ค่อนข้างเฉพาะทางในสาขาพืช แต่การทำงานของจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ มักจะมีความคล้ายคลึงกัน ได้มีการศึกษาภายในตัวสัตว์ทดลองเกี่ยวกับการใช้โพรไบโอติก รวมทั้งความสามารถในการเพิ่มจำนวนและรักษาระดับของมันในร่างกายสิ่งมีชีวิต การผลิตสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้ออื่นในลำไส้ และการที่จุลินทรีย์สามารถที่จะมีชีวิตอยู่ในลำไส้ของเจ้าบ้าน โดยที่ไม่ถูกย่อย

Prieur (1981) ได้ทดลองเกี่ยวกับการเลือกนำเข้าไปในเซลล์ และการย่อยของจุลินทรีย์ในหอยสองฝา *Mytilus edulis* การเลือกจุลินทรีย์ที่นำมาใช้เป็นโพรไบโอติกนั้นถ้าจะจุลินทรีย์ถูกกินเข้าไปแล้วไม่สามารถที่จะเพิ่มจำนวนได้ในลำไส้ การใช้โพรไบโอติกนั้นต้องใส่ไปในปริมาณมากในลำไส้ซึ่งก็ไม่มีความเป็นไปได้ในการที่จะนำเชื่อนั้นมาเป็นโพรไบโอติก กลไกการทำงานที่สำคัญของโพรไบโอติก คือต้องมีความสามารถในการเพิ่มจำนวน และเจริญเติบโตในบริเวณที่ต้องการ การทำงานของโพรไบโอติกนั้นมีหลายอย่างเช่นการสร้างสารที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโต การแข่งขันในการใช้สารเคมีและพลังงานแข่งขันในการยึดเกาะ การเพิ่มการตอบสนองระบบภูมิคุ้มกัน การเพิ่มคุณภาพน้ำ การทำปฏิกิริยาต่อแพลงก์ตอนพืช การเป็นแหล่งธาตุอาหาร การผลิตเอนไซม์ในการย่อย

1. การผลิตสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโต

กลุ่มของจุลินทรีย์มักจะปล่อยสารเคมีออกมา โดยสารเคมีนั้นจะมีฤทธิ์เป็นสารฆ่าแบคทีเรีย (bactericidal) หรือควบคุมแบคทีเรีย (bacteriostatic) ซึ่งคุณสมบัตินี้สามารถที่จะเกิดการแข่งขันในการใช้สารเคมี หรือพลังงาน (Lemos *et al.*, 1991) การที่มีแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตในลำไส้ของเจ้าบ้าน หรือบนพื้นผิว หรือบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จะเป็นการป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้ออื่น

การผลิตสารที่มีคุณสมบัติในการต้านทานเชื้อแบคทีเรียจะขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง ซึ่งบางครั้งมีปัจจัยเดียว หรืออาจเกิดจากหลาย ๆ ปัจจัยร่วมกันในการผลิตสารปฏิชีวนะ (antibiotics) (Williams and Vickers, 1986) สารต้านทานแบคทีเรีย (bacteriocins) (Bruno and Montville, 1993; Vandenberg, 1993) ไลโซไซม์ (lysozymes) โปรติเอส (proteases) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) และการปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) โดยการผลิตกรดอินทรีย์ (organic acids) (Sugita *et al.*, 1997)

แบคทีเรียกลุ่ม Lactic acid bacteria สามารถผลิตสารหลายชนิด เช่น สารยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (bacteriocins) ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดอื่น (Vandenberg, 1993) มีการศึกษาหลายรายงานเกี่ยวกับปฏิกิริยาในการยับยั้งการเจริญเติบโต โดยแบคทีเรียในกลุ่ม lactic acid bacteria ซึ่งเกิดปฏิกิริยาโดยสาร bacteriocins แต่ไม่ได้มีผลต่อแบคทีเรียในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก (Stoffels *et al.*, 1992)

อย่างไรก็ตาม เชื้อที่ทำให้เกิดโรคในการเลี้ยงสัตว์น้ำส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งก็จะมีความเป็นไปได้ในการนำเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม lactic acid bacteria ในการเป็นโพรไบโอติก (Ring and Gatesoupe, 1998) แบคทีเรียในกลุ่ม lactic acid bacteria เมื่อเจริญอยู่ในลำไส้ของปลานั้น จะไม่เป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในปลา และมีการผลิตสาร bacteriocins เพื่อช่วยทำให้สุขภาพของปลาดีขึ้นโดยการไปมีผลยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอื่น

นอกจากสาร bacteriocins และสารปฏิชีวนะที่ถูกแบคทีเรียสร้างขึ้นแล้วยังมีสารอื่นอีก ซึ่ง Nair *et al.* (1985) พบว่าแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในทะเลสามารถที่จะผลิตเอนไซม์ bacteriolytic ที่สามารถต้านทานต่อเชื้อ *V. parahaemolyticus*

2. การแข่งขันสำหรับสารเคมี และพลังงาน

ระบบนิเวศวิทยาของจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ จะเป็นการแข่งขันของจุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลาย โดยแข่งขันในการใช้ทั้งคาร์บอน และแหล่งพลังงาน Rico-Mora *et al.* (1998) ได้เลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่สามารถเจริญได้ดีในแหล่งที่มีสารอินทรีย์ในปริมาณต่ำ และนำแบคทีเรีนี้นั้นลงไปในการเลี้ยงไดอะตอม (diatom) ผลที่เกิดขึ้นคือแบคทีเรีนี้นี้สามารถที่จะป้องกันเชื้อ *Vibrio alginolyticus* ได้ ซึ่งแบคทีเรียที่แยกกลนั้นสามารถที่จะแข่งขันกับ *V. alginolyticus* ในการใช้ประโยชน์จากสิ่งขับถ่าย (exudates) ของไดอะตอม

3. การแข่งขันในการใช้แร่ธาตุ

จุลินทรีย์ทุกชนิดนั้นต้องการแร่ธาตุในการเจริญเติบโต (Reid *et al.*, 1993) โดยเฉพาะเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคส่วนใหญ่จะมีความต้องการไอออนสูง Pybus *et al.* (1994) ได้ทำการทดสอบ *Vibrio anguillarum* 30 สายพันธุ์ ในการเป็นโพรไบโอติกต่อเชื้อที่ทำให้เกิดโรคในปลาซัลมอน *Vibrio ordalii* โดยคุณสมบัตินในการยับยั้งการเจริญเติบโต พบว่าสายพันธุ์ *V. anguillarum* VL4335 สามารถที่จะยับยั้งการเจริญเติบโตของ *V. ordalii* ได้ แต่ปฏิกิริยานี้จะถูกยับยั้งเมื่อมีการใส่ไอออนของเกลือไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นสิ่งที่แสดงให้เห็นว่าการหยุดการเจริญเติบโตนั้นเกิดขึ้นเนื่องจากการขาดไอออน

4. การแข่งขันในการยึดเกาะ

กลไกหนึ่งที่จะเป็นไปได้ในการที่จะป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้อที่ก่อให้เกิดโรค คือการแข่งขันในการยึดเกาะบนผิวทางเดินอาหารหรือบนเนื้อเยื่อของเจ้าบ้าน ซึ่งเป็นที่ทราบกันแล้วว่าความสามารถในการยึดเกาะบนเมือก หรือบนพื้นผิวจำเป็นต่อแบคทีเรียที่จะเจริญในลำไส้ของสัตว์น้ำ (Olsson *et al.*, 1992; Onarheim and Raa, 1990; Westerdahl *et al.*, 1991) เมื่อแบคทีเรียมีการยึดเกาะบนพื้นผิวของเนื้อเยื่อจะเป็นการเริ่มระยะแรกของการติดเชื้อ (Krovacek *et al.*, 1987) การแข่งขันในการยึดเกาะกับเชื้อที่ก่อให้เกิดโรค จึงนับว่าเป็นกลไกการทำงานแรกของโพรไบโอติก (Montes and Pugh, 1993) ในการใช้โพรไบโอติกในมนุษย์ สายพันธุ์ที่สามารถแข่งขันในการยึดเกาะนั้นถือว่าเป็นสายพันธุ์ที่จะพิจารณาในการนำมาใช้เป็นโพรไบโอติกเป็นอันดับแรก (Salminen *et al.*, 1997)

การยึดเกาะนั้นไม่จำเป็นที่จะต้องมีความจำเพาะ อาจขึ้นอยู่กับปัจจัยกายภาพทางเคมี หรือมีความจำเพาะเจาะจง รวมถึงโมเลกุลที่ทำหน้าที่ในการยึดเกาะบนพื้นผิวของแบคทีเรีย และโมเลกุลบริเวณที่เป็นตัวรับ (receptor molecules) บนผิวเซลล์ การยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อที่ทำให้เกิดโรคบนผิวของเซลล์ในมนุษย์ และในสัตว์อื่น ได้มีการทดลองในห้องปฏิบัติการโดยนักวิจัยหลายท่าน (Bernet *et al.*, 1994; Blomberg *et al.*, 1993) แต่การศึกษาในสัตว์น้ำนั้น กลไกของโพรไบโอติกในการแข่งขันในการยึดเกาะนั้นเป็นเพียงสมมุติฐานซึ่งยังไม่มีการวิจัยเพื่อพิสูจน์สมมุติฐานนี้

การยึดเกาะของเชื้อที่เป็นโพรไบโอติกบนผนังลำไส้ หรือเนื้อเยื่อไม่ได้เป็นเพียงกลไกเดียวในการทำงานของโพรไบโอติก นอกเหนือจากการยึดเกาะแล้วยังต้องมีความสามารถในการเพิ่มจำนวนด้วย เนื่องจากในผนังลำไส้ของสัตว์น้ำจะมีการป้องกันตัวมันเองโดยการหลั่งสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียด้วย

5. คุณสมบัติในการเพิ่มการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน

การใช้โพรไบโอติกนั้น บางครั้งสารที่นำมาใช้จะรวมถึงส่วนประกอบของผนังเซลล์ของจุลชีพ (Salminen *et al.*, 1999) ซึ่งสารนั้นสามารถที่จะนำมาใช้ประโยชน์ในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ โดยมีการศึกษามากมายที่กล่าวถึงเซลล์หรือส่วนประกอบของเซลล์จุลชีพที่นำมาเป็นสารกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันให้ต้านทานต่อเชื้อที่ทำให้เกิดโรค

Lipopolysaccharides (LPS) จากแบคทีเรียแกรมลบ วัคซีนของเชื้อ *Vibrio* สปอร์ของ *Clostridium butyricum* และสารกลูแคน (glucan) จากผนังเซลล์ยีสต์ สามารถที่จะนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้ ซึ่งสามารถที่จะอธิบายได้ว่าสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันนั้นทำให้ระบบภูมิคุ้มกันของเจ้าบ้านสูงขึ้นและสามารถต้านทานต่อเชื้อที่ทำให้ก่อโรคโดยการเพิ่มขบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytosis) การสร้างแอนติบอดี (antibody) และเพิ่มการผลิตซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (superoxide anion production) (Sakai, 1999)

6. คุณสมบัติในการปรับปรุงคุณภาพน้ำของโพรไบโอติก

ในการศึกษาโพรไบโอติก มีหลายครั้งที่มีการกล่าวถึงคุณภาพน้ำเมื่อมีการใช้โพรไบโอติก โดยเฉพาะ *Bacillus* spp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก สามารถที่จะเปลี่ยนสารอินทรีย์ให้กลายเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) ได้มากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ โดยดูจากเปอร์เซ็นต์ที่สามารถเปลี่ยนสารอินทรีย์ที่มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบในบริเวณที่แบคทีเรียอาศัยอยู่ (Stanier *et al.*, 1963) ซึ่งเป็นเหตุผลว่าในบ่อที่มีปริมาณแบคทีเรียแกรมบวกสูงจะพบว่ามีปริมาณสารอินทรีย์ต่ำในระหว่างการเลี้ยง และเกิดการบลูมของแพลงก์ตอนพืชเนื่องมาจากการเพิ่มขึ้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (Scura, 1995)

ถึงแม้ว่าจะมีการศึกษาถึงการใช้ประโยชน์จากแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *Bacillus*, *Nitrobacter*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Cellulomonas* และ *Rhodopseudomonas* spp. ในการเลี้ยงกุ้ง (Rengpipat *et al.*, 1998 a) หรือในปลา (Chiayuvareesajja and Boyd, 1993) แต่ก็ยังไม่สามารถที่จะยืนยันความสามารถในการปรับปรุงคุณภาพน้ำของเชื้อโปรไบโอติกนี้ได้ เนื่องจากการปรับคุณภาพน้ำอยู่ในระดับต่ำ ซึ่งไม่รวมถึงขบวนการ nitrification

แบคทีเรียหลายชนิดเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม nitrifying bacteria ซึ่งสามารถควบคุมปริมาณแอมโมเนียในน้ำได้ แบคทีเรียในกลุ่มนี้สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยา oxidation ของแอมโมเนียให้กลายเป็นไนไตรท์และเป็นไนเตรทในที่สุด การใช้ nitrifying bacteria มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณแอมโมเนียได้ดี (Carmignani and Bennett, 1977) Perfettini and Bianchi (1990) ได้ทดลองใช้เซลล์แช่แข็งกับน้ำทะเลในระบบปิดพบว่าขบวนการ nitrification เกิดเร็วขึ้น 30 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำเลี้ยงในระบบหมุนเวียนกึ่งปิด (semiclosed water recirculation system) เมื่อมีการใช้แบคทีเรียกลุ่ม nitrifying พบว่าสามารถลดปริมาณแอมโมเนียจาก 3-4 สัปดาห์ เป็น 10 วัน

การเลี้ยงแบคทีเรียในกลุ่ม nitrifying สามารถที่จะเติมลงในบ่อ หรือในถังเลี้ยงที่พบว่ามีปริมาณแอมโมเนียหรือไนไตรท์ในระดับที่สูง ซึ่งแอมโมเนียและไนไตรท์นั้นเป็นสารพิษซึ่งเป็นปัญหาที่พบในการเลี้ยงปลา (Lewis and Morris, 1986) เช่นในบ่อเลี้ยงปลาดุก (Tucker *et al.*, 1989)

7. ปฏิกิริยาของโปรไบโอติกต่อแพลงก์ตอนพืช

คุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่ายนั้นมีประโยชน์ในการยับยั้งสาหร่ายชนิดที่ไม่ต้องการเกิดขึ้นในบ่อเลี้ยง สารละลายของแบคทีเรียซึ่งประกอบด้วย *Bacillus*, *Nitrobacter*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Cellulomonas* และ *Rhodopseudomonas* spp. ถูกนำมาใช้ในบ่อเลี้ยงปลาดุก อย่างไรก็ตามเปอร์เซ็นต์ของสาหร่ายในบ่อเลี้ยงไม่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลอง และกลุ่มควบคุม (Boyd *et al.*, 1984)

ประโยชน์นอกเหนือจากที่ได้กล่าวมาแล้วคือการปรับคุณภาพของสารอาหาร โดยการทำให้สารพิษมีพิษลดลง (detoxification) การสลายสารที่ไม่สามารถย่อยได้ในอาหารโดยใช้เอนไซม์ hydrolytic รวมถึง amylases และ proteases การผลิตวิตามิน เช่น biotin และ วิตามิน B12 (Fuller and Turvy, 1971; Parker, 1974; Roach and Tannock, 1980; Sugita *et al.*, 1991; Fuller, 1992; Sugita *et al.*, 1992; Smoragiewicz *et al.*, 1993; Sugita *et al.*, 1996; Hoshino *et al.*, 1997)

การผลิตสารที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโต (Spanggaard *et al.*, 2001) และสารกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของเจ้าบ้าน (Fuller, 1992; Gibson *et al.*, 1997) การใช้โพรไบโอติกนั้นจะสามารถเป็นประโยชน์ต่อ ร่างกายของเจ้าบ้านมากกว่าหนึ่งกลไก เช่น *Carnobacterium inhibens* K. สามารถที่จะทำให้เกิดสารต้านจุลชีพได้ในปริมาณไม่สูงมาก และเซลล์สามารถที่จะอาศัยอยู่กับระบบทางเดินอาหารในระหว่างที่กิน (Robertson *et al.*, 2000) อย่างไรก็ตามการใช้โพรไบโอติกโดยให้ทางระบบทางเดินอาหารจะได้ผลดีเพียงใดขึ้นอยู่กับอายุและสุขภาพของสัตว์นั้นด้วย เช่นการให้โพรไบโอติกกับลูกปลา กับปลาที่มีอายุมากกว่านั้นพบว่ามียผลที่แตกต่างกัน

การทดลองใช้โพรไบโอติกในกุ้งกุลาดำ

Shivappa and Chanratchakool (1997) รายงานการใช้แบคทีเรีย ซึ่งมี *Bacillus* ในสัดส่วนที่สูงใส่ลงในบ่ออนุบาล ช่วยให้กุ้งมีอัตราการเจริญเติบโตและรอดตายสูงกว่าการใช้ Benzalkonium Chloride (BKC)

Phianphak *et al.* (1997) ทำการทดลองนำ *Bacillus* มาผสมกับอาหารกุ้ง เพื่อทำเป็นโพรไบโอติกให้กุ้งกุลาดำกินในอัตราส่วนต่าง ๆ กัน พบว่าลูกกุ้งที่ได้รับโพรไบโอติก มีอัตราการรอดตายจากการเหนียวน้ำให้เกิดโรคโดย *V. harveyi* สูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ โดยกุ้งทดลองมีสุขภาพแข็งแรงและเจริญเติบโตได้ดี ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีอัตราการรอดเพียง 26 เปอร์เซ็นต์ และมีความผิดปกติ ในตับ ตับอ่อน และลำไส้

Rengpipat *et al.* (1998 a) รายงานการแยกเชื้อ *Bacillus* สายพันธุ์ S11 จากกุ้งกุลาดำและนำมาใช้เป็นโพรไบโอติกโดยผสมลงในสารละลายเลี้ยงไรสีน้ำตาล (*Artemia* sp.) เพื่อเป็นอาหารสำหรับเลี้ยงกุ้งกุลาดำ พบว่ามีผลต่อการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัว ความยาวของกุ้ง โดยมีอัตราการรอดตายของกลุ่มควบคุม 85 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มทดลอง 89 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเหนียวน้ำลูกกุ้งให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* พบว่าลูกกุ้งที่ได้รับโพรไบโอติกมีอัตราการรอดตาย 13 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มควบคุม 4 เปอร์เซ็นต์

Rengpipat *et al.* (1998 b) ได้ทำการผสม *Bacillus* S 11 ในอาหารกุ้ง 3 รูปแบบ คือ เซลล์สด เซลล์สดในสารละลายน้ำเกลือ และเซลล์ lyophilized ภายหลังจากที่ให้โพรไบโอติก เป็นเวลา 100 วัน พบว่ากุ้งกุลาดำระยะ P 30 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในการเพิ่มของน้ำหนักตัวและความยาวของกุ้งระหว่างกลุ่มที่ใช้โพรไบโอติกกับกลุ่มควบคุม แต่หลังจากกุ้ง

ได้รับเชื้อ *V. harveyi* โดยการแช่เป็นเวลา 10 วัน กลุ่มที่ได้รับโพรไบโอติก ทั้ง 3 กลุ่มมีอัตราการรอดตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กลุ่มควบคุมรอดตาย 26 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ในกลุ่มควบคุมยังเห็นลักษณะภายนอกชัดเจนว่ากุ้งมีสุขภาพไม่ดี hepatopancreas และลำไส้ไม่ปกติ ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับโพรไบโอติกกุ้งจะแข็งแรง hepatopancreas และลำไส้ปกติ

Rengpipat *et al.* (2000) ได้ทำการทดลองพบว่าการรอดตายและการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำที่ให้อาหารผสม *Bacillus* S11 จะดีกว่ากุ้งที่ไม่ได้รับอาหารผสม *Bacillus* S11 โดย *Bacillus* S11 มีประสิทธิภาพในการไปกระตุ้น และเพิ่มกระบวนการฟาโกไซโตซิส ซึ่งทราบได้จากการวัดเปอร์เซ็นต์ฟาโกไซโตซิส และ phagocytic index (PI) ในเลือด ฟีนอลออกซิเดส และกระบวนการกำจัดแบคทีเรีย (antibacterial activities) ซึ่งจะเพิ่มขึ้นตามอายุของกุ้ง แต่จะเพิ่มมากขึ้นโดยการใช้โพรไบโอติก ซึ่งทราบได้โดยการทดลอง หลังจากเลี้ยงกุ้ง 90 วัน โดยให้อาหารที่ผสมและไม่ผสม *Bacillus* S11 และใส่ *V. harveyi* หลังจากนั้น 10 วัน กุ้งที่ให้อาหารผสมกับโพรไบโอติกมีอัตราการรอดดีกว่า อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) อัตราการรอดตายเมื่อใช้โพรไบโอติกคือ 54.3 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับกุ้งที่ไม่ได้ใช้โพรไบโอติกมีอัตราการรอดตาย 35.5 เปอร์เซ็นต์ การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำที่ได้รับเชื้อ เป็นเวลา 10 วัน ในกลุ่มที่ได้รับโพรไบโอติกกับกลุ่มควบคุมจะต่างกันอย่างมาก ฟีนอลออกซิเดสมีปริมาณสูงในกุ้งที่ได้รับโพรไบโอติก คือ 2.7 ± 0.8 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มี 0.6 ± 0.3

วรรณิกา (2539) แยก *Bacillus* S11 (*Bacillus mycoides*) ซึ่งมีสมบัติสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคในคนและในกุ้งได้จากทางเดินอาหารกุ้งกุลาดำ นำมาผสมในอาหารกุ้งกุลาดำและเพาะเลี้ยงในระบบน้ำหมุนเวียนแบบปิดเป็นเวลา 100 วัน พบว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสม *Bacillus* S11 จะมีการเจริญเติบโตและมีอัตราการรอดดีกว่ากุ้งกุลาดำที่ไม่ได้รับอาหารผสม *Bacillus* S11 อย่างมีนัยสำคัญ และสามารถต้านทานการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคจาก *V. harveyi* โดยกลุ่มที่ได้รับ *Bacillus* S11 มีอัตราการรอด 100 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มที่ไม่ได้รับอาหารผสม *Bacillus* S11 มีอัตราการรอด 26 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

แบคทีเรียที่พบในกุ้งกุลาดำ

เศรษฐเกียรติ และคณะ (2533) ทำการศึกษาเชื้อแบคทีเรียในอวัยวะภายในของพ่อแม่พันธุ์ กุ้งกุลาดำ 119 ตัว โดยทำการตรวจหาเชื้อจาก hepatopancreas และ hemolymph พบเชื้อแบคทีเรียได้ เฉพาะชนิดที่คิดสี่แกรมลบเท่านั้น และแยกพิสูจน์เชื้อโดยใช้ API 20 E test kit พบว่าส่วนใหญ่อยู่ใน genus *Vibrio* โดยพบ *V. alginolyticus* มากที่สุด รองลงมาได้แก่ *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* และ *V. vulnificus* ตามลำดับ

ลีลา และคณะ (2540) ได้ทำการศึกษาชนิดและปริมาณแบคทีเรียใน hepatopancreas ลำไส้ และเลือดของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ในบ่อเลี้ยงพบแบคทีเรียหลายชนิด ได้แก่ *Pseudomonas* spp., *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. damsela*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *Vibrio* spp., *Aeromonas* spp., *Moraxella* spp., *Actinobacter* spp., *Cytophaga* spp., *Flavobacterium* spp. และแบคทีเรียแกรมบวก โดยแบคทีเรียทั้งหมดที่พบในลำไส้มีปริมาณ $2.1 \times 10^3 - 2.7 \times 10^8$ CFU/กรัม และแบคทีเรียทั้งหมดที่พบในเลือดมีปริมาณ $4.7 \times 10^1 - 7.6 \times 10^2$ CFU/มิลลิลิตร

***Bacillus* sp.**

เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อน จัดอยู่ในครอบครัว Bacillaceae สามารถสร้างเอนโดสปอร์ได้ เจริญเติบโตโดยอาศัยออกซิเจน สามารถพบได้ทั่วไปในน้ำ ดิน และอากาศ จากคุณสมบัติที่สามารถสร้างสปอร์ได้ ทำให้สามารถเก็บรักษาในรูปของสปอร์ สะดวกต่อการเก็บรักษาเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำต่อไป ถึงแม้ว่าแบคทีเรียในกลุ่มที่สามารถสร้างสปอร์ได้จะมีอยู่หลายสกุล เช่น *Bacillus*, *Sporolactobacillus*, *Clostridium*, *Desulfotomaculum*, *Sporosarcina* และ *Thermoactinomyces* (Todar, 2003) แต่การใช้แบคทีเรียเพื่อเป็นโปรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำในปัจจุบันนี้ มีรายงานเฉพาะแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* เท่านั้น เช่น *Bacillus* (Phianphak *et al.*, 1997), *Bacillus* สายพันธุ์ S11 (Rengpipat *et al.*, 1998 a; Rengpipat *et al.*, 1998 b; Rengpipat *et al.*, 2000) และ *Bacillus mycoides* (วรรณิภา, 2539)

***Vibrio* sp.**

เป็นแบคทีเรียแกรมลบในครอบครัว Vibrionaceae (Baumann *et al.*, 1971) รูปร่างเป็นแท่งโค้ง (curved rods) หรือรูปร่างตรง เป็นพวกที่สามารถเจริญทั้งแบบใช้ออกซิเจนและไม่ใช้ออกซิเจน (facultative anaerobes) เจริญเติบโตได้ดีในแหล่งน้ำที่มีความเค็มต่าง ๆ กัน (Colwell, 1984; Ruby and Nelson, 1978) เชื้อแบคทีเรียในสกุลนี้เป็นสาเหตุหลักของโรคบางชนิดที่พบในปลา หอย และในกุ้งสกุล penaeid (Austin and Austin, 1987; de la Pena *et al.*, 1993; Egidius, 1987; Lee *et al.*, 1996; Lightner, 1988; Muroga, 1995; Sugumar *et al.*, 1998) นอกจากนี้สามารถพบเชื้อชนิดนี้ได้ ในลำไส้ปลา (Ramesh and Venugopalan, 1989) ลำไส้ crustaceans (Sugita *et al.*, 1987; Ueda *et al.*, 1993) และพบเสมอใน hepatopancreas และในน้ำเลือดของ crustaceans (Sizemore *et al.*, 1975; Sizemore and Davis, 1985; Ueda *et al.*, 1993; Gomez-Gil *et al.*, 1998)

Vibrio harveyi

เป็นเชื้อแบคทีเรียในสกุล *Vibrio* ที่เป็นสาเหตุทำให้กุ้งกุลาดำ *P. monodon* ตายในหลาย ๆ ประเทศ (Sunaryanto and Mariam, 1986; Lavilla-Pitogo *et al.*, 1990; Karunasagar *et al.*, 1996) เชื้อแบคทีเรียชนิดนี้สามารถพบได้ทั่วไปในน้ำเค็ม (Baumann and Baumann, 1981) ขนาดกว้าง 0.5-0.8 ไมครอน ยาว 1.4-2.6 ไมครอน (Inglis *et al.*, 1993) ไม่สร้างสปอร์ สามารถเจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไปที่มีการเติมเกลือ 1.5-3.5 เปอร์เซ็นต์ (ชโล, 2528) ใช้อาหารเฉพาะ (selective media) คือ Thiosulfate Citrate Bile Sucrose (TCBS) เมื่อเจริญจะให้โคโลนีสีเขียวหรือเหลือง ขนาดปานกลาง-ใหญ่ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความสามารถในการใช้น้ำตาลซูโครสของแต่ละสายพันธุ์ หากใช้น้ำตาลซูโครสได้โคโลนีจะมีสีเหลือง หากไม่สามารถใช้น้ำตาลซูโครสได้โคโลนีจะมีสีเขียว (Cowan, 1975) ในอาหารเหลวเคลื่อนไหวโดยใช้ monotrichous หรือ multitrichous flagella เมื่อเจริญในอาหารแข็งสร้าง lateral flagella จำนวนมาก (Buchanan *et al.*, 1974)

แบคทีเรียชนิดนี้สามารถเรืองแสงได้ โดยในสภาวะที่มีออกซิเจน เชื้อ *V. harveyi* สามารถให้แสงสีเขียวแกมเหลืองออกมา เป็นปฏิกิริยาทางเคมีที่เกิดจากเอนไซม์ลูซิเฟอเรส (luciferase) ไปเร่งปฏิกิริยาออกซิไดซ์ของการรีดิวซ์ flavin mononucleotide (FMNH₂) และ long chain aldehyde โดยโมเลกุลของออกซิเจน ทำให้เห็นการเรืองแสงได้ในที่มืด (Strehler, 1953) ดังสมการ



การศึกษาาระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ

มีผู้ทำการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ โดยมีการศึกษาด้านต่าง ๆ ดังนี้

1. การศึกษา prophenoloxidase activating system
2. การศึกษาความว่องไวของฟาโกไซโทซิส (phagocytic activity) ของเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำ
3. การศึกษาความสามารถในการกำจัดเชื้อโรคจากระบบไหลเวียน (clearance ability) และความว่องไวซึ่งทำลายแบคทีเรียและไวรัส (bactericidal and virucidal activity) ของน้ำเลือดกุ้งกุลาดำ
4. การศึกษาการผลิตซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (superoxide anion) ของเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำ
5. การศึกษาปริมาณทองแดงในน้ำเลือดกุ้ง

การศึกษาการผลิตซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออนของเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำ

ซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออนถูกสร้างขึ้นในขั้นตอนการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือด O_2^- ที่วัดได้เป็นหนึ่งในหลายชนิดของ reactive oxygen ที่เซลล์สร้างขึ้นในระหว่างการจับกินสิ่งแปลกปลอม (Bell and Smith, 1993) ในสิ่งมีชีวิตกลุ่ม crustaceans และหอยก็ได้มีการศึกษากระบวนการดังกล่าวของเม็ดเลือด และพบว่า reactive oxygen ที่เซลล์สร้างขึ้นสามารถต่อต้านสิ่งแปลกปลอมที่เป็นเชื้อโรคได้ดี (Dikkeboom *et al.*, 1987; Bell and Smith, 1993) กิจการ และคณะ (2543 จ) กล่าวว่า การวัดปริมาณการสร้าง O_2^- ของเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำ น่าจะประยุกต์ใช้ได้ดีกว่าการวัดความว่องไวของฟาโกไซโทซิสของเม็ดเลือดโดยให้มีการจับกินเม็ดพลาสติก เนื่องจากขั้นตอนการศึกษาความว่องไวของฟาโกไซโทซิสจะขึ้นอยู่กับทัศนใจของผู้ตรวจนับเม็ดเลือดทำให้เกิดข้อผิดพลาดได้ง่าย

การศึกษาปริมาณทองแดงในน้ำเลือดกุ้ง

จากการศึกษาของ Djangmah (1970) พบว่าปริมาณฮีโมไซยานิน (hemocyanin) ในน้ำเลือดกุ้งมีถึง 60-95 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณโปรตีนในน้ำเลือดทั้งหมด ในกรณีที่กุ้งเกิดโรคติดเชื้อพบว่า จะทำให้ปริมาณเม็ดเลือดในระบบหมุนเวียนเลือดลดลง กิจการและสิทธิ (2539) รายงานว่ากุ้งที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองและดวงขาว จะมีปริมาณเม็ดเลือดในระบบหมุนเวียนลดลงอย่างชัดเจน จากรายงานการศึกษาของ Chen and Cheng (1993) พบว่า รงควัตถุที่ใช้ในการหายใจ (respiratory pigment) หรือฮีโมไซยานินในเลือดกุ้ง มีการเปลี่ยนแปลงตามเพศ ขนาด และวงจรการลอกคราบของกุ้ง

จากการทดลองของกิจการ และคณะ (2543 จ) พบว่าการติดเชื้อไวรัสและแบคทีเรียจะมีผลทำให้ปริมาณเม็ดเลือดกุ้งบางส่วนถูกทำลายไป ซึ่งมีผลต่อปริมาณโปรตีนและฮีโมไซยานินในน้ำเลือด ทำให้ปริมาณทองแดงซึ่งเป็นองค์ประกอบของฮีโมไซยานินในน้ำเลือดที่วิเคราะห์ได้ลดลง รวมทั้งการติดเชื้อไวรัสและแบคทีเรียมีผลทำให้ปริมาณทองแดงในน้ำเลือดกุ้งลดน้อยลงกว่าปกติอย่างมีนัยสำคัญ โดยจากการทดลองพบว่าค่าของปริมาณทองแดงในน้ำเลือดกุ้งปกติจะอยู่ในช่วง 118-162 ส่วนในล้านส่วน แต่จากการติดเชื้อแบคทีเรียพบว่าทำให้ค่าของทองแดงในน้ำเลือดลดลงอยู่ในช่วง 52-110 ส่วนในล้านส่วน ในขณะที่กุ้งที่มีการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองและดวงขาวจะมีปริมาณทองแดงในน้ำเลือดกุ้งลดลงอยู่ในช่วง 58-110 และ 55-112 ส่วนในล้านส่วนตามลำดับ

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ตู้ทดลอง และระบบให้อากาศ (อุปกรณ์ปั๊มออกซิเจน, หัวทราย, สายออกซิเจน, ท่อลม)
2. ตู้เขี่ยเชื้อ
3. เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง
4. ELISA Reader
5. เครื่องนึ่งภายใต้ความดันสูง (Autoclave)
6. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)
7. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Lambda 25)
8. เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง แบบควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge)
9. เครื่องเขย่าผสมสาร (Vortex Mixer)
10. เครื่องทำให้เม็ดเลือดแตกด้วยคลื่นเสียง (Sonicator)
11. เครื่อง freeze dryer
12. เครื่องวิเคราะห์ชนิดของแบคทีเรีย (VITEK 32)
13. กล้อง Scanning Electron Microscope (SEM)
14. กล้อง Transmission Electron Microscope (TEM)
15. เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter)
16. เครื่องวัดความเค็ม (Salinometer)
17. เครื่องวิเคราะห์คุณภาพน้ำ (ปริมาณแอมโมเนียม, ไนไตรท์, ฟอสเฟต)
18. เครื่องดูจุลทรรศน์
19. กล้องจุลทรรศน์
20. แผ่นแม่เหล็กความร้อนพร้อมเครื่องกวนแม่เหล็ก
21. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิได้ (Waterbath Shaker)
22. อุปกรณ์ในการเขี่ยเชื้อแบคทีเรีย (ตะเกียงแอลกอฮอล์, loop, triangle, needle)
23. เชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi*
24. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ TSA, TCBS, NA, NB
25. ชุดทดสอบแยกชนิดแบคทีเรียสำเร็จรูปสกุล *Bacillus* สำหรับเครื่อง VITEK 32
26. ชุดทดสอบแยกชนิดแบคทีเรีย API 50CHB

27. เครื่องแก้วสำหรับทดลอง (หลอดทดลอง, จานแก้ว, ปีกเกอร์)
28. เข็มฉีดยาและกระบอกฉีดยาขนาด 1 และ 3 มิลลิลิตร
29. กุ้งกุลาดำ
30. อาหารกุ้งกุลาดำ, น้ำมันปลาหมึก
31. สารเบต้ากลูแคน (ความเข้มข้น 100% จากบริษัทแอ็ดวาน ฟาร์มา จำกัด)
32. สารเปปติโดกลัยแคน (ความเข้มข้น 3% จากบริษัทอะควาโปรเทส จำกัด)
33. น้ำเค็มสำหรับใช้เลี้ยงกุ้งกุลาดำ
34. สารเคมีในการวิเคราะห์ภูมิคุ้มกัน
35. ชุดสีย้อมแกรม

วิธีการ

1. การศึกษาผลของสารเบต้ากลูแคนต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ

1.1 การศึกษาปริมาณที่เหมาะสมในการใช้เพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ

1.1.1 ทำการทดลองเลี้ยงกุ้งกุลาดำอายุ 2 เดือน ในตู้กระจกที่มีความใกล้เคียงกับลักษณะการเลี้ยงจริง เช่น จำนวนกุ้งต่อเนื้อที่ การให้อากาศและการให้อาหาร เพื่อให้กุ้งทุกตัวอยู่ในสภาพที่ไม่เครียด

1.1.2 ผสมสารเบต้ากลูแคนในอาหารสำเร็จรูป โดยใช้ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ ได้แก่ 1, 3 และ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม และกลุ่มควบคุม (อาหารปกติ)

1.1.3 นำอาหารผสมสารเบต้ากลูแคนและกลุ่มควบคุมเลี้ยงกุ้งเป็นเวลา 7 วัน โดยให้อาหารวันละ 5 มื้อ แบ่งเป็น 4 ชุดการทดลอง ๆ ละ 3 ซ้ำ

1.1.4 ทดสอบประโยชน์ของสารเบต้ากลูแคน โดยประเมินจากความต้านทานต่อเชื้อโรค (*Vibrio*) ในลักษณะการ challenge ด้วยเชื้อโดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อในตัวกุ้ง และเปรียบเทียบอัตราการรอดของแต่ละกลุ่มทดลอง

1.1.5 เปรียบเทียบองค์ประกอบต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันที่พบในเลือดของกุ้งทั้งระดับเซลล์และที่ไม่ใช่เซลล์

1.1.6 วิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูลเพื่อการตัดสินใจเลือกความเข้มข้นของเบต้ากลูแคนที่ให้ผลดีที่สุดจากการทดลอง เพื่อนำไปใช้ในการทดลองข้อ 1.2 ต่อไป

1.2 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมของการใช้สารเบต้ากลูแคนกับกึ่งกลาดำ

การทดลองนี้เพื่อประเมินความถี่ในการใช้สารเบต้ากลูแคนโดยใช้ความเข้มข้นที่ประเมินจากข้อ 1.1 การประเมินระยะเวลาของการใช้สารเบต้ากลูแคนจะดำเนินการในช่วงเวลา 1 สัปดาห์ ควรจะให้สารเบต้ากลูแคนทุกวัน โดยทดลองเป็นเวลา 1 เดือน

1.2.1 เลี้ยงกึ่งกลาดำอายุ 2 เดือน ในตู้กระจกให้อากาศอย่างเพียงพอ และเลี้ยงด้วยอาหารเม็ดสำเร็จรูปวันละ 5 มื้อ จนกึ่งมีความคุ้นเคยกับสภาพการทดลอง

1.2.2 ทำการทดลองโดยแบ่งเป็น 4 ชุดการทดลอง ๆ ละ 3 ซ้ำ โดยมีรายละเอียดดังนี้
ชุดการทดลองที่ 1 เลี้ยงด้วยอาหารปกติ (กลุ่มควบคุม)

ชุดการทดลองที่ 2 เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารเบต้ากลูแคน สัปดาห์ละ 3 วัน ๆ ละ 5 มื้อ

ชุดการทดลองที่ 3 เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารเบต้ากลูแคน สัปดาห์ละ 5 วัน ๆ ละ 5 มื้อ

ชุดการทดลองที่ 4 เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารเบต้ากลูแคน สัปดาห์ละ 7 วัน ๆ ละ 5 มื้อ

1.2.3 เลี้ยงกึ่งกลาดำด้วยอาหารชุดการทดลองต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ แล้วหยุดให้สารเบต้ากลูแคน 4 สัปดาห์ และให้สารเบต้ากลูแคนซ้ำ 2 สัปดาห์ โดยมีการประเมินประสิทธิภาพของการใช้สารเบต้ากลูแคนทุกสัปดาห์ เพื่อศึกษาความคงทนของระบบภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นจากสารเบต้ากลูแคน

1.2.4 นำผลการศึกษาจากข้อ 1.1 และ 1.2 มาสรุปเพื่อจัดทำเป็นมาตรฐานการใช้สารเบต้ากลูแคน ซึ่งระบุถึงวิธีการใช้ในประเด็นความเข้มข้นและระยะเวลาที่ควรใช้เพื่อให้เกิดประสิทธิผลและความคุ้มทุน

2. การศึกษาผลของสารเปปติโดกลัยแคนต่อระบบภูมิคุ้มกันของกึ่งกลาดำ

2.1 การศึกษาปริมาณที่เหมาะสมในการใช้เพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกึ่งกลาดำ

2.1.1 ทำการทดลองเลี้ยงกึ่งกลาดำอายุ 2 เดือน ในตู้กระจกที่มีความใกล้เคียงกับลักษณะการเลี้ยงจริง เช่น จำนวนกึ่งต่อเนื้อที่ การให้อากาศและการให้อาหาร เพื่อให้กึ่งทุกตัวอยู่ในสภาพที่ไม่เครียด

2.1.2 ผสมสารเปปติโดกลัยแคนในอาหารสำเร็จรูป โดยใช้ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ ได้แก่ 0.06, 0.12 และ 0.18 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม และกลุ่มควบคุม (อาหารปกติ)

2.1.3 นำอาหารผสมสารเปปติโดกลัยแคนและกลุ่มควบคุมเลี้ยงกุ้งเป็นเวลา 7 วัน โดยให้กินอาหารวันละ 5 มื้อ แบ่งเป็น 4 ชุดการทดลอง ๆ ละ 3 ซ้ำ

2.1.4 เปรียบเทียบองค์ประกอบต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันที่พบในเลือดของกุ้งทั้งระดับเซลล์และที่ไม่ใช่เซลล์

2.1.5 วิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูลเพื่อการตัดสินใจเลือกความเข้มข้นของสารเปปติโดกลัยแคนที่ให้ผลดีที่สุดจากการทดลอง เพื่อนำไปใช้ในการทดลองข้อ 2.2 ต่อไป

2.2 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมของการใช้สารเปปติโดกลัยแคนกับกุ้งกุลาดำ

การทดลองนี้เพื่อประเมินความถี่ในการใช้สารเปปติโดกลัยแคนโดยใช้ความเข้มข้นที่ประเมินจากข้อ 2.1 การประเมินระยะเวลาของการใช้สารเปปติโดกลัยแคนจะดำเนินการในช่วงเวลา 1 สัปดาห์ ควรจะให้สารเปปติโดกลัยแคนกี่วัน โดยทดลองเป็นเวลา 1 เดือน

2.2.1 เลี้ยงกุ้งกุลาดำอายุ 2 เดือน ในตู้กระจกให้อากาศอย่างเพียงพอ และเลี้ยงด้วยอาหารเม็ดสำเร็จรูปวันละ 5 มื้อ จนกุ้งมีความคุ้นเคยกับสภาพการทดลอง

2.2.2 ทำการทดลองโดยแบ่งเป็น 4 ชุดการทดลอง ๆ ละ 3 ซ้ำ โดยมีรายละเอียดดังนี้
ชุดการทดลองที่ 1 เลี้ยงด้วยอาหารปกติ (กลุ่มควบคุม)

ชุดการทดลองที่ 2 เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารเปปติโดกลัยแคน สัปดาห์ละ 3 วัน ๆ ละ 5 มื้อ

ชุดการทดลองที่ 3 เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารเปปติโดกลัยแคน สัปดาห์ละ 5 วัน ๆ ละ 5 มื้อ

ชุดการทดลองที่ 4 เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารเปปติโดกลัยแคน สัปดาห์ละ 7 วัน ๆ ละ 5 มื้อ

2.2.3 เลี้ยงกุ้งกุลาดำด้วยอาหารชุดการทดลองต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ แล้วหยุดให้สารเปปติโดกลัยแคน 4 สัปดาห์ และให้สารเปปติโดกลัยแคนซ้ำ 2 สัปดาห์ โดยมีการประเมินประสิทธิภาพของการใช้สารเปปติโดกลัยแคนทุกสัปดาห์ เพื่อดูความคงทนของระบบภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นจากสารเปปติโดกลัยแคน

2.2.4 นำผลการศึกษาจากข้อ 2.1 และ 2.2 มาสรุปเพื่อจัดทำเป็นมาตรฐานการใช้สารเปปติโดกลัยแคน ซึ่งระบุถึงวิธีการใช้ในประเด็นความเข้มข้นและระยะเวลาที่ควรใช้เพื่อให้เกิดประสิทธิผลและความคุ้มทุน

3. การวิจัยการใช้ประโยชน์จากเชื้อแบคทีเรียสกุล *Bacillus* จากลำไส้กุ้งกุลาดำในการยับยั้งการเจริญเติบโต และแข่งขันการใช้สารอาหารในการเจริญเติบโตกับเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *Vibrio harveyi* และการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน

3.1 การแยกชนิดของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ออกจากลำไส้กุ้ง

3.1.1 นำตัวอย่างลำไส้กุ้งกุลาดำจากบ่อเลี้ยงกุ้งในหลาย ๆ บ่อ เจือจางในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์

3.1.2 นำลำไส้กุ้งกุลาดำที่ได้บดให้ละเอียด ใส่หลอดทดลอง แบ่งเป็น 2 ส่วน

3.1.3 ส่วนที่ 1 นำไปนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในลำไส้กุ้ง โดยรายงานผลเป็น CFU/ตัว

3.1.4 ส่วนที่ 2 นำไปทำ heat shock ใน water bath ที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที นำสารละลายที่ได้ทำ cold shock โดยแช่ในน้ำเย็นจนหลอดทดลองเย็น

3.1.5 นับจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียที่เหลืออยู่ โดยวิธีการ spread plate บน Nutrient Agar (NA) + โซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ และบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง รายงานผลเป็น CFU/ตัว

3.1.6 แยกโคโลนีเดี่ยวที่ได้จากข้อ 3.1.5 ที่มีลักษณะแตกต่างกันนำไป streak plate บน Nutrient Agar (NA) + โซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ และบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นำเชื้อที่ได้ไปย้อมสีแกรม ดูรูปร่าง

3.1.7 นำเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่ได้ ทำการจำแนกชนิดโดยใช้เครื่องแยกแบคทีเรียอัตโนมัติ VITEK 32 (*Bacillus* identification card) ซึ่งเป็นการทดสอบการสร้างกรดจากคาร์โบไฮเดรต 20 ชนิด ได้แก่ sucrose, tagatose, glucose, inositol, galactose, arabinose, xylose, mannitol, raffinose, salicin, amygdalin, inulin, ribose, maltose, trehalose, palatinose, sorbitol, n-acetyl-d-glucosamine, amylopectin และ arabitol ปฏิกริยา reduction ของ tetrazolium red การเจริญในสภาพที่ไม่มีออกซิเจนใน potassium thiocyanate, sodium chloride 7%, mandelic acid, polyamidohygrostreptin, nalidixic acid และ oleandomycin การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดเป็นด่างโดยการเกิด ammonia รวมทั้งปฏิกริยา hydrolysis ของสาร esculin

เมื่อได้ชนิดของแบคทีเรียสกุล *Bacillus* แล้ว นำไปทดสอบเพื่อยืนยันชนิดอีกครั้งด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป API50CHB ซึ่งเป็นการจำแนกชนิดของ *Bacillus* โดยดูจากปฏิกริยา fermentation ของคาร์โบไฮเดรตชนิดต่าง ๆ 49 ชนิด ได้แก่ glycerol, erythritol, D-arabinose, L-

arabinose, D-ribose, D-xylose, L-xylose, D-adonitol, Methyl-βD-xylopyranoside, D-galactose, D-glucose, D-fructose, D-mannose, L-sorbose, L-rhamnose, dulcitol, inositol, D-mannitol, D-sorbitol, Methyl-αD-mannopyranoside, Methyl-αD-glucopyranoside, N-acetylglucosamine, amygdalin, arbutin, esculin ferric citrate, salicin, D-celiobiose, D-maltose, D-lactose, D-melibiose, D-saccharose, D-trehalose, inulin, D-melezitose, D-raffinose, Amidon (starch), glycogen, xylitol, gentiobiose, D-turanose, D-lyxose, D-tagatose, D-fucose, L-fucose, D-arabitol, L-arabitol, potassium gluconate, potassium 2-ketogluconate และ potassium 5-ketogluconate รวมทั้งใช้ API20E ซึ่งเป็นข้อมูลที่ใช้ประกอบในการแยกชนิดของ *Bacillus* แต่ไม่สามารถแยกชนิดได้โดยตรงซึ่งมีการทดสอบปฏิกิริยา fermentation ของคาร์โบไฮเดรตชนิดต่าง ๆ ได้แก่ D-glucose, D-mannitol, inositol, D-sorbitol, L-rhamnose, D-sucrose, D-melibiose, amygdalin, L-arabinose การทดสอบเอนไซม์ β-galactosidase, arginine dihydrolase, lysine decarboxylase, ornithine decarboxylase, citrate utilization, การผลิต H₂S, NO₂ โดยใช้ peptone เป็น substrate

หลังจากได้ผลการทดสอบทั้งหมดแล้ว ทำการย้อมแกรมดูรูปร่างของเซลล์ ขนาดเซลล์ การสร้างสปอร์ รูปร่างและตำแหน่งของสปอร์ การทดสอบทางชีวเคมีบางชนิด ได้แก่ การทดสอบ catalase test การทดสอบ Voges-Proskauer test การใช้น้ำตาล ดี-กลูโคส (D-glucose) แอล-อะราบินโนส (L-arabinose) ดี-ไซโลส (D-xylose) ดี-แมนนิทอล (D-mannitol) ดี-แลกโตส (D-lactose) ปฏิกิริยา hydrolysis ของแป้ง ปฏิกิริยาไนเตรทเปลี่ยนไปเป็นไนไตรท์ แล้วนำเชื้อ *Bacillus* spp. ไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.2 การทดสอบความสามารถในการสร้างสารต้านทานแบคทีเรียก่อโรคของเชื้อที่คัดเลือก
ดัดแปลงจากวิธีการของ Jock *et al.* (2002)

นำเชื้อแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* spp. ที่ทราบชนิดแล้ว ทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในกุ้งกุลาดำ คือ *Vibrio harveyi* จากห้องปฏิบัติการสุขภาพสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. บน NA ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อที่ได้แต่ละลงบน NA ทิ้งไว้ให้เชื้อเจริญที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ/เชื้อ 1 ชนิด เททับผิวหน้าอาหารด้วยสารละลายของ *V. harveyi* ที่เลี้ยงในอาหาร NB + 1.5% NaCl นาน 24 ชั่วโมง 0.1 มิลลิลิตร (10⁸ CFU/มิลลิลิตร) ผสม NA ที่ทิ้งไว้ให้หลอมเหลว อุณหภูมิ 40-45 องศาเซลเซียส ปริมาตร

10 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วอ่านผลโดยการดูโซนใส (clear zone) ที่เกิดขึ้น

3.3 การทดสอบความสามารถในการแข่งขันการใช้สารอาหารในการเจริญร่วมกันของเชื้อโพรไบโอติกและเชื้อก่อโรค (Broth co-culture assay) ดัดแปลงจากวิธีการของ Hjelm *et al.* (2004)

เลี้ยงเชื้อ *Bacillus* แต่ละชนิด และเชื้อ *V. harveyi* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB (+ NaCl 1.5%) เขย่าที่ความเร็ว 110 รอบ/นาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงเจือจางเชื้อแต่ละชนิดให้มีปริมาณเชื้อประมาณ 10^5 CFU/มิลลิลิตร นำเชื้อแต่ละชนิดปริมาณ 100 μ l ใส่ในหลอดทดลองซึ่งมี NB ปริมาณ 5 มิลลิลิตร เขย่าหลอดทดลองที่ความเร็ว 110 รอบ/นาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยแบ่งกลุ่มทดลองออกเป็น 7 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ

- ชุดทดลองที่ 1 *V. harveyi*
- ชุดทดลองที่ 2 *Bacillus* ชนิดที่ 1
- ชุดทดลองที่ 3 *Bacillus* ชนิดที่ 2
- ชุดทดลองที่ 4 *Bacillus* ชนิดที่ 3
- ชุดทดลองที่ 5 *V. harveyi* + *Bacillus* ชนิดที่ 1
- ชุดทดลองที่ 6 *V. harveyi* + *Bacillus* ชนิดที่ 2
- ชุดทดลองที่ 7 *V. harveyi* + *Bacillus* ชนิดที่ 3

ตรวจนับปริมาณเชื้อบน TCBS agar และ NA (+1.5% NaCl) ที่ระยะเวลา 0, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง ซึ่งปริมาณเชื้อบน TCBS จะเป็นปริมาณเชื้อ *V. harveyi* ส่วนปริมาณของ *Bacillus* แต่ละชนิดคำนวณจาก ปริมาณเชื้อบน NA – ปริมาณเชื้อบน TCBS

3.4 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เชื้อแบคทีเรียก่อโรคเมื่อเจริญร่วมกับเชื้อโพรไบโอติก

3.4.1 นำเชื้อแบคทีเรียที่ในสกุล *Bacillus* spp. ที่ทราบชนิดแล้ว ทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในกุ้งกุลาดำ คือ *Vibrio harveyi* โดยใช้วิธีการ cross streak method โดยนำเชื้อ *V. harveyi* ที่เลี้ยงบนอาหาร TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Sucrose) อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จีดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA (+ NaCl 1.5%) โดยจีดเป็นเส้นเดียว

3.4.2 นำเชื้อแบคทีเรียสกุล *Bacillus* spp. ซึ่งเลี้ยงบนอาหาร NA อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาทำการฉีดทับลงไปบนแนวกากบาท บนที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยทำ 3 ซ้ำ ต่อเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ 1 ชนิด โดยมีกลุ่มควบคุมเป็นเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด ซึ่งฉีดเชื้อเป็นเส้นเดียว

3.4.3 นำเชื้อบริเวณที่เป็นจุดตัดระหว่างเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบกับเชื้อ *V. harveyi* เลี้ยงบน TCBS agar บนที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อแยกเฉพาะเชื้อ *V. harveyi* จากบริเวณที่ถูกยับยั้งการเจริญมาทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเชื้อ ดังกล่าวด้วยกล้อง TEM (Transmission Electron Microscope)

3.5 การผลิตอาหารกึ่งกลูตาดีสมแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ที่แยกได้

3.5.1 เลี้ยงแบคทีเรียสกุล *Bacillus* แต่ละชนิดในอาหาร Nutrient Broth (NB) ปริมาตร 600 มิลลิลิตร/ 1 เชื้อ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.5.2 นำสารละลายเชื้อแบคทีเรียที่ได้ไปเข้าเครื่อง centrifuge ที่ 4,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที

3.5.3 นำส่วนใสที่ได้ทิ้งไป ส่วนตะกอนที่ได้นำไปผสมกับ clay ในอัตราส่วนแบคทีเรีย 1 ส่วน : clay 2 ส่วน โดยแต่ละเชื้อจะได้แบคทีเรียประมาณ 15 กรัมของน้ำหนักเปียก

3.5.4 ทำให้แห้งโดยใช้เครื่อง freeze dryer

3.5.5 นับจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่ได้ โดยควรมีจำนวน 10^8 - 10^{10} CFU/กรัม

3.5.6 นำแบคทีเรียที่ได้มาผลิตเชื้อผสม โดยผสมแบคทีเรียที่พบแต่ละชนิดในอัตราส่วน 1 : 1

3.5.7 ตรวจสอบการรอดชีวิตของแบคทีเรียโดยสุ่มตัวอย่างแบคทีเรียแต่ละชนิดที่ผสมกับ clay แล้ว มาตรวจสอบความอยู่รอดของแบคทีเรีย เมื่อ 0, 1, 2, 3, 6, 12 เดือน

3.5.8 นำอาหารเม็ดสำเร็จรูปผสมกับผงแบคทีเรีย ในอัตราส่วน อาหารกึ่ง 100 กรัม : แบคทีเรีย 0.5 กรัม ใช้น้ำมันปลาหมีกเคลือบ ฝั่งให้แห้ง

3.6 การทดสอบในกึ่งกลาดำ

3.6.1 นำกึ่งกลาดำซึ่งน้ำหนัก และวัดความยาวก่อนการทดลอง

3.6.2 วางแผนการทดลองแบบ CRD (complete randomized design) แบ่งชุดการ

ทดลองออกเป็น 8 กลุ่ม คือ

ชุดการทดลองที่ 1 เลี้ยงด้วยอาหารปกติ (กลุ่มควบคุม)

ชุดการทดลองที่ 2 ให้อาหารสำเร็จรูปที่ผสมเชื้อแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ชนิดที่ 1

ชุดการทดลองที่ 3 ให้อาหารสำเร็จรูปที่ผสมเชื้อแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ชนิดที่ 2

ชุดการทดลองที่ 4 ให้อาหารสำเร็จรูปที่ผสมเชื้อแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ชนิดที่ 3

ชุดการทดลองที่ 5 ให้อาหารสำเร็จรูปที่ผสมเชื้อแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ชนิดที่ 1+2

ชุดการทดลองที่ 6 ให้อาหารสำเร็จรูปที่ผสมเชื้อแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ชนิดที่ 1+3

ชุดการทดลองที่ 7 ให้อาหารสำเร็จรูปที่ผสมเชื้อแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ชนิดที่ 2+3

ชุดการทดลองที่ 8 ให้อาหารสำเร็จรูปที่ผสมเชื้อแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ชนิดที่ 1+2+3

3.6.3 เลี้ยงกึ่งกลาดำด้วยอาหารกึ่งผสมแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ เมื่อครบ 1 เดือน วัดอัตราการเจริญเติบโต คือน้ำหนัก และความยาว

3.6.4 ประเมินประสิทธิภาพของการใช้แบคทีเรียสกุล *Bacillus* ในการเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในด้านองค์ประกอบต่าง ๆ ทางด้านความต้านทานโรค

3.6.5 นำลำไส้กึ่งกลาดำในแต่ละชุดการทดลองมาซึ่งน้ำหนัก และนำลำไส้บดใน homogenizer ซึ่งใส่น้ำเกลือ 0.85% ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว แบ่งสารละลายที่ได้เป็น 3 ส่วน ส่วนแรกนำไปนับปริมาณแบคทีเรียสกุล *Vibrio* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS โดยวิธีการ spread plate บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนที่สองนำไปนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในลำไส้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำโคโลนีที่ได้ไปทำการย้อมแกรม ดูรูปร่างและขนาดของเชื้อแบคทีเรียเพื่อดูว่ามีโคโลนีที่เป็น *Bacillus* spp. อยู่กี่โคโลนี นำจำนวนโคโลนีที่นับได้รายงานเป็นปริมาณแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ทั้งหมดในลำไส้

3.6.6 นำสารละลายลำไส้กึ่งกลาดำอีก 1 ส่วน ไป heat shock ใน water bath ที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที นำสารละลายที่ได้ทำ cold shock โดยแช่ในน้ำเย็นจนหลอดทดลองเย็น นับจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียที่เหลืออยู่ โดยวิธีการ spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง รายงานผลเป็นปริมาณของแบคทีเรีย *Bacillus* ที่อยู่ในรูปของ spore

3.6.7 นำลำไส้กุ้งไปตรวจดูด้วยกล้อง Scanning Electron Microscope (SEM) เพื่อเปรียบเทียบชนิดของแบคทีเรียในลำไส้ของกุ้งที่ได้รับอาหารผสมแบคทีเรียสกุล *Bacillus* และกลุ่มควบคุมที่ได้รับอาหารปกติ

3.7 การศึกษาระยะเวลาในการเข้าสปอร์ของแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ที่แยกได้

3.7.1 เตรียมเชื้อ *Bacillus* แต่ละชนิด โดยเลี้ยงเชื้อ ใน NB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใน flask ขนาด 25 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 110 รอบ/นาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อที่ได้วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร ได้ค่า OD ประมาณ 0.15-0.17

3.7.2 นำเชื้อ *Bacillus* แต่ละชนิดที่เตรียมจากข้อ 3.7.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ใน NB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 110 รอบ/นาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

3.7.3 นับปริมาณของเชื้อ *Bacillus* ทุกวัน เป็นระยะเวลา 10 วัน โดยวิธีการ spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยนับก่อน heat shock และหลัง heat shock ซึ่งปริมาณก่อนการ heat shock จะเป็นปริมาณของเซลล์ *Bacillus* ทั้งหมดที่อยู่ในรูป spore และในรูป vegetative cell ส่วนปริมาณหลังการ heat shock จะเป็นปริมาณเซลล์ของ *Bacillus* อยู่ในรูป spore

4. องค์ประกอบทางภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำและวิธีการที่จะทำการศึกษา

4.1 การศึกษาปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase ตามวิธีการของกิจการและคณะ (2543 จ)

4.1.1 การเก็บตัวอย่างเลือดและเตรียม Haemocyte Lysate (HLS)

4.1.1.1 เก็บตัวอย่างเลือดจากกุ้งกุลาดำแต่ละตัว โดยเจาะเลือดจากโคนขาเดินคู่ที่ 3 ประมาณ 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับ K-199 pH 7.4 ที่เติม L-cysteine 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารป้องกันเลือดแข็งตัว จนได้ปริมาณครบ 1 มิลลิลิตร

4.1.1.2 หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใสทิ้งไป ตะกอนที่ได้นำมาล้างใน K-199 และละลายในสารละลาย cacodylate buffer pH 7.4

- 4.1.1.3 ทำให้เซลล์เม็ดเลือดแตก โดยใช้ sonicator ที่แอมพลิจูด 30 เป็นเวลา 5 วินาที
- 4.1.1.4 นำสารละลายที่ได้มาหมุนเหวี่ยงให้ตกตะกอนที่ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส
- 4.1.1.5 แยกส่วนใสซึ่งเป็น HLS เก็บไว้ใช้ต่อไป
- 4.1.2 การวิเคราะห์ความว่องไวของเอนไซม์ phenoloxidase โดยดัดแปลงจากวิธีการที่รายงานของ Soderhall and Hall (1984)
- 4.1.2.1 นำ HLS 200 ไมโครลิตร ผสมรวมกับสารละลายทริปซิน (0.1 เปอร์เซ็นต์ทริปซินใน cacodylate buffer) 200 ไมโครลิตร ทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาประมาณ 2 นาที
- 4.1.2.2 เติมสารละลาย L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA, 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 200 ไมโครลิตร ปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ทุก ๆ 2 นาที โดยเปรียบเทียบกับสารละลายควบคุม ซึ่งใช้ทริปซิน ผสมกับ L-DOPA และ cacodylate buffer แทน HLS ทำการวัดค่า OD จนปฏิกิริยาเกิดอย่างสมบูรณ์
- 4.1.2.3 วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนใน HLS โดยวิธีของ Lowry *et al.* (1951) นำค่าที่ได้มาคำนวณหน่วย (unit) ของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส โดยกำหนดค่าดังนี้

$$1 \text{ หน่วยของฟีนอลออกซิเดส} = \Delta OD_{490} / \text{นาที/มิลลิกรัม โปรตีน}$$

4.2 การศึกษาการผลิตซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (superoxide anion) ของเม็ดเลือดกึ่งกลาดำ ตามวิธีการของ กิจการและคณะ (2543 จ)

- 4.2.1 การเตรียม haemocyte monolayer
- 4.2.1.1 เก็บตัวอย่างเลือด นำเลือดมาปรับจำนวนให้มีปริมาณเม็ดเลือดเท่ากับ 1.0×10^7 เซลล์/มิลลิลิตร และแบ่งเซลล์จำนวน 20 ไมโครลิตร ลงเลี้ยงในถาดหลุม (96 microwell plate) เป็นเวลา 45 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- 4.2.1.2 นำมาล้างด้วย K-199 3 ครั้ง เพื่อล้างเซลล์เม็ดเลือดที่ไม่เกาะออก และเก็บไว้ใช้งานในขั้นตอนต่อไป

4.2.2 การเตรียม Opsonized zymosan

4.2.2.1 เตรียมซีรัมกึ่งโดยเจาะเลือดกึ่งปกติแล้วทิ้งให้เลือดแข็งตัวและแยกซีรัมเตรียม zymosan และ serum ในอัตราส่วน 1:100 ผสมให้เข้ากันดี นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

4.2.2.2 นำ zymosan มาล้าง 3 ครั้ง โดยใช้ K-199 และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วย K-199 ให้ครบ 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ในตู้เย็นเพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป

4.2.3 การเตรียม NBT-Zymosan mixture

ละลาย NBT (Nitroblue tetrazolium) ใน DMSO (Dimethyl sulfoxide) อัตราส่วน 1:50 นำมาผสมรวมกับไซโมแซนที่เตรียมไว้ ปรับปริมาตรโดยใช้ K-199 ให้ได้ 10 มิลลิลิตร

4.2.4 NBT-reduction assay

4.2.4.1 นำส่วนผสมที่เตรียมไว้ 100 ไมโครลิตร เติมลงในเซลล์เม็ดเลือดที่เตรียมไว้หลุมละ 100 ไมโครลิตร ชุดควบคุมจะใช้ NBT + K-199 100 ไมโครลิตรแทน ปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

4.2.4.2 นำมาล้างด้วย K-199 3 ครั้ง หยุดปฏิกิริยาของเม็ดเลือดโดยการเติมเมทานอล 70เปอร์เซ็นต์ นาน 3 นาที ทิ้งให้แห้ง

4.2.4.3 เติมน้ำละลายโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 นอร์มอล (2N KOH) 120 ไมโครลิตร และ DMSO 140 ไมโครลิตร เพื่อละลายองค์ประกอบภายในเซลล์

4.2.4.4 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร โดยใช้โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ ผสมกับ DMSO เป็นตัวควบคุม ค่าที่ได้นำมากำหนดโดย 1 หน่วย = การเปลี่ยนแปลงค่า OD 0.001

4.3 การศึกษา clearance ability ดัดแปลงจากวิธีการของ กิจการและคณะ (2543 จ)

4.3.1 ใช้เชื้อ *Vibrio harveyi* บริสุทธิ์ที่เลี้ยงในอาหาร TSA ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.3.2 นำเชื้อที่เป็นกลุ่มเดียวมาละลายในน้ำเกลือปลอดเชื้อ จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร ได้ค่า OD ประมาณ 0.1-0.15

4.3.3 นำเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมได้มานับปริมาณบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS ผสมโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี spread plate

4.3.4 นำสารละลายเชื้อแบคทีเรียที่ทราบจำนวนแน่นอนมาฉีดเข้ากึ่งทดลองในปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร/ตัว ชุดควบคุมจะฉีดด้วยน้ำเกลือแทนเชื้อ

4.3.5 ปล่อยให้ทิ้งไว้เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เจาะเลือดจากกึ่งแต่ละตัว (ตัวละ 0.5 มิลลิลิตร) นำมานับปริมาณเชื้อแบคทีเรียในเลือดทั้งหมด โดยวิธี spread plate และนำมาคำนวณปริมาณเชื้อที่ลดลง

4.4 การศึกษาค่า bactericidal activity ของน้ำเลือดกึ่งกลาค่า คัดแปลงจากวิธีการของ กิจการและคณะ (2543 จ)

4.4.1 เจาะเลือดจากกึ่งแต่ละตัว และนำมาแยกซีรัม โดยหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำซีรัมมาเจือจางโดยใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 2.6 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวเจือจางซึ่งความเข้มข้นของสารละลายดังกล่าวเป็นความเข้มข้นที่มีความเข้มข้นเท่ากับความเข้มข้นของซีรัมในกึ่ง โดยเจือจางในระดับ 1:2 1:4 1:8 1:16 และ 1:32 โดยปรับปริมาตรในการเจือจางให้ได้หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร

4.4.2 นำเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมเหมือนกับวิธีการในข้อ 4.3 มาเติมในแต่ละความเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร นำไปปอมที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

4.4.3 นำส่วนผสมในแต่ละหลอดมานับปริมาณเชื้อแบคทีเรีย โดยวิธี spread plate และบันทึกค่าของการเจือจางซีรัมที่สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียลงได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 3 ชั่วโมง

5. การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของข้อมูลโดย Analysis of Variance และ Duncan's New Multiple Range Test ที่ $p = 0.05$

6. สถานที่ทำการทดลอง

- ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

7. ระยะเวลาที่ทำการทดลอง

2 ปี 9 เดือน

ผลการทดลอง

1. การศึกษาผลของสารเบต้ากลูแคนต่อระบบภูมิคุ้มกันของกิ้งกูดดำ

1.1 การศึกษาปริมาณที่เหมาะสมในการใช้เพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันกิ้งกูดดำ

ผลการศึกษาเพื่อหาปริมาณที่เหมาะสมของสารเบต้ากลูแคนในการเลี้ยงกิ้งกูดดำ โดยมี 4 ชุดการทดลอง ได้แก่ ชุดการทดลองที่ 1 เลี้ยงกิ้งด้วยอาหารผสมเบต้ากลูแคน 0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม (กลุ่มควบคุม) ชุดการทดลองที่ 2 เลี้ยงกิ้งด้วยอาหารผสมเบต้ากลูแคน 1 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ชุดการทดลองที่ 3 เลี้ยงกิ้งด้วยอาหารผสมเบต้ากลูแคน 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม และ ชุดการทดลองที่ 4 เลี้ยงกิ้งด้วยอาหารผสมเบต้ากลูแคน 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม แต่ละชุดการทดลองมี 3 ซ้ำ ให้อาหารวันละ 5 มื้อ โดยเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบ 7 วัน ทำการตรวจพารามิเตอร์ทางด้านภูมิคุ้มกันต่าง ๆ ได้แก่ ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase, การผลิต superoxide anion, bactericidal activity และ clearance ability ได้ผลดังนี้

1.1.1 ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase

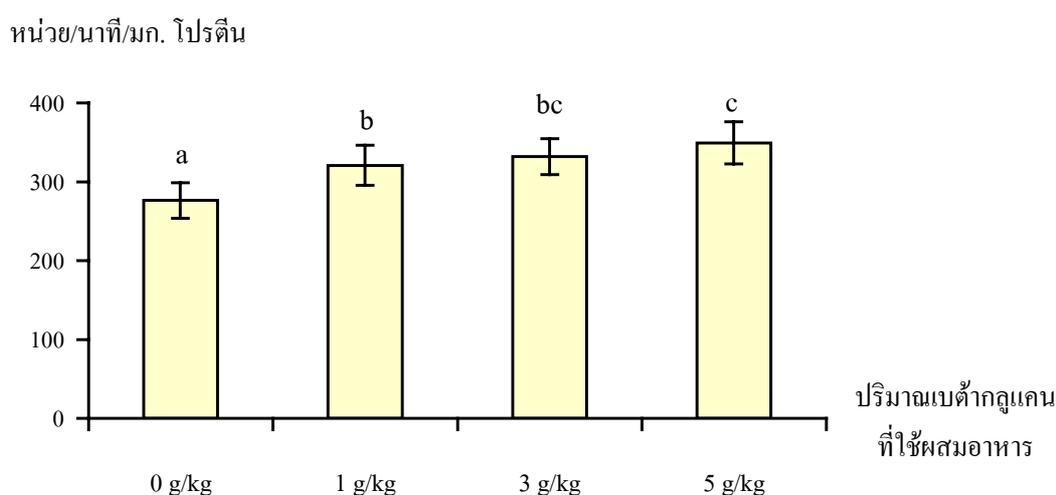
เมื่อทำการเลี้ยงกิ้งกูดดำด้วยอาหารผสมเบต้ากลูแคนความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 0, 1, 3 และ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม วันละ 5 มื้อ เป็นระยะเวลา 7 วัน เมื่อครบ 7 วันแล้ว ทำการคัดเลือกจากกิ้งเพื่อตรวจสอบปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase (หน่วย/นาที/มก. โปรตีน) พบว่าเมื่อใช้สารเบต้ากลูแคนปริมาณ 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัมเลี้ยงกิ้งกูดดำ ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase มีค่าเฉลี่ย 332.094 ± 22.917 หน่วย/นาที/มก. โปรตีน ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการเลี้ยงกิ้งกูดดำด้วยอาหารผสมเบต้ากลูแคนปริมาณ 1 กรัม และ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ($p > 0.05$) ซึ่งมีค่า 320.938 ± 25.256 และ 349.377 ± 26.632 หน่วย/นาที/มก. โปรตีน ตามลำดับ แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จากกลุ่มควบคุม ซึ่งมีปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase เฉลี่ย 276.298 ± 22.751 หน่วย/นาที/มก. โปรตีน ได้ผลดังตารางที่ 1 และภาพที่ 1

ตารางที่ 1 ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase (หน่วย/นาที/มก. โปรตีน) ของกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมเบต้ากลูแคนความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 7 วัน

| ปริมาณเบต้ากลูแคน (กรัม/อาหาร 1 กก.) | ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase (หน่วย/นาที/มก. โปรตีน) |
|---|--|
| 0 | 276.298 ± 22.751 ^a |
| 1 | 320.938 ± 25.256 ^b |
| 3 | 332.094 ± 22.917 ^{bc} |
| 5 | 349.377 ± 26.632 ^c |

ค่าเฉลี่ยตามด้วยอักษรเหมือนกันภายในแถวตั้งเดียวกันจะไม่แตกต่างกันทางสถิติ

อย่างมีนัยสำคัญ $p > 0.05$, DMRT



ภาพที่ 1 ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase (หน่วย/นาที/มก. โปรตีน) ของกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมเบต้ากลูแคนความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 7 วัน

1.1.2 การผลิต superoxide anion

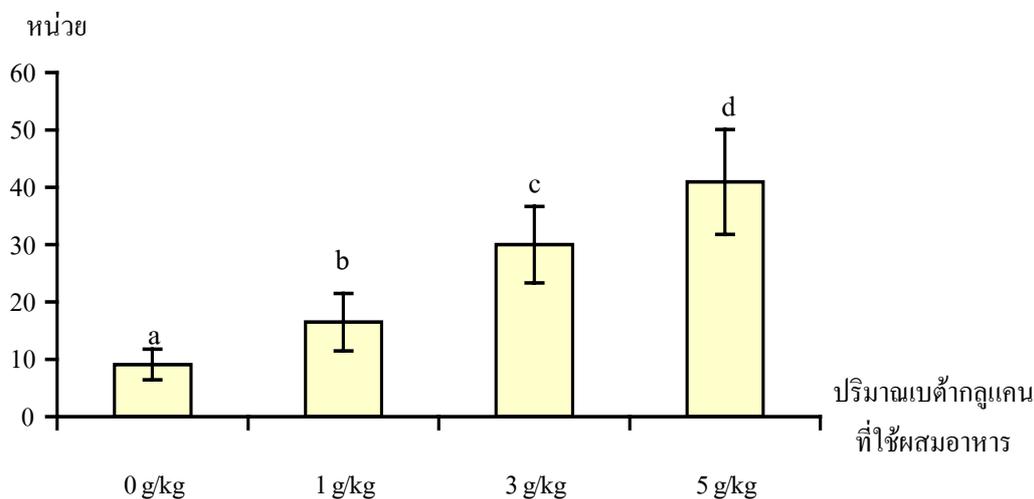
เมื่อทำการเลี้ยงกุ้งกุลาดำด้วยอาหารผสมเบต้ากลูแคนความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 0, 1, 3 และ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม วันละ 5 มื้อ เป็นระยะเวลา 7 วัน เมื่อครบ 7 วันแล้ว ทำการดูดเลือดจากกุ้งเพื่อตรวจสอบปริมาณ superoxide anion (หน่วย) พบว่าเมื่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำโดยใช้อาหารผสมสารเบต้ากลูแคนปริมาณ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม จะมีค่าเฉลี่ยสูงสุด โดยมีค่าเฉลี่ย 40.917 ± 9.15 หน่วย ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จากการเลี้ยงกุ้งกุลาดำด้วย

อาหารผสมเบต้ากลูแคนปริมาณ 1 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม และกลุ่มควบคุม ซึ่งมีค่าเฉลี่ย 16.5 ± 5 30.0 ± 6.688 และ 9.083 ± 2.678 หน่วย ตามลำดับ ดังตารางที่ 2 และ ภาพที่ 2

ตารางที่ 2 ปริมาณ superoxide anion (หน่วย) ของกิ้งกูด้าที่ได้รับอาหารผสมเบต้ากลูแคน ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 7 วัน

| ปริมาณเบต้ากลูแคน (กรัม/อาหาร 1 กก.) | การผลิต superoxide anion (หน่วย) |
|---|----------------------------------|
| 0 | 9.083 ± 2.678^a |
| 1 | 16.5 ± 5^b |
| 3 | 30.0 ± 6.688^c |
| 5 | 40.917 ± 9.15^d |

ค่าเฉลี่ยตามด้วยอักษรเหมือนกันภายในแถวตั้งเดียวกันจะไม่แตกต่างกันทางสถิติ อย่างมีนัยสำคัญ $p > 0.05$, DMRT



ภาพที่ 2 ปริมาณ superoxide anion (หน่วย) ของกิ้งกูด้าที่ได้รับอาหารผสมเบต้ากลูแคน ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 7 วัน

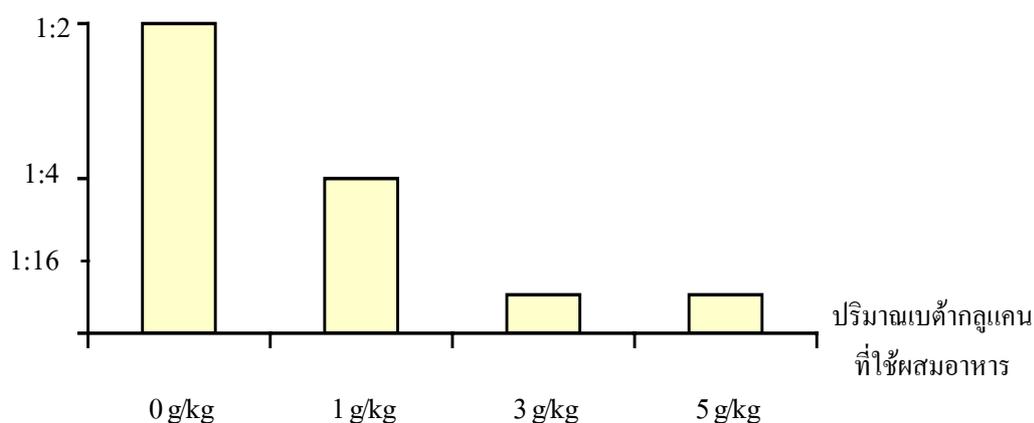
1.1.3 Bactericidal activity

ค่า bactericidal activity เมื่อเลี้ยงกึ่งกลาดำโดยใช้อาหารผสมสารเบต้ากลูแคน ปริมาณ 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ไม่แตกต่างจากการเลี้ยงกึ่งกลาดำโดยใช้อาหารผสมสารเบต้ากลูแคน ปริมาณ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ซึ่งมีค่าการเจือจางของซีรัมต่ำสุดในการที่ทำให้แบคทีเรียลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ เท่ากันคือ 1:16 แต่แตกต่างจากการเลี้ยงกึ่งกลาดำโดยใช้อาหารผสมสารเบต้ากลูแคน ปริมาณ 1 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม และกลุ่มควบคุม ซึ่งมีค่าการเจือจางของซีรัมต่ำสุดในการที่ทำให้แบคทีเรียลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ เท่ากันคือ 1:4 ดังตารางที่ 3 และภาพที่ 3

ตารางที่ 3 ค่า bactericidal activity ของกึ่งกลาดำที่ได้รับอาหารผสมเบต้ากลูแคนความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 7 วัน

| ปริมาณเบต้ากลูแคน (กรัม/อาหาร 1 กก.) | ความเข้มข้นของซีรัมที่มีค่าต่ำสุด ที่ทำให้แบคทีเรียลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ |
|---|---|
| 0 | 1 : 4 |
| 1 | 1 : 4 |
| 3 | 1 : 16 |
| 5 | 1 : 16 |

ความเข้มข้นของซีรัม



ภาพที่ 3 ค่า bactericidal activity ของกึ่งกลาดำที่ได้รับอาหารผสมเบต้ากลูแคนความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 7 วัน

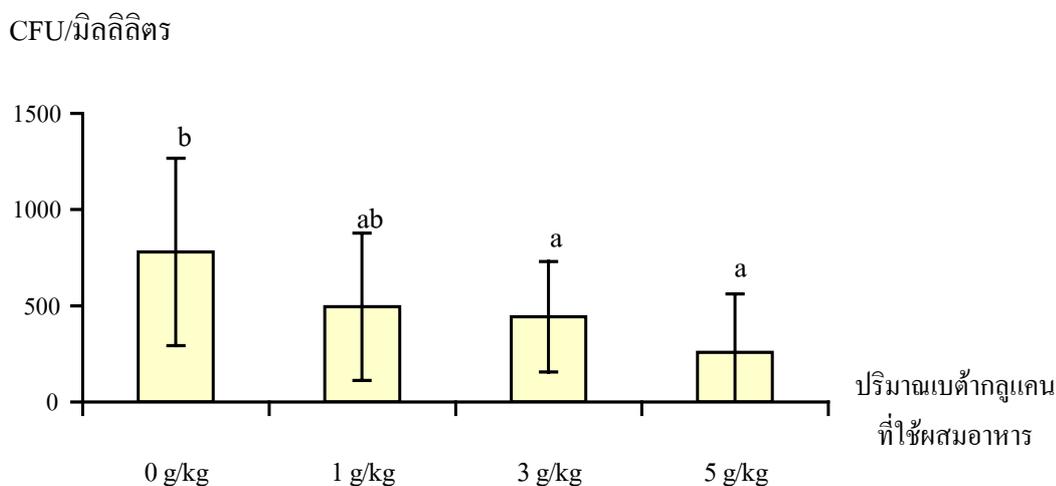
1.1.4 Clearance ability

ค่า clearance ability เมื่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำโดยใช้อาหารผสมสารเบต้ากลูแคน ปริมาณ 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) จากการเลี้ยงกุ้งกุลาดำโดยใช้อาหารผสมสารเบต้ากลูแคนปริมาณ 1 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม และ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม โดยพบเชื้อ *V. harveyi* ในเลือดเท่ากับ 443.3 ± 287.51 , 494.2 ± 382.82 และ 257.5 ± 303.35 CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ แต่กุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมสารเบต้ากลูแคนปริมาณ 3 และ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม พบเชื้อ *V. harveyi* ในเลือดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับกลุ่มควบคุมซึ่งมีค่า 780 ± 486.75 CFU/มิลลิลิตร ได้ผลดังตารางที่ 4 และภาพที่ 4

ตารางที่ 4 ปริมาณแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* (CFU/มิลลิลิตร) ในเลือดกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมเบต้ากลูแคนความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 7 วัน หลังจากฉีดเชื้อ *V. harveyi* เข้าไปในระบบเลือดเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

| ปริมาณเบต้ากลูแคน (กรัม/อาหาร 1 กก.) | ปริมาณ <i>V. harveyi</i> (CFU/มิลลิลิตร) |
|---|--|
| 0 | 780 ± 486.75^b |
| 1 | 494.2 ± 382.82^{ab} |
| 3 | 443.3 ± 287.51^a |
| 5 | 257.5 ± 303.35^a |

ค่าเฉลี่ยตามด้วยอักษรเหมือนกันภายในแถวตั้งเดียวกันจะไม่แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ $p>0.05$, DMRT



ภาพที่ 4 ปริมาณแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* (CFU/มิลลิลิตร) ในเลือดกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมเบต้ากลูแคนความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 7 วัน หลังจากฉีดเชื้อ *V. harveyi* เข้าไปในระบบเลือดเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

1.2 ผลการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมของการใช้สารเบต้ากลูแคนกับกุ้งกุลาดำ

ผลการตรวจองค์ประกอบทางระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำหลังจากเลี้ยงกุ้งเป็นเวลานาน 10 สัปดาห์ โดยแบ่งเป็น 4 ชุดการทดลอง ๆ ละ 3 ซ้ำ ในชุดการทดลองที่ 1 ให้อาหารปกติทุกมื้อ ชุดการทดลองที่ 2 ให้กินอาหารผสมสารเบต้ากลูแคน 3 วันใน 1 สัปดาห์ ชุดการทดลองที่ 3 ให้กินอาหารผสมเบต้ากลูแคน 5 วันใน 1 สัปดาห์ และชุดการทดลองที่ 4 ให้กินอาหารผสมสารเบต้ากลูแคนทุกวัน เป็นเวลานาน 4 สัปดาห์ หลังจากนั้นให้อาหารปกติ 4 สัปดาห์ และให้กินอาหารผสมสารเบต้ากลูแคนปริมาณเท่าเดิมอีก 2 สัปดาห์ ตรวจองค์ประกอบทางระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำทุกสัปดาห์ ได้ผลการทดลองดังนี้

1.2.1 ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase

การตรวจวัดปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase ในสัปดาห์ที่ 1-4 เมื่อมีการให้สารเบต้ากลูแคนพบว่าในสัปดาห์แรกการให้สารเบต้ากลูแคน 3 วัน/สัปดาห์นั้นไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม จนถึงสัปดาห์ที่ 4 จึงพบว่าการให้เบต้ากลูแคน 3 วัน/สัปดาห์นั้นแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่อย่างไรก็ตามระบบภูมิคุ้มกันที่เพิ่มขึ้นในกุ้งกุลาดำที่ได้รับเบต้ากลูแคน 3 วันต่อสัปดาห์นั้น จะมีปริมาณภูมิคุ้มกันสูงเมื่อมีการให้สารเบต้ากลูแคนเท่านั้น เมื่อ

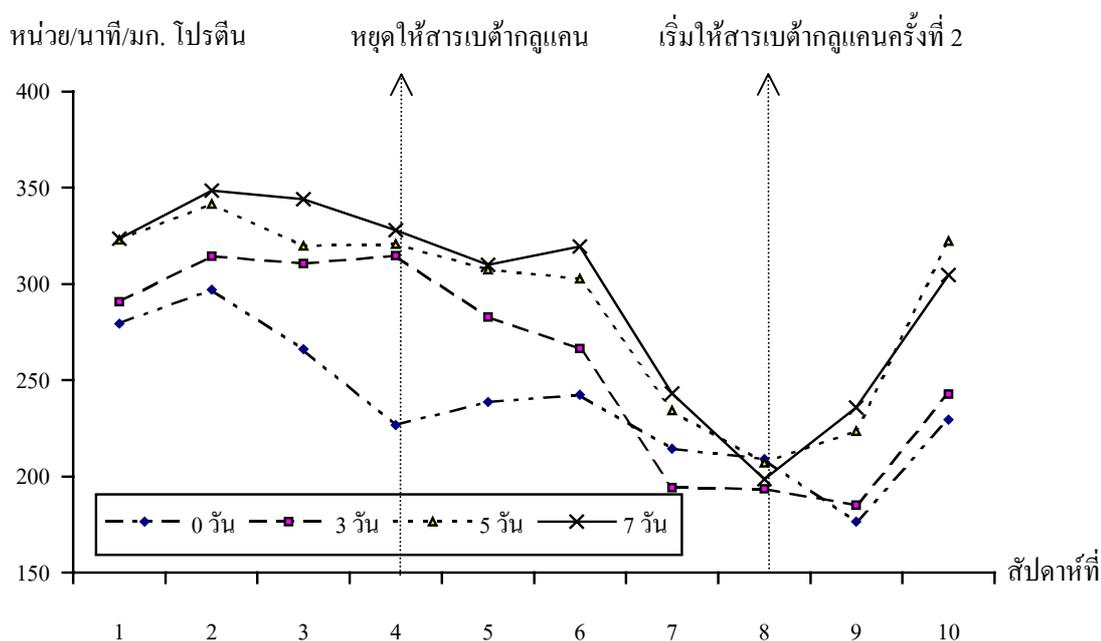
หยุดให้สารเบต้ากลูแคนเพียง 1 สัปดาห์ ระบบภูมิคุ้มกันก็ลดลงทันที ส่วนการใช้สารเบต้ากลูแคน 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เลี้ยงกิ้งกูดำ 5 วัน/สัปดาห์นั้นแตกต่างจากกลุ่มควบคุมตั้งแต่สัปดาห์แรก จนถึงสัปดาห์ที่ 4 และเมื่อหยุดให้สารเบต้ากลูแคน 2 สัปดาห์ ระบบภูมิคุ้มกันก็เริ่มลดลง และปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase จะเพิ่มสูงขึ้นอีกครั้งเมื่อกิ้งได้รับสารเบต้ากลูแคน โดยการให้สารเบต้ากลูแคน 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เลี้ยงกิ้งกูดำ 5 วัน/สัปดาห์จะมีผลในการเพิ่มปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) จากการให้สารเบต้ากลูแคน 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัมเลี้ยงกิ้งกูดำ 7 วัน/สัปดาห์ ผลการตรวจปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase แสดงในตารางที่ 5 และ ภาพที่ 5

ตารางที่ 5 ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase (หน่วย/นาที/มก. โปรตีน) ของกิ้งกูดำที่ได้รับอาหารผสมเบต้ากลูแคนปริมาณ 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ระยะเวลาต่าง ๆ ได้แก่ 0 วัน 3 วัน 5 วัน และ 7 วัน ต่อสัปดาห์ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ อาหารปกติ 4 สัปดาห์ และให้กินอาหารผสมสารเบต้ากลูแคนปริมาณเท่าเดิมอีก 2 สัปดาห์

| Treatment สัปดาห์ที่ | ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase (หน่วย/นาที/มก. โปรตีน) | | | |
|-------------------------|---|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | BG 0 วัน / สัปดาห์ | BG 3 วัน / สัปดาห์ | BG 5 วัน / สัปดาห์ | BG 7 วัน / สัปดาห์ |
| 1 | 279.333 ± 36.575 ^a | 290.917 ± 36.51 ^{ab} | 323.00 ± 54.213 ^b | 323.75 ± 35.894 ^b |
| 2 | 297.075 ± 24.64 ^a | 314.348 ± 29.86 ^{ab} | 341.6 ± 25.8 ^b | 348.47 ± 29.08 ^b |
| 3 | 266.25 ± 31.51 ^a | 310.56 ± 26.53 ^{ab} | 319.81 ± 68.42 ^{ab} | 344.19 ± 20.69 ^b |
| 4 | 226.563 ± 66.002 ^a | 314.88 ± 25.787 ^b | 320.813 ± 30.284 ^b | 328 ± 24.755 ^b |
| 5 | 238.813 ± 34.092 ^a | 282.938 ± 38.22 ^{ab} | 307.563 ± 29.06 ^b | 310.188 ± 42.211 ^b |
| 6 | 242.56 ± 36.899 ^a | 266.375 ± 32.993 ^a | 302.69 ± 67.652 ^a | 319.438 ± 48.159 ^a |
| 7 | 214.47 ± 41.631 ^a | 194.215 ± 48.774 ^a | 234.174 ± 34.862 ^a | 243.069 ± 40.146 ^a |
| 8 | 208.975 ± 40.127 ^a | 193.602 ± 52.543 ^a | 207.062 ± 70.75 ^a | 198.609 ± 37.504 ^a |
| 9 | 176.7 ± 25.9 ^a | 185.1 ± 68.4 ^a | 223.6 ± 82.8 ^a | 235.9 ± 51.7 ^a |
| 10 | 229.58 ± 44 ^a | 242.88 ± 37.31 ^a | 322.38 ± 36.63 ^b | 304.69 ± 5.892 ^b |

ค่าเฉลี่ยตามด้วยอักษรเหมือนกันภายในแถวตั้งเดียวกันจะไม่แตกต่างกันทางสถิติ

อย่างมีนัยสำคัญ $p>0.05$, DMRT



ภาพที่ 5 ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase (หน่วย/นาที/มก. โปรตีน) ของกึ่งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมเบต้ากลูแคนปริมาณ 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ระยะเวลาต่าง ๆ ได้แก่ 0 วัน 3 วัน 5 วัน และ 7 วัน ต่อสัปดาห์ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ อาหารปกติ 4 สัปดาห์ และให้กินอาหารผสมสารเบต้ากลูแคนปริมาณเท่าเดิมอีก 2 สัปดาห์

2.1.2 การผลิต superoxide anion

การตรวจวัดปริมาณการผลิต superoxide anion ในสัปดาห์ที่ 1-4 เมื่อมีการให้สารเบต้ากลูแคนพบว่าในสัปดาห์แรกถึงสัปดาห์ที่ 3 การให้สารเบต้ากลูแคน 3 วัน/สัปดาห์นั้นไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม จนถึงสัปดาห์ที่ 4 จึงพบว่าการให้เบต้ากลูแคน 3 วัน/สัปดาห์นั้นแตกต่างจากกลุ่มควบคุม แต่อย่างไรก็ตามระบบภูมิคุ้มกันที่เพิ่มขึ้นในกึ่งกุลาดำที่ได้รับเบต้ากลูแคน 3 วันต่อสัปดาห์นั้น จะมีปริมาณภูมิคุ้มกันสูงเมื่อมีการให้สารเบต้ากลูแคนเท่านั้น เมื่อหยุดให้สารเบต้ากลูแคนเพียง 1 สัปดาห์ระบบภูมิคุ้มกันก็ลดลงทันที ส่วนการใช้สารเบต้ากลูแคน 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เลี้ยงกึ่งกุลาดำ 5 วัน และ 7 วัน/สัปดาห์นั้น แตกต่างจากกลุ่มควบคุมตั้งแต่สัปดาห์แรกจนถึงสัปดาห์ที่ 4 และเมื่อหยุดให้สารเบต้ากลูแคน 3 สัปดาห์ ระบบภูมิคุ้มกันก็เริ่มลดลงแต่ก็ยังแตกต่างจากกลุ่มควบคุม และจะเพิ่มสูงขึ้นอีกครั้งเมื่อกึ่งได้รับสารเบต้ากลูแคน โดยการให้สารเบต้ากลูแคน 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เลี้ยงกึ่งกุลาดำ 5 วัน/สัปดาห์จะมีผลในการเพิ่มปริมาณการผลิต superoxide anion ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) จากการให้สารเบต้ากลูแคน 3 กรัม/อาหาร 1

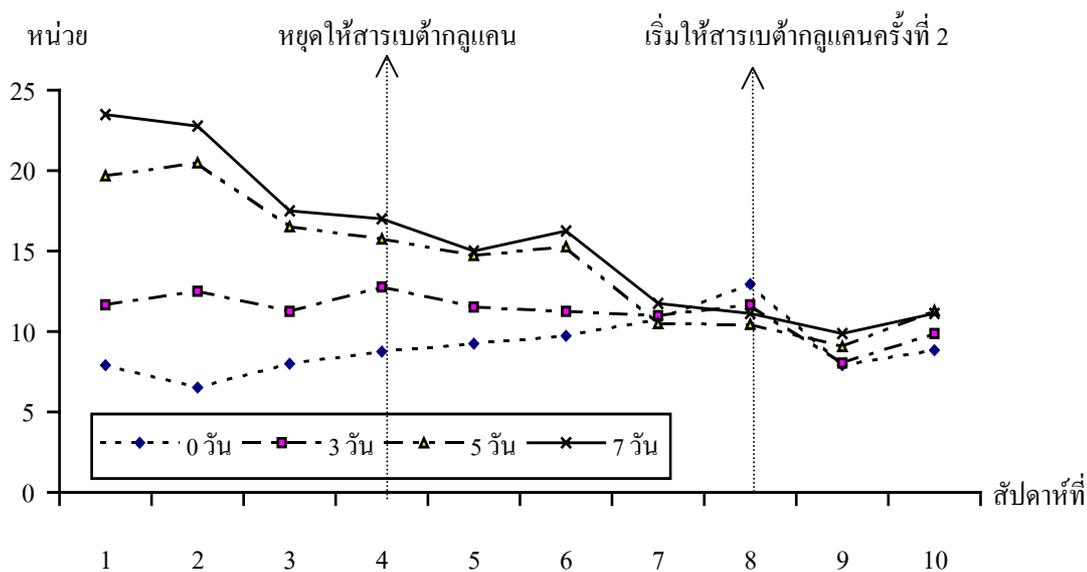
กิโลกรัม เป็นเวลา 7 วัน/สัปดาห์ ผลการตรวจปริมาณการผลิต superoxide anion แสดงในตารางที่ 6 และภาพที่ 6

ตารางที่ 6 ปริมาณการผลิต superoxide anion (หน่วย) ของกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสม เบต้ากลูแคนปริมาณ 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ระยะเวลาต่าง ๆ ได้แก่ 0 วัน 3 วัน 5 วัน และ 7 วัน ต่อสัปดาห์ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ อาหารปกติ 4 สัปดาห์ และให้กินอาหารผสมสารเบต้ากลูแคนปริมาณเท่าเดิมอีก 2 สัปดาห์

| Treatment สัปดาห์ที่ | ปริมาณการผลิต superoxide anion (หน่วย) | | | |
|-------------------------|--|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| | BG 0 วัน / สัปดาห์ | BG 3 วัน / สัปดาห์ | BG 5 วัน / สัปดาห์ | BG 7 วัน / สัปดาห์ |
| 1 | 7.917 ± 4.033 ^a | 11.667 ± 3.499 ^a | 19.667 ± 4.793 ^b | 23.5 ± 5.823 ^c |
| 2 | 6.5 ± 2.38 ^a | 12.5 ± 3.873 ^a | 20.5 ± 4.655 ^b | 22.75 ± 4.349 ^b |
| 3 | 8 ± 3.162 ^a | 11.25 ± 1.708 ^a | 16.5 ± 5.568 ^b | 17.5 ± 1.291 ^b |
| 4 | 8.75 ± 2.217 ^a | 12.75 ± 1.258 ^b | 15.75 ± 2.63 ^{bc} | 17 ± 1.826 ^c |
| 5 | 9.25 ± 3.5 ^a | 11.5 ± 1.732 ^{ab} | 14.75 ± 2.062 ^b | 15 ± 2.16 ^b |
| 6 | 9.75 ± 2.062 ^a | 11.25 ± 1.708 ^a | 15.25 ± 1.708 ^b | 16.25 ± 2.363 ^b |
| 7 | 10.75 ± 1.708 ^a | 11 ± 2.582 ^a | 10.5 ± 3.109 ^b | 11.75 ± 2.63 ^b |
| 8 | 12.925 ± 5.6 ^a | 11.65 ± 1.729 ^a | 10.425 ± 2.458 ^a | 11.1 ± 2.697 ^a |
| 9 | 7.9 ± 2.68 ^a | 8.025 ± 2.48 ^a | 9.075 ± 2.72 ^a | 9.85 ± 2.2 ^a |
| 10 | 8.83 ± 1.22 ^a | 9.88 ± 0.78 ^{ab} | 11.3 ± 1.1 ^b | 11.13 ± 1.62 ^b |

ค่าเฉลี่ยตามด้วยอักษรเหมือนกันภายในแถวตั้งเดียวกันจะไม่แตกต่างกันทางสถิติ

อย่างมีนัยสำคัญ $p > 0.05$, DMRT



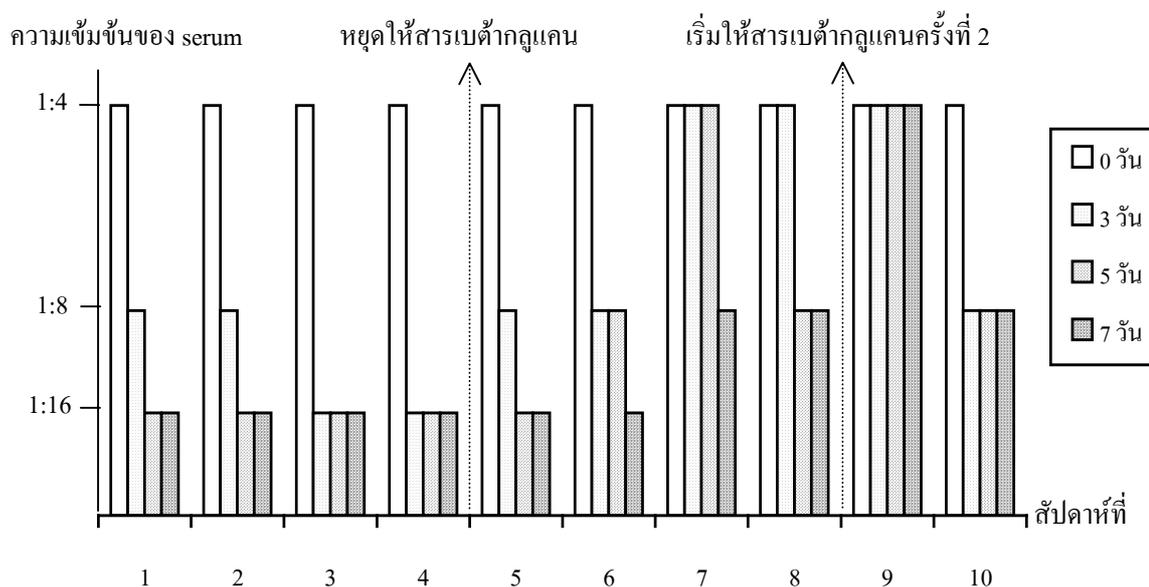
ภาพที่ 6 ปริมาณการผลิต superoxide anion (หน่วย) ของกิ้งกูดาค่าที่ได้รับอาหารผสม เบต้ากลูแคนปริมาณ 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ระยะเวลาต่าง ๆ ได้แก่ 0 วัน 3 วัน 5 วัน และ 7 วัน ต่อสัปดาห์ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ อาหารปกติ 4 สัปดาห์ และให้กินอาหารผสมสารเบต้ากลูแคนปริมาณเท่าเดิมอีก 2 สัปดาห์

2.1.3 Bactericidal activity

ค่า bactericidal activity เมื่อเลี้ยงกิ้งกูดาค่าโดยใช้สารเบต้ากลูแคน 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม 3, 5 และ 7 วัน/สัปดาห์ จะมีค่า bactericidal activity แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ตั้งแต่สัปดาห์แรกถึงสัปดาห์ที่ 4 และเมื่อหยุดให้สารเบต้ากลูแคน 2 สัปดาห์ ระบบภูมิคุ้มกันก็ลดลงทันที ส่วนการใช้สารเบต้ากลูแคน 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เลี้ยงกิ้งกูดาค่า 5 วัน/สัปดาห์นั้น มีค่า bactericidal activity แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ตั้งแต่สัปดาห์แรกถึงสัปดาห์ที่ 4 และเมื่อหยุดให้สารเบต้ากลูแคน 2 สัปดาห์ ระบบภูมิคุ้มกันก็ลดลง และเพิ่มสูงขึ้นอีกเมื่อกิ้งได้รับสารเบต้ากลูแคนในปริมาณเท่าเดิม โดยการให้สารเบต้ากลูแคน 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เลี้ยงกิ้งกูดาค่า 5 วัน/สัปดาห์ จะมีผลในการเพิ่มค่า bactericidal activity แตกต่างจากการให้สารเบต้ากลูแคน 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เลี้ยงกิ้งกูดาค่า 7 วัน/สัปดาห์ ผลดังตารางที่ 7 และ ภาพที่ 7

ตารางที่ 7 ค่า bactericidal activity ของกึ่งกลูตาตัมที่ได้รับอาหารผสมเบต้ากลูแคนปริมาณ 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ระยะเวลาต่าง ๆ ได้แก่ 0 วัน 3 วัน 5 วัน และ 7 วัน ต่อ สัปดาห์ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ อาหารปกติ 4 สัปดาห์ และให้กินอาหารผสมสารเบต้ากลูแคนความเข้มข้นเท่าเดิมอีก 2 สัปดาห์

| Treatment สัปดาห์ที่ | ความเข้มข้นของซีรัมที่น้อยที่สุดที่ทำให้แบคทีเรียลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ | | | |
|-------------------------|--|--------------------|--------------------|--------------------|
| | BG 0 วัน / สัปดาห์ | BG 3 วัน / สัปดาห์ | BG 5 วัน / สัปดาห์ | BG 7 วัน / สัปดาห์ |
| 1 | 1 : 4 | 1 : 8 | 1 : 16 | 1 : 16 |
| 2 | 1 : 4 | 1 : 8 | 1 : 16 | 1 : 16 |
| 3 | 1 : 4 | 1 : 16 | 1 : 16 | 1 : 16 |
| 4 | 1 : 4 | 1 : 16 | 1 : 16 | 1 : 16 |
| 5 | 1 : 4 | 1 : 8 | 1 : 16 | 1 : 16 |
| 6 | 1 : 4 | 1 : 8 | 1 : 8 | 1 : 16 |
| 7 | 1 : 4 | 1 : 4 | 1 : 4 | 1 : 8 |
| 8 | 1 : 4 | 1 : 4 | 1 : 8 | 1 : 8 |
| 9 | 1 : 4 | 1 : 4 | 1 : 4 | 1 : 4 |
| 10 | 1 : 4 | 1 : 8 | 1 : 8 | 1 : 8 |



ภาพที่ 7 ค่า bactericidal activity ของกึ่งกลาดำที่ได้รับอาหารผสมเบต้ากลูแคนปริมาณ 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ระยะเวลาต่าง ๆ ได้แก่ 0 วัน 3 วัน 5 วัน และ 7 วัน ต่อ สัปดาห์ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ อาหารปกติ 4 สัปดาห์ และให้กินอาหารผสมสาร เบต้ากลูแคนความเข้มข้นเท่าเดิมอีก 2 สัปดาห์

2. การศึกษาผลของสารเปปติโดกลัยแคนต่อระบบภูมิคุ้มกันของกึ่งกลาดำ

2.1 การศึกษาปริมาณที่เหมาะสมในการใช้เพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกึ่งกลาดำ

เมื่อเลี้ยงกึ่งกลาดำด้วยอาหารผสมเปปติโดกลัยแคนความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 0, 0.06, 0.12 และ 0.18 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม วันละ 5 มื้อ เป็นระยะเวลา 7 วัน เมื่อครบ 7 วันแล้ว ทำการ ดูดเลือดจากกึ่งกลาดำ และทำการตรวจองค์ประกอบต่าง ๆ ทางด้านความต้านทานโรค ได้ผลดังนี้

2.1.1 ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase

ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase เมื่อเลี้ยงกึ่งกลาดำโดยใช้สารเปปติโดกลัยแคน ปริมาณ 0.18 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีค่าเฉลี่ย 358.26 ± 42.42 หน่วย/นาที่/มก. โปรตีน ซึ่งแตกต่าง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จากการเลี้ยงกึ่งกลาดำโดยใช้อาหารผสมสารเปปติโดกลัยแคน ปริมาณ 0.06 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม 0.12 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม และกลุ่มควบคุม ซึ่งมีค่า

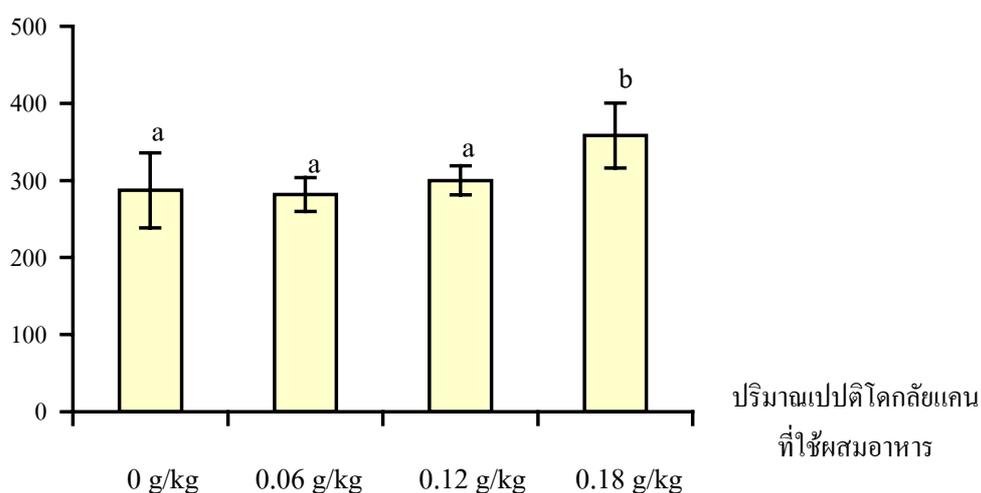
281.898 ± 21.821, 300.033 ± 18.971 และ 287.125 ± 48.892 หน่วย/นาที/มก. โปรตีน ตามลำดับ
ได้ผลดังตารางที่ 8 และภาพที่ 8

ตารางที่ 8 ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase (หน่วย/นาที/มก. โปรตีน) ของกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหาร
ผสมเปปติโดกลัยแคนความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 7 วัน

| ปริมาณเปปติโดกลัยแคน (กรัม/อาหาร 1 กก.) | ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase (หน่วย/นาที/มก. โปรตีน) |
|--|--|
| 0 | 287.125 ± 48.892 ^a |
| 0.06 | 281.898 ± 21.821 ^a |
| 0.12 | 300.033 ± 18.971 ^a |
| 0.18 | 358.26 ± 42.42 ^b |

ค่าเฉลี่ยตามด้วยอักษรเหมือนกันภายในแถวตั้งเดียวกันจะไม่แตกต่างกันทางสถิติ
อย่างมีนัยสำคัญ $p > 0.05$, DMRT

หน่วย/นาที/มก. โปรตีน



ภาพที่ 8 ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase (หน่วย/นาที/มก. โปรตีน) ของกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหาร
ผสมเปปติโดกลัยแคนความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 7 วัน

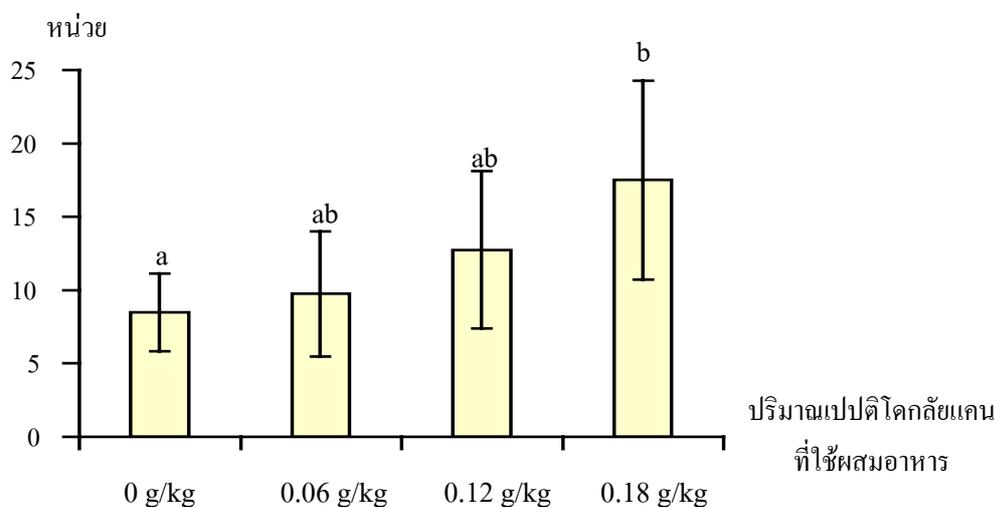
2.1.2 การผลิต superoxide anion

เมื่อทำการเลี้ยงกุ้งกุลาดำด้วยอาหารผสมเปปติโดกลัยแคนความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 0, 0.06, 0.12 และ 0.18 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม วันละ 5 มื้อ เป็นระยะเวลา 7 วัน เมื่อครบ 7 วัน ทำการดูดเลือดจากกุ้งเพื่อตรวจสอบปริมาณการผลิต superoxide anion (หน่วย) พบว่าค่าการผลิต superoxide anion เมื่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำโดยใช้อาหารผสมสารเปปติโดกลัยแคนปริมาณ 0.18 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัมจะมีค่าเฉลี่ยสูงสุด โดยมีค่าเฉลี่ย 17.5 ± 6.758 หน่วย ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) จากการเลี้ยงกุ้งกุลาดำด้วยอาหารผสมเปปติโดกลัยแคนปริมาณ 0.06 และ 0.12 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ซึ่งมีค่าเฉลี่ย 9.75 ± 4.272 และ 12.75 ± 5.377 หน่วย ตามลำดับ แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จากกลุ่มควบคุมซึ่งมีค่าเฉลี่ย 8.5 ± 2.646 หน่วย ได้ผลดังตารางที่ 9 และภาพที่ 9

ตารางที่ 9 ปริมาณการผลิต superoxide anion (หน่วย) ของกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมเปปติโดกลัยแคนความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 7 วัน

| ปริมาณเปปติโดกลัยแคน (กรัม/อาหาร 1 กก.) | ปริมาณการผลิต superoxide anion (หน่วย) |
|--|---|
| 0 | 8.5 ± 2.646^a |
| 0.06 | 9.75 ± 4.272^{ab} |
| 0.12 | 12.75 ± 5.377^{ab} |
| 0.18 | 17.5 ± 6.758^b |

ค่าเฉลี่ยตามด้วยอักษรเหมือนกันภายในแถวตั้งเดียวกันจะไม่แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ $p > 0.05$, DMRT



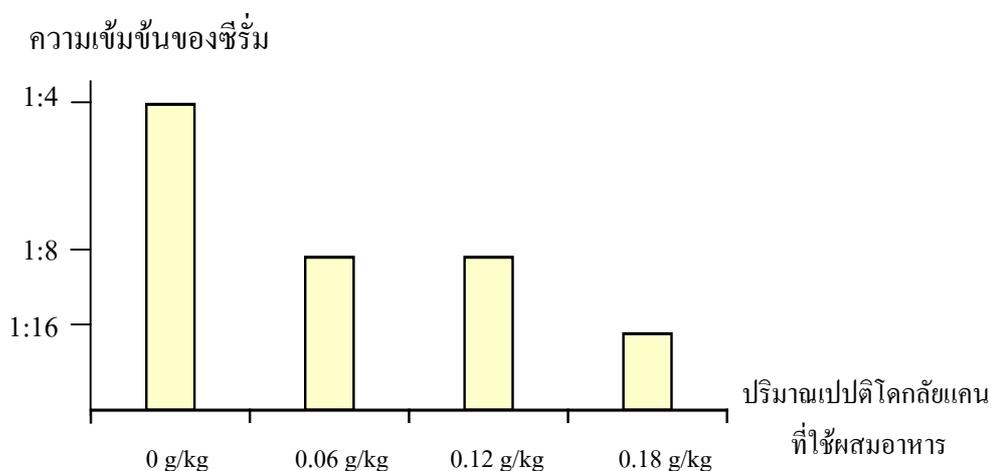
ภาพที่ 9 ปริมาณการผลิต superoxide anion (หน่วย) ของกึ่งกลาดำที่ได้รับอาหารผสมเปปติโดกลัยแคนความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 7 วัน

2.1.3 Bactericidal activity

ค่า bactericidal activity เมื่อเลี้ยงกึ่งกลาดำโดยใช้อาหารผสมสารเปปติโดกลัยแคนปริมาณ 0.18 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีค่าเท่ากับ 1:16 ซึ่งแตกต่างจากการเลี้ยงกึ่งกลาดำโดยใช้อาหารผสมสารเปปติโดกลัยแคนปริมาณ 0.06 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม 0.12 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม และกลุ่มควบคุม ซึ่งมีค่า bactericidal activity เท่ากับ 1:8, 1:8 และ 1:4 ตามลำดับ ดังตารางที่ 10 และภาพที่ 10

ตารางที่ 10 ค่า bactericidal activity ของกึ่งกลาดำที่ได้รับอาหารผสมเปปติโดกลัยแคนความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 7 วัน

| ปริมาณเปปติโดกลัยแคน (กรัม/อาหาร 1 กก.) | ความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของซีรัมที่ทำให้แบคทีเรียลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ |
|---|---|
| 0 | 1 : 4 |
| 0.06 | 1 : 8 |
| 0.12 | 1 : 8 |
| 0.18 | 1 : 16 |



ภาพที่ 10 ค่า bactericidal activity ของกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมเปปติโดกลัยแคนความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 7 วัน

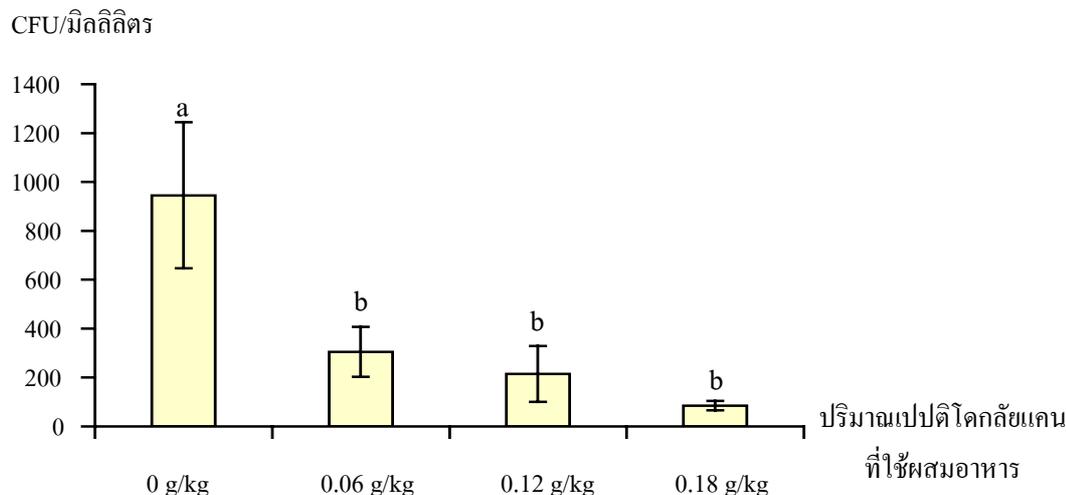
2.1.4 Clearance ability

ค่า clearance ability เมื่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำโดยใช้อาหารผสมสารเปปติโดกลัยแคนปริมาณ 0.18 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) จากการเลี้ยงกุ้งกุลาดำโดยใช้อาหารผสมสารเปปติโดกลัยแคนปริมาณ 0.06 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม และ 0.12 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม กลุ่มควบคุมซึ่งมีค่าเฉลี่ยของปริมาณเชื้อ *V. harveyi* เท่ากับ 85 ± 19.149 , 305 ± 102.47 และ 215 ± 114.746 CFU/มิลลิลิตรตามลำดับ แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับกลุ่มควบคุมซึ่งมีค่าเฉลี่ย 945 ± 298.843 CFU/มิลลิลิตร ดังตารางที่ 11 และภาพที่ 11

ตารางที่ 11 ปริมาณ *Vibrio harveyi* (CFU/มิลลิลิตร) ในเลือดกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมเปปติโดกลัยแคนความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 7 วัน หลังจากฉีดเชื้อ *V. harveyi* เข้าไปในระบบเลือดเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

| ปริมาณเปปติโดกลัยแคน (กรัม/อาหาร 1 กก.) | ปริมาณ <i>V. harveyi</i> (CFU/มิลลิลิตร) |
|---|--|
| 0 | 945 ± 298.843^a |
| 0.06 | 305 ± 102.47^b |
| 0.12 | 215 ± 114.746^b |
| 0.18 | 85 ± 19.149^b |

ค่าเฉลี่ยตามด้วยอักษรเหมือนกันภายในแถวตั้งเดียวกันจะไม่แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ $p>0.05$, DMRT



ภาพที่ 11 ปริมาณ *Vibrio harveyi* (CFU/มิลลิลิตร) ในเลือดกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมเปปติโดกลัยแคนความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 7 วัน หลังจากฉีดเชื้อ *V. harveyi* เข้าไปในระบบเลือดเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

2.2 ผลการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมของการใช้สารเปปติโดกลัยแคนกับกุ้งกุลาดำ

ผลการตรวจองค์ประกอบทางระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำหลังจากเลี้ยงกุ้งเป็นเวลานาน 10 สัปดาห์ โดยแบ่งเป็น 4 ชุดการทดลอง ๆ ละ 4 ซ้ำ ในชุดการทดลองที่ 1 ให้อาหารปกติทุกมื้อ ชุดการทดลองที่ 2 ให้กินอาหารผสมสารเปปติโดกลัยแคน 0.18 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม 3 วันใน 1 สัปดาห์ ชุดการทดลองที่ 3 ให้กินอาหารผสมเปปติโดกลัยแคน 0.18 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม 5 วันใน 1 สัปดาห์ และชุดการทดลองที่ 4 ให้กินอาหารผสมสารเปปติโดกลัยแคน 0.18 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัมทุกวัน โดยให้เป็นเวลานาน 4 สัปดาห์ ให้อาหารปกติ 4 สัปดาห์ และให้อาหารผสมสารเปปติโดกลัยแคนในปริมาณเท่าเดิมอีกเป็นเวลานาน 2 สัปดาห์ และตรวจองค์ประกอบทางระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำทุกสัปดาห์ ได้ผลการทดลองดังนี้

2.2.1 ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase

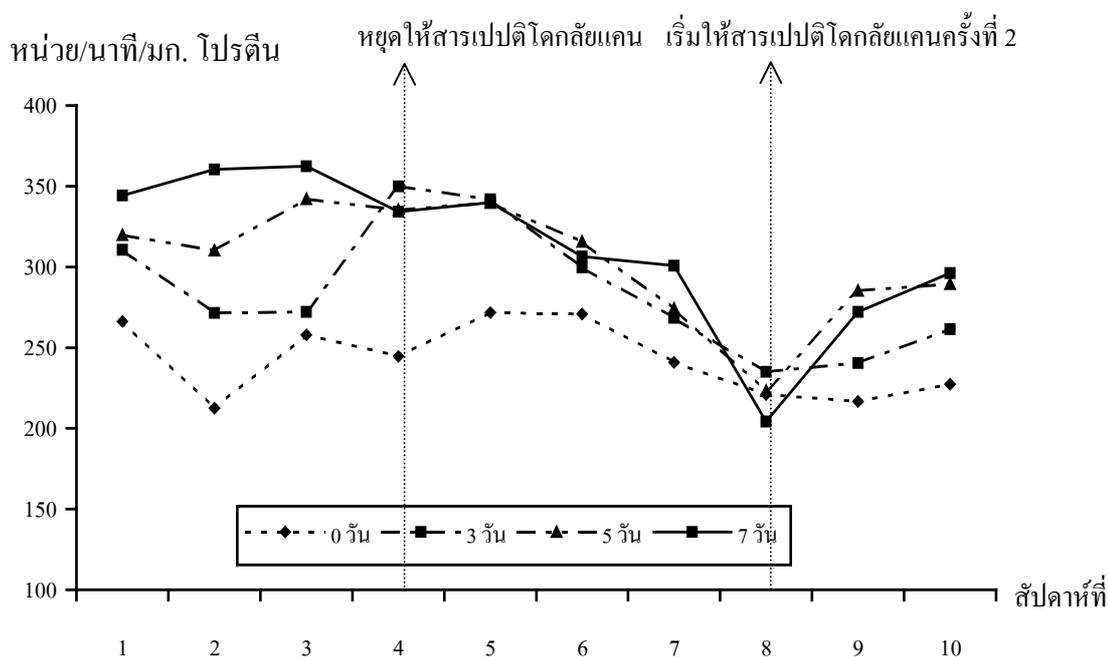
การตรวจวัดปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase ในสัปดาห์ที่ 1-4 เมื่อมีการให้สารเปปติโดกลัยแคน 0.18 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม พบว่าในสัปดาห์แรกการให้สารเปปติโดกลัยแคน 3 วัน/สัปดาห์นั้นไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม จนถึงสัปดาห์ที่ 4 จึงพบว่าการให้เปปติโดกลัยแคน 3 วัน/สัปดาห์นั้นแตกต่างจากกลุ่มควบคุม ส่วนการให้สารเปปติโดกลัยแคน 0.18 กรัม/อาหาร 1

กิโลกรัม 5 วัน/สัปดาห์ และ 7 วัน/สัปดาห์นั้นจะมีปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase แตกต่างจากกลุ่มควบคุมตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 และสัปดาห์แรกตามลำดับ แต่หลังจากที่หยุดให้สารเปปติโดกลัยแคน 2 สัปดาห์ ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase ก็ลดลงในทุกกลุ่มทดลองและไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) จากกลุ่มควบคุม โดยการให้สารเปปติโดกลัยแคน 0.18 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เลี้ยงกึ่งกุลาดำ 3 วัน/สัปดาห์ จะมีปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) จากกลุ่มควบคุมที่ใช้สารเปปติโดกลัยแคน 0.18 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เลี้ยงกึ่งกุลาดำ 5 วัน และ 7 วัน/สัปดาห์ ผลการตรวจปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase (หน่วย/นาที/มก. โปรตีน) ได้ผลดังตารางที่ 12 และภาพที่ 12

ตารางที่ 12 ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase (หน่วย/นาที/มก. โปรตีน) ของกึ่งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมเปปติโดกลัยแคนปริมาณ 0.18 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ระยะเวลาต่าง ๆ ได้แก่ 0 วัน 3 วัน 5 วัน และ 7 วันต่อสัปดาห์ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ อาหารปกติ 4 สัปดาห์ และอาหารผสมเปปติโดกลัยแคนในปริมาณเท่าเดิมอีก 2 สัปดาห์

| Treatment สัปดาห์ที่ | ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase (หน่วย/นาที/มก. โปรตีน) | | | |
|-------------------------|---|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | PG 0 วัน / สัปดาห์ | PG 3 วัน / สัปดาห์ | PG 5 วัน / สัปดาห์ | PG 7 วัน / สัปดาห์ |
| 1 | 266.25 ± 31.51 ^a | 310.56 ± 26.53 ^{ab} | 319.81 ± 68.42 ^{ab} | 344.19 ± 20.69 ^b |
| 2 | 212.5 ± 36.64 ^a | 271.5 ± 47.69 ^{ab} | 310.3 ± 33.52 ^{bc} | 360.5 ± 44.89 ^c |
| 3 | 258.08 ± 62.25 ^a | 272.28 ± 56.32 ^a | 342.19 ± 25.04 ^b | 362.41 ± 60.84 ^c |
| 4 | 244.75 ± 42.397 ^a | 350.06 ± 24.283 ^b | 335.42 ± 46.643 ^b | 334.13 ± 30.846 ^b |
| 5 | 271.75 ± 37.47 ^a | 341.96 ± 5.634 ^b | 339.79 ± 32.039 ^b | 339.97 ± 28.529 ^b |
| 6 | 270.77 ± 16.26 ^a | 299.79 ± 20.47 ^b | 315.71 ± 18.88 ^b | 306.46 ± 11.29 ^b |
| 7 | 240.9 ± 45.14 ^a | 268.5 ± 45.67 ^a | 274.2 ± 24.9 ^a | 300.9 ± 35.18 ^a |
| 8 | 221 ± 40.23 ^a | 235.1 ± 39.02 ^a | 223.3 ± 49.42 ^a | 204.1 ± 32.68 ^a |
| 9 | 216.7 ± 34.6 ^a | 240.4 ± 22 ^{ab} | 285.2 ± 36.6 ^b | 272.3 ± 44.9 ^{ab} |
| 10 | 227.472 ± 54.37 ^a | 261.43 ± 12.69 ^{ab} | 289.495 ± 22.9 ^b | 296.131 ± 41.2 ^b |

ค่าเฉลี่ยตามด้วยอักษรเหมือนกันภายในแถวตั้งเดียวกันจะไม่แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ $p>0.05$, DMRT



ภาพที่ 12 ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase (หน่วย/นาทีก. โปรตีน) ของกึ่งกุลาคำที่ได้รับอาหารผสมเปปติโดกลัยแคน ปริมาณ 0.18 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ระยะเวลาต่าง ๆ ได้แก่ 0 วัน 3 วัน 5 วัน และ 7 วัน ต่อสัปดาห์เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ อาหารปกติ 4 สัปดาห์ และอาหารผสมเปปติโดกลัยแคนปริมาณเท่าเดิมอีก 2 สัปดาห์

2.2.2 การผลิต superoxide anion

การตรวจวัดปริมาณการผลิต superoxide anion พบว่าในสัปดาห์แรกถึงสัปดาห์ที่ 3 การให้สารเปปติโดกลัยแคน 3 และ 5 วัน/สัปดาห์ กึ่งกุลาคำจะมีปริมาณ superoxide anion ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ส่วนการให้สารเปปติโดกลัยแคน 0.18 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม 7 วัน/สัปดาห์นั้นจะมีปริมาณการผลิต superoxide anion แตกต่างจากกลุ่มควบคุมตั้งแต่สัปดาห์แรก และเมื่อหยุดให้สารเปปติโดกลัยแคน 2 สัปดาห์ ปริมาณการผลิต superoxide anion ก็ลดลงในทุกกลุ่มทดลองและไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) จากกลุ่มควบคุม โดยการให้สารเปปติโดกลัยแคน 0.18 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เลี้ยงกึ่งกุลาคำ 3 วัน/สัปดาห์ จะมีปริมาณการผลิต superoxide anion ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) จากกลุ่มควบคุมที่ใช้สารเปปติโดกลัยแคน 0.18 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เลี้ยงกึ่งกุลาคำ 5 วัน และ 7 วัน/สัปดาห์ ผลการตรวจวัดปริมาณการผลิต superoxide anion ได้ผลดังตารางที่ 13 และภาพที่ 13

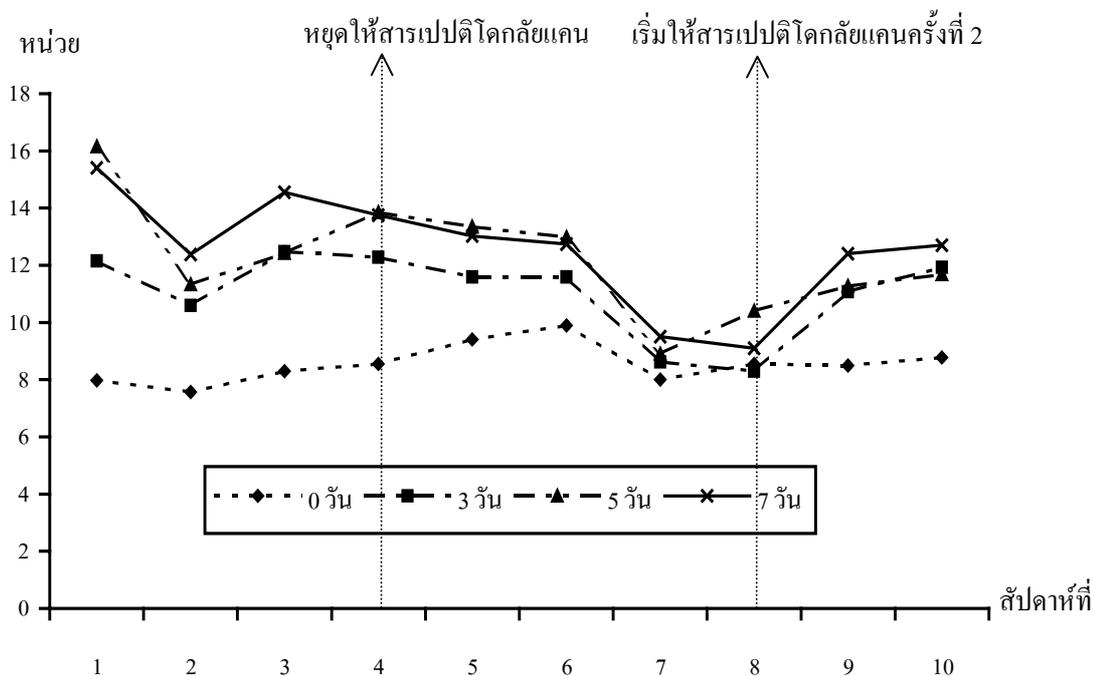
ตารางที่ 13 ปริมาณการผลิต superoxide anion ของกึ่งกุลาคำที่ได้รับอาหารผสม

เปปติโดกลัยแคนปริมาณ 0.18 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ระยะเวลาต่าง ๆ ได้แก่ 0 วัน
3 วัน 5 วัน และ 7 วัน ต่อสัปดาห์ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ อาหารปกติ 4 สัปดาห์
และอาหารผสมเปปติโดกลัยแคนในปริมาณเท่าเดิมอีก 2 สัปดาห์

| Treatment สัปดาห์ที่ | ปริมาณการผลิต superoxide anion (หน่วย) | | | |
|-------------------------|--|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| | PG 0 วัน / สัปดาห์ | PG 3 วัน / สัปดาห์ | PG 5 วัน / สัปดาห์ | PG 7 วัน / สัปดาห์ |
| 1 | 7.975 ± 2.54 ^a | 12.15 ± 2.369 ^{ab} | 16.15 ± 4.074 ^b | 15.4 ± 6.405 ^b |
| 2 | 7.575 ± 2.46 ^a | 10.6 ± 1.608 ^{ab} | 11.33 ± 1.872 ^{ab} | 12.38 ± 3.921 ^b |
| 3 | 8.3 ± 2.171 ^a | 12.475 ± 1.425 ^{ab} | 12.425 ± 3.473 ^{ab} | 14.55 ± 2.867 ^b |
| 4 | 8.55 ± 1.544 ^a | 12.275 ± 2.004 ^{ab} | 13.85 ± 2.142 ^b | 13.75 ± 3.852 ^b |
| 5 | 9.4 ± 1.309 ^a | 11.6 ± 1.01 ^b | 13.35 ± 0.526 ^b | 13.025 ± 2.016 ^b |
| 6 | 9.9 ± 1.071 ^a | 11.6 ± 1.08 ^{ab} | 12.975 ± 1.418 ^b | 12.75 ± 1.533 ^b |
| 7 | 8 ± 3.125 ^a | 8.625 ± 3.103 ^a | 8.9 ± 3.31 ^a | 9.5 ± 2.244 ^a |
| 8 | 8.55 ± 3.114 ^a | 8.3 ± 4.011 ^a | 10.4 ± 3.251 ^a | 9.1 ± 4.08 ^a |
| 9 | 8.5 ± 2.33 ^a | 11.08 ± 1.06 ^{ab} | 11.28 ± 0.88 ^{ab} | 12.4 ± 2.75 ^b |
| 10 | 8.775 ± 3.161 ^a | 11.925 ± 0.846 ^b | 11.675 ± 1.239 ^b | 12.7 ± 0.535 ^b |

ค่าเฉลี่ยตามด้วยอักษรเหมือนกันภายในแถวตั้งเดียวกันจะไม่แตกต่างกันทางสถิติ

อย่างมีนัยสำคัญ $p > 0.05$, DMRT



ภาพที่ 13 ปริมาณการผลิต superoxide anion ของกิ่งกุหลาบดำที่ได้รับอาหารผสม

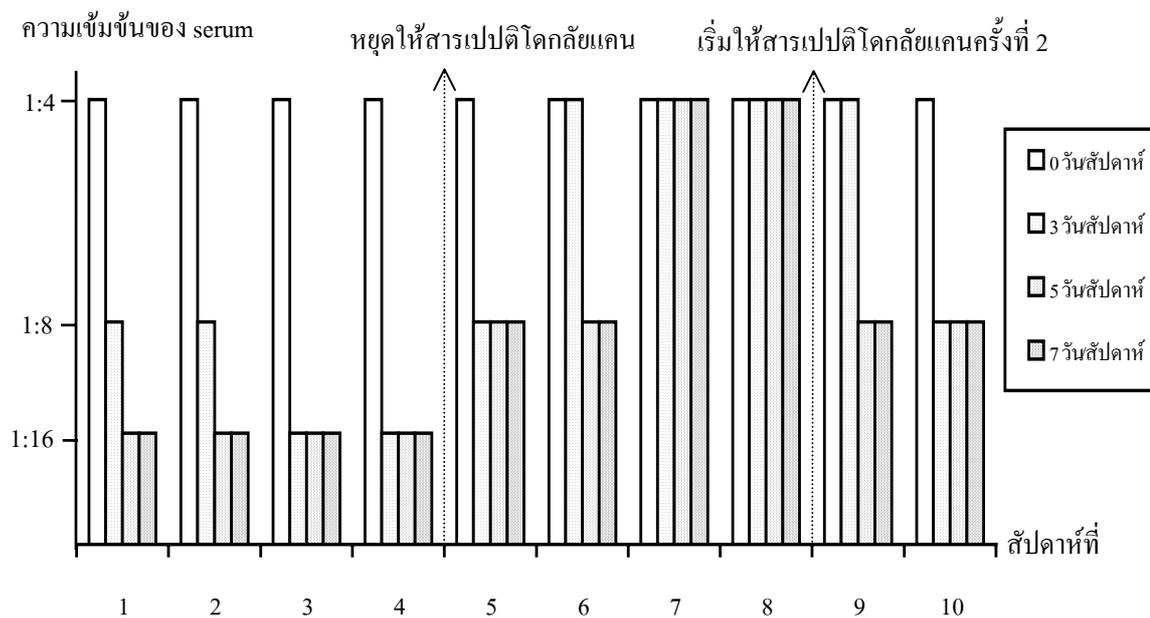
เปปติโดกลัยแคนปริมาณ 0.18 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ระยะเวลาต่าง ๆ ได้แก่ 0 วัน 3 วัน 5 วัน และ 7 วัน ต่อสัปดาห์ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ อาหารปกติ 4 สัปดาห์ และอาหารผสมเปปติโดกลัยแคนในปริมาณเท่าเดิมอีก 2 สัปดาห์

2.2.3 Bactericidal activity

ค่า bactericidal activity เมื่อมีการให้สารเปปติโดกลัยแคนพบว่า การให้เปปติโดกลัยแคน 3 วัน/สัปดาห์นั้นจะมีค่า bactericidal activity แตกต่างจากกลุ่มควบคุมตั้งแต่สัปดาห์แรกถึงสัปดาห์ที่ 4 และเมื่อหยุดให้สารเปปติโดกลัยแคน 2 สัปดาห์ ระบบภูมิคุ้มกันก็ลดลงทันที ส่วนการให้สารเปปติโดกลัยแคน 0.18 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เลี้ยงกิ่งกุหลาบดำ 5 วัน และ 7 วัน/สัปดาห์นั้น มีค่าความว่องไวในการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกิ่งกุหลาบดำแตกต่างจากกลุ่มควบคุมตั้งแต่สัปดาห์แรกถึงสัปดาห์ที่ 4 และค่า bactericidal activity นี้จะสูงกว่ากลุ่มควบคุมเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ หลังจากหยุดให้สารเปปติโดกลัยแคน ได้ผลดังตารางที่ 14 และภาพที่ 14

ตารางที่ 14 ค่า bactericidal activity ของกึ่งกลูตาที่ ได้รับอาหารผสมเปปติโดกลัยแคน ปริมาณ 0.18 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ระยะเวลาต่าง ๆ ได้แก่ 0 วัน 3 วัน 5 วัน และ 7 วัน ต่อสัปดาห์ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ อาหารปกติ 4 สัปดาห์ และอาหารผสมเปปติโดกลัยแคนในปริมาณเท่าเดิมอีก 2 สัปดาห์

| Treatment สัปดาห์ที่ | ความเข้มข้นของซีรัมที่น้อยที่สุดที่ทำให้แบคทีเรียลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ | | | |
|-------------------------|--|--------------------|--------------------|--------------------|
| | PG 0 วัน / สัปดาห์ | PG 3 วัน / สัปดาห์ | PG 5 วัน / สัปดาห์ | PG 7 วัน / สัปดาห์ |
| 1 | 1 : 4 | 1 : 8 | 1 : 16 | 1 : 16 |
| 2 | 1 : 4 | 1 : 8 | 1 : 16 | 1 : 16 |
| 3 | 1 : 4 | 1 : 16 | 1 : 16 | 1 : 16 |
| 4 | 1 : 4 | 1 : 16 | 1 : 16 | 1 : 16 |
| 5 | 1 : 4 | 1 : 8 | 1 : 16 | 1 : 16 |
| 6 | 1 : 4 | 1 : 8 | 1 : 8 | 1 : 16 |
| 7 | 1 : 4 | 1 : 4 | 1 : 4 | 1 : 8 |
| 8 | 1 : 4 | 1 : 4 | 1 : 8 | 1 : 8 |
| 9 | 1 : 4 | 1 : 4 | 1 : 8 | 1 : 8 |
| 10 | 1 : 4 | 1 : 8 | 1 : 8 | 1 : 8 |



ภาพที่ 14 ค่า bactericidal activity ของกึ่งกลาดำที่ได้รับอาหารผสมเปปติโดกลัยแคน ปริมาณ 0.18 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ระยะเวลาต่าง ๆ ได้แก่ 0 วัน 3 วัน 5 วัน และ 7 วัน ต่อสัปดาห์ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ อาหารปกติ 4 สัปดาห์ และอาหารผสมเปปติโดกลัยแคนในปริมาณเท่าเดิมอีก 2 สัปดาห์

3. การวิจัยการใช้ประโยชน์จากเชื้อแบคทีเรียสกุล *Bacillus* จากลำไส้กึ่งอุตสาหกรรมในการยับยั้งการเจริญเติบโต และแข่งขันการใช้สารอาหารในการเจริญเติบโตกับเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *Vibrio harveyi* และการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน

3.1 ผลการแยกชนิดของแบคทีเรียสกุล *Bacillus* จากลำไส้กึ่งอุตสาหกรรม

3.1.1 จำนวนแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ในลำไส้กึ่งอุตสาหกรรม

จากการเก็บตัวอย่างกึ่งอุตสาหกรรมจากฟาร์มเลี้ยงกึ่งอุตสาหกรรม จังหวัดฉะเชิงเทรา จำนวน 3 ครั้ง นำมานับจำนวนแบคทีเรียที่สามารถสร้างสปอร์ได้ในลำไส้กึ่งอุตสาหกรรม โดยวิธีการ spread plate พบว่าปริมาณแบคทีเรียที่พบทั้งหมดในลำไส้มีค่าเฉลี่ย $1,913.67 \pm 179.82$, $3,611 \pm 888.62$ และ $3,372.33 \pm 566.2$ CFU/ตัว ตามลำดับ จำนวนแบคทีเรียหลังจาก heat shock ซึ่งเป็นปริมาณแบคทีเรียที่อยู่ในรูปสปอร์ในลำไส้ มีค่าเฉลี่ย 152 ± 76.129 , 575 ± 172.020 และ 413 ± 244.758 CFU/ตัว ตามลำดับ ดังตารางที่ 15

ตารางที่ 15 ผลการนับจำนวนแบคทีเรียในลำไส้กึ่งอุตสาหกรรมก่อนและหลังทำการ heat shock

| ครั้งที่เก็บตัวอย่าง | จำนวนตัวอย่าง กึ่งอุตสาหกรรม (ตัว) | จำนวนแบคทีเรีย ก่อน heat shock (CFU/ ตัว) | จำนวนแบคทีเรีย หลังจาก heat shock (CFU/ ตัว) |
|----------------------|--|---|--|
| 1 | 20 | $1,913.67 \pm 179.82$ | 152 ± 76.129 |
| 2 | 114 | $3,611 \pm 888.62$ | 575 ± 172.020 |
| 3 | 101 | $3,372.33 \pm 566.2$ | 413 ± 244.758 |

3.1.2 ผลการแยกชนิดของแบคทีเรียสกุล *Bacillus* จากลำไส้กึ่งอุตสาหกรรม

จากการนำแบคทีเรียในกลุ่มที่สามารถสร้างสปอร์ได้จากลำไส้กึ่งอุตสาหกรรม ในข้อ 3.1.1 มาแยกชนิด โดยเลือกโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกันมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ให้ได้โคโลนีเดี่ยว แล้วนำโคโลนีดังกล่าวเข้าห้องปฏิบัติการ พบว่าแบคทีเรียทั้งหมดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก คัดเลือกแบคทีเรียทั้งหมดจำนวน 20 isolates ซึ่งสามารถสร้างเอนไซม์ catalase ได้ นำโคโลนีดังกล่าวเลี้ยงในอาหาร NA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำโคโลนีเดี่ยวไปจำแนกชนิดเพื่อแยกเฉพาะเชื้อ *Bacillus* ไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป ซึ่งการจำแนกชนิดของเชื้อ *Bacillus* นั้นจะใช้เครื่อง VITEK 32 (*Bacillus* identification card) เพื่อคัดเลือกเฉพาะแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* พบว่ามีจำนวน 6

isolates โดยมีเพียง 3 isolates เท่านั้นที่สามารถยืนยันผลการแยกชนิดว่าเป็น *B. pumilus* WP1, *B. sphaericus* WP2 และ *B. subtilis* WP3 ที่ความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 16) ส่วนอีก 3 isolates แสดงความเป็นไปได้ที่จะเป็น *B. sphaericus* 1 isolate และ *B. subtilis* 2 isolates โดยไม่แสดงความเชื่อมั่น นำเชื้อ *Bacillus* ทั้ง 3 ชนิด ยืนยันชนิดอีกครั้งด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป API50CHB และ API20E (bioMérieux®) ซึ่งผลการแยกชนิดตรงกับชนิดของ *Bacillus* ที่แยกโดยใช้เครื่อง VITEK 32 แสดงผลการทดสอบในตารางที่ 17 และตารางที่ 18 ตามลำดับ เมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดมาศึกษารูปร่างของสปอร์ และทำการทดสอบทางชีวเคมีโดยวิธีดั้งเดิม ตามวิธีการของ Berkeley *et al.* (1984) เฉพาะการทดสอบสำคัญในการจำแนกชนิด ได้แก่ การทดสอบการสร้างเอนไซม์ catalase Voges-Proskauer test การใช้น้ำตาล ดี-กลูโคส (D-glucose) แอล-อะราบินโนส (L-arabinose) ดี-ไซโลส (D-xylose) ดี-แมนนิทอล (D-mannitol) ดี-แลกโตส (D-lactose) ปฏิกิริยา hydrolysis ของแป้ง ปฏิกิริยาในเตรทเปลี่ยนไปเป็นไนไตรท์ ผลการทดสอบแสดงในตารางที่ 19 ซึ่งยืนยันว่าเป็นชนิดเดียวกับผลข้างต้น

ตารางที่ 16 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียสกุล *Bacillus* 3 ชนิดที่แยกได้จากลำไส้กุ้งกุลาดำ โดยเครื่อง VITEK 32

| | Test | WP1 | WP2 | WP3 |
|----|------------------|-----|-----|-----|
| 1 | Negative control | - | - | - |
| 2 | Sucrose | + | - | + |
| 3 | Tetrazolium red | - | - | + |
| 4 | Tagatose | + | - | - |
| 5 | Glucose | + | - | + |
| 6 | Inositol | - | - | + |
| 7 | Galactose | - | - | - |
| 8 | Arabinose | - | - | + |
| 9 | Xylose | - | - | + |
| 10 | Mannitol | + | - | + |
| 11 | Raffinose | - | - | + |
| 12 | Salicin | + | - | + |
| 13 | Amygdalin | - | - | + |
| 14 | Inulin | - | - | + |
| 15 | Ribose | - | - | - |
| 16 | Maltose | - | - | + |
| 17 | Trehalose | - | - | + |

ตารางที่ 16 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียสกุล *Bacillus* 3 ชนิดที่แยกได้จากลำไส้กิ้งกูดดำ โดยเครื่อง VITEK 32 (ต่อ)

| | Test | WP1 | WP2 | WP3 |
|----|------------------------|-----|-----|-----|
| 18 | Palatinose | - | - | + |
| 19 | Sorbitol | - | - | + |
| 20 | N-acetyl-D-glucosamine | - | - | + |
| 21 | Amylopectin | - | - | + |
| 22 | Potassium thiocyanate | + | - | + |
| 23 | 7% Sodium Chloride | + | - | + |
| 24 | Mandelic acid | + | - | + |
| 25 | Oleandomycin | - | - | - |
| 26 | Sodium acetate | + | + | + |
| 27 | Arabitol | - | - | - |
| 28 | Polyamidoxygrostreptin | + | - | + |
| 29 | Nalidixic acid | - | - | - |
| 30 | Esculin | + | + | + |

ตารางที่ 17 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียสกุล *Bacillus* 3 ชนิดที่แยกได้จากลำไส้กิ้งกูดดำ โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป API50CHB

| | Test | WP1 | WP2 | WP3 |
|----|--------------------------|-----|-----|-----|
| 1 | Negative | - | - | - |
| 2 | Glycerol | + | - | + |
| 3 | Erythritol | - | - | - |
| 4 | D-arabinose | - | - | - |
| 5 | L-arabinose | + | - | + |
| 6 | D-ribose | + | - | + |
| 7 | D-xylose | + | - | + |
| 8 | L-xylose | - | - | - |
| 9 | D-adonitol | - | - | - |
| 10 | Methyl-BD-xylopyranoside | - | - | - |
| 11 | D-galactose | + | - | - |
| 12 | D-glucose | + | - | + |
| 13 | D-fructose | + | - | + |
| 14 | D-mannose | + | - | + |

ตารางที่ 17 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียสกุล *Bacillus* 3 ชนิดที่แยกได้จากลำไส้กุ้งกุลาดำ โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป API50CHB (ต่อ)

| | Test | WP1 | WP2 | WP3 |
|----|---------------------------|-----|-----|-----|
| 15 | L-sorbose | - | - | - |
| 16 | L-Rhamnose | - | - | - |
| 17 | Dulcitol | - | - | - |
| 18 | Inositol | - | - | - |
| 19 | D-mannitol | + | - | + |
| 20 | D-sorbitol | - | - | + |
| 21 | Methyl-D-Mannopyranoside | - | - | - |
| 22 | Methyl-D-Glucopyranoside | - | - | + |
| 23 | N-AcetylGlucosamine | + | - | - |
| 24 | Amygdalin | - | - | - |
| 25 | Arbutin | + | - | + |
| 26 | Esculin ferric citrate | + | - | + |
| 27 | Salicin | + | - | + |
| 28 | D-celiobiose | + | - | + |
| 29 | D-Maltose | - | - | + |
| 30 | D-Lactose (bovine origin) | - | - | - |
| 31 | D-melibiose | - | - | + |
| 32 | D-saccharose (sucrose) | + | - | + |
| 33 | D-Trehalose | + | - | + |
| 34 | Inulin | - | - | + |
| 35 | D-Melezitose | - | - | - |
| 36 | D-Raffinose | - | - | + |
| 37 | Amidon (Starch) | - | - | + |
| 38 | Glycogen | - | - | + |
| 39 | Xylitol | - | - | - |
| 40 | Gentiobiose | + | - | + |
| 41 | D-Turanose | - | - | - |
| 42 | D-Lyxose | - | - | - |
| 43 | D-Tagatose | + | - | - |
| 44 | D-fucose | - | - | - |
| 45 | L-fucose | - | - | - |
| 46 | D-arabitol | - | - | - |
| 47 | L-arabitol | - | - | - |

ตารางที่ 17 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียสกุล *Bacillus* 3 ชนิดที่แยกได้จากลำไส้กึ่งกลาดำ โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป API50CHB (ต่อ)

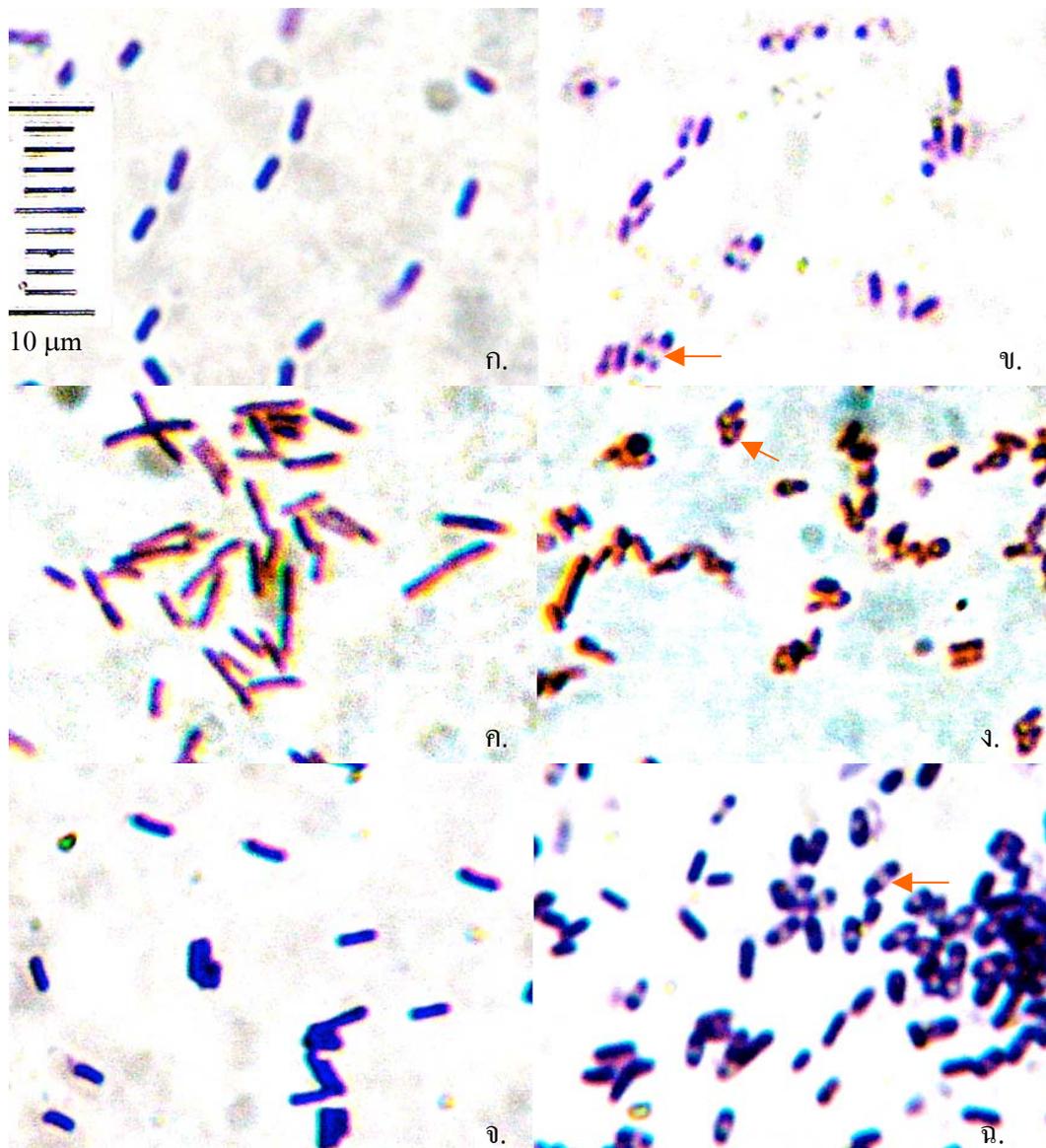
| | Test | WP1 | WP2 | WP3 |
|----|---------------------------|-----|-----|-----|
| 48 | Potassium Gluconate | - | - | - |
| 49 | Potassium 2-Ketogluconate | - | - | - |
| 50 | Potassium 5-ketogluconate | - | - | - |

ตารางที่ 18 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียสกุล *Bacillus* 3 ชนิดที่แยกได้จากลำไส้กึ่งกลาดำ โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป API20E

| | Test | WP1 | WP2 | WP3 |
|----|--------------------------------------|-----|-----|-----|
| 1 | 2-nitrophenyl-D- | + | - | + |
| 2 | L-arginine | - | - | - |
| 3 | L-lysine | - | - | - |
| 4 | L-ornithine | - | - | - |
| 5 | Trisodium citrate | - | - | - |
| 6 | Sodium thiosulfate | - | - | - |
| 7 | Urea | - | - | - |
| 8 | L-tryptophane | - | - | - |
| 9 | Indole production | - | - | - |
| 10 | Sodium pyruvate | + | - | + |
| 11 | Gelatin | + | + | + |
| 12 | Potassium nitrate (NO ₃) | - | - | - |

ตารางที่ 19 ผลการทดสอบคุณสมบัติบางประการของแบคทีเรียสกุล *Bacillus* 3 ชนิดที่แยกได้จาก
 ถ้ำไต้กึ่งภูเกล้า เปรียบเทียบกับคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *Bacillus* ตาม
 Priest (1989)

| | Test | WP1 | <i>B. pumilus</i> | WP2 | <i>B. sphaericus</i> | WP3 | <i>B. subtilis</i> |
|---|----------------------------|------|-------------------|------|----------------------|------|--------------------|
| 1 | Gram (24 hours) | + | + | + | + | + | + |
| 2 | Catalase | + | + | + | + | + | + |
| 3 | Size (24 hours) | - | - | - | - | - | - |
| | กว้าง (ไมครอน) | 0.7 | 0.6-0.7 | 0.63 | 0.6-1.0 | 0.79 | 0.7-0.8 |
| | ยาว (ไมครอน) | 2 | 2-3 | 2.57 | 1.5-5 | 2.5 | 2-3 |
| 4 | Spores round | - | - | + | + | - | - |
| | Central หรือ paracentral | + | + | - | - | + | + |
| | Terminal หรือ subterminal | - | - | + | + | - | - |
| 5 | Voges-proskauer test | + | + | - | - | + | + |
| 6 | pH in VP broth | 5.21 | 4.8-5.5 | 7.88 | 7.4-8.6 | 4.97 | 5.4-8.0 |
| | < 6 | + | + | - | - | + | + |
| | > 7 | - | - | + | + | - | - |
| 7 | Acid from | | | | | | |
| | D-glucose | + | + | - | - | + | + |
| | L-arabinose | + | + | - | - | + | + |
| | D-xylose | + | + | - | - | + | + |
| | D-mannitol | + | + | - | - | + | + |
| 8 | Hydrolysis of starch | - | - | - | - | + | + |
| 9 | Nitrate reduced to nitrite | - | - | - | - | + | + |



ภาพที่ 15 เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ทั้ง 3 ชนิด

ก. *Bacillus* WP1 vegetative cell

ข. *Bacillus* WP1 spore

ค. *Bacillus* WP2 vegetative cell

ง. *Bacillus* WP2 spore

จ. *Bacillus* WP3 vegetative cell

ฉ. *Bacillus* WP3 spore

3.2 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของเชื้อ *Bacillus* ทั้ง 3 ชนิด

การทดสอบการสร้างสารในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *V. harveyi* โดยวิธี double layer agar พบว่าเชื้อ *Bacillus* ทั้ง 3 ชนิด ไม่สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวได้

3.3 การทดสอบความสามารถในการแข่งขันการใช้สารอาหารในการเจริญร่วมกันของเชื้อ โพรไบโอติกและเชื้อก่อโรค (Broth co-culture assay)

การเจริญเติบโตของเชื้อ *V. harveyi* พบว่ามีการเจริญสูงสุดที่ 24 ชั่วโมง โดยมีการเพิ่มจำนวนเชื้อจาก 6.53×10^3 CFU/มิลลิลิตร เป็น 2.11×10^7 CFU/มิลลิลิตร และเริ่มลดลง ส่วนเชื้อ *Bacillus* ทั้ง 3 ชนิดมีการเจริญสูงสุดที่ระยะเวลา 48-72 ชั่วโมง และเมื่อเวลาผ่านไป 120 ชั่วโมง ปริมาณของเชื้อจะลดลงเล็กน้อย (ตารางที่ 20) แต่เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *V. harveyi* ร่วมกับเชื้อ *Bacillus* WP1, *Bacillus* WP2 และ *Bacillus* WP3 ซึ่งใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากันคือประมาณ 10^3 CFU/มิลลิลิตร พบว่าเชื้อ *V. harveyi* มีการเจริญลดลงภายใน 24 ชั่วโมงแรก โดยนับปริมาณเชื้อได้เฉลี่ย 1.39×10^5 , 9.47×10^4 และ 1.16×10^5 CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 20) และเมื่อเวลาผ่านไป 120 ชั่วโมง เชื้อ *Bacillus* WP1, *Bacillus* WP2 และ *Bacillus* WP3 ทำให้เชื้อ *V. harveyi* เจริญลดลงจาก 7.37×10^5 CFU/มิลลิลิตร เป็น 1.14×10^3 , 1.06×10^3 และ 1.38×10^3 CFU/มิลลิลิตร หรือลดลง 47.90, 48.41 และ 46.47 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ตามลำดับ โดยปริมาณเชื้อ *V. harveyi* ที่ลดลงโดยเชื้อ *Bacillus* ทั้ง 3 ชนิดนั้น ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) แต่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 21) ในขณะที่ปริมาณเชื้อ *Bacillus* ทั้ง 3 ชนิด เมื่อทำการเลี้ยงร่วมกับ *V. harveyi* ปริมาณของเชื้อไม่เปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 22)

ตารางที่ 20 ปริมาณของเชื้อ *Bacillus* WP1, *Bacillus* WP2, *Bacillus* WP3 และ *Vibrio harveyi* เมื่อเลี้ยงเดี่ยว และเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* แต่ละชนิดร่วมกับ *V. harveyi* (CFU/มิลลิลิตร)

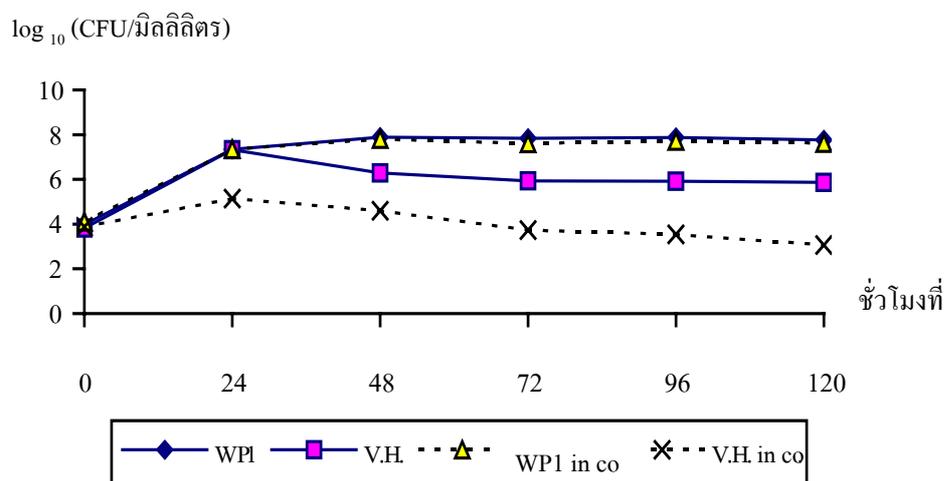
| เวลา (ชั่วโมง) | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 120 |
|--|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| ชนิดของแบคทีเรีย | | | | | | |
| <i>Bacillus</i> WP1 | 9.06×10^3 | 2.20×10^7 | 7.77×10^7 | 6.77×10^7 | 7.50×10^7 | 5.90×10^7 |
| <i>Bacillus</i> WP2 | 1.10×10^4 | 3.07×10^7 | 6.60×10^7 | 7.40×10^7 | 6.43×10^7 | 4.77×10^7 |
| <i>Bacillus</i> WP3 | 1.05×10^4 | 2.95×10^7 | 7.97×10^7 | 5.77×10^7 | 7.20×10^7 | 4.47×10^7 |
| <i>V. harveyi</i> | 6.53×10^3 | 2.11×10^7 | 1.92×10^6 | 8.67×10^5 | 8.33×10^5 | 7.37×10^5 |
| <i>Bacillus</i> WP1 in co-culture | 1.29×10^4 | 2.22×10^7 | 6.20×10^7 | 4.07×10^7 | 5.17×10^7 | 4.13×10^7 |
| <i>Bacillus</i> WP2 in co-culture | 1.37×10^4 | 1.65×10^7 | 4.20×10^7 | 3.37×10^7 | 5.90×10^7 | 4.23×10^7 |
| <i>Bacillus</i> WP3 in co-culture | 9.57×10^3 | 2.03×10^7 | 7.13×10^7 | 5.80×10^7 | 3.29×10^7 | 6.07×10^7 |
| <i>V. harveyi</i> in co-culture with <i>Bacillus</i> WP1 | 7.50×10^3 | 1.39×10^5 | 3.93×10^4 | 5.37×10^3 | 3.47×10^3 | 1.14×10^3 |
| <i>V. harveyi</i> in co-culture with <i>Bacillus</i> WP2 | 7.60×10^3 | 9.47×10^4 | 2.33×10^4 | 5.93×10^3 | 4.23×10^3 | 1.06×10^3 |
| <i>V. harveyi</i> in co-culture with <i>Bacillus</i> WP3 | 8.13×10^3 | 1.16×10^5 | 2.10×10^4 | 6.40×10^3 | 3.80×10^3 | 1.38×10^3 |

ตารางที่ 21 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อ *Bacillus* WP1, *Bacillus* WP2, *Bacillus* WP3 ที่ลดลง เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* แต่ละชนิดร่วมกับ *Vibrio harveyi* เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

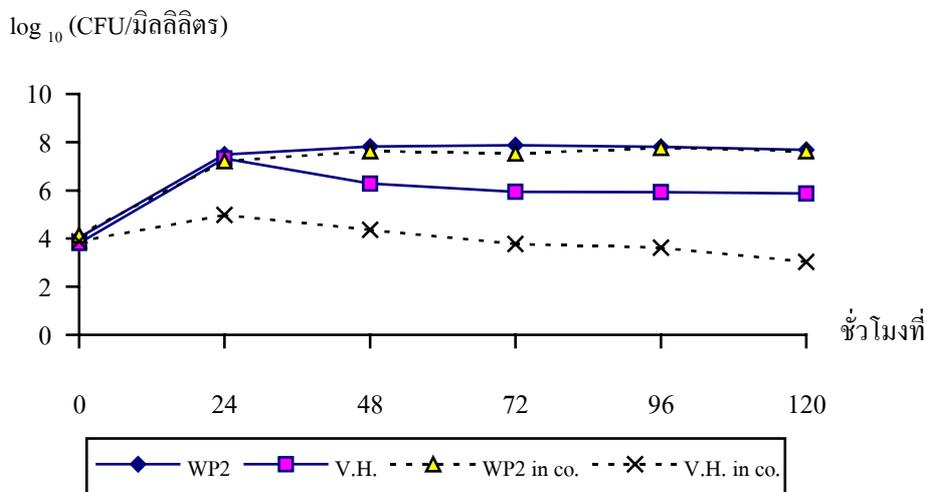
| เวลา (ชั่วโมง) | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 120 |
|---------------------|-------|-------|------|-------|------|-------|
| ชนิดของแบคทีเรีย | | | | | | |
| <i>Bacillus</i> WP1 | -3.22 | -0.04 | 1.24 | 2.82 | 2.06 | 1.99 |
| <i>Bacillus</i> WP2 | -2.35 | 3.61 | 2.51 | 4.35 | 0.48 | 0.67 |
| <i>Bacillus</i> WP3 | 1.04 | 2.17 | 0.61 | -0.03 | 4.33 | -1.74 |

ตารางที่ 22 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อ *Vibrio harveyi* ที่ลดลง เมื่อเลี้ยงร่วมกับ *Bacillus* WP1, *Bacillus* WP2 และ *Bacillus* WP3 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

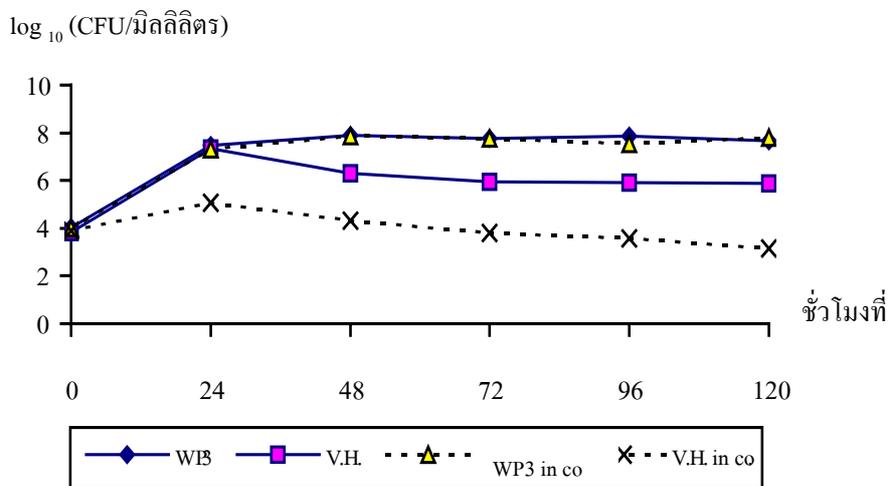
| เวลา (ชั่วโมง) ชนิดของแบคทีเรีย | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 120 |
|------------------------------------|-------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Control | 0 ^a | 0 ^a | 0 ^a | 0 ^a | 0 ^a | 0 ^a |
| <i>Bacillus</i> WP1 | 1.57 ^a | -29.77 ^b | -26.86 ^b | -37.19 ^b | -40.21 ^b | -47.90 ^b |
| <i>Bacillus</i> WP2 | 1.72 ^a | -32.06 ^b | -30.47 ^b | -36.45 ^b | -38.75 ^b | -48.41 ^b |
| <i>Bacillus</i> WP3 | 2.49 ^a | -30.84 ^b | -31.20 ^b | -35.90 ^b | -39.54 ^b | -46.47 ^b |



ภาพที่ 16 ปริมาณเชื้อ *Bacillus* WP1 และ *Vibrio harveyi* (CFU/มิลลิลิตร) ที่ระยะเวลา 0, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง



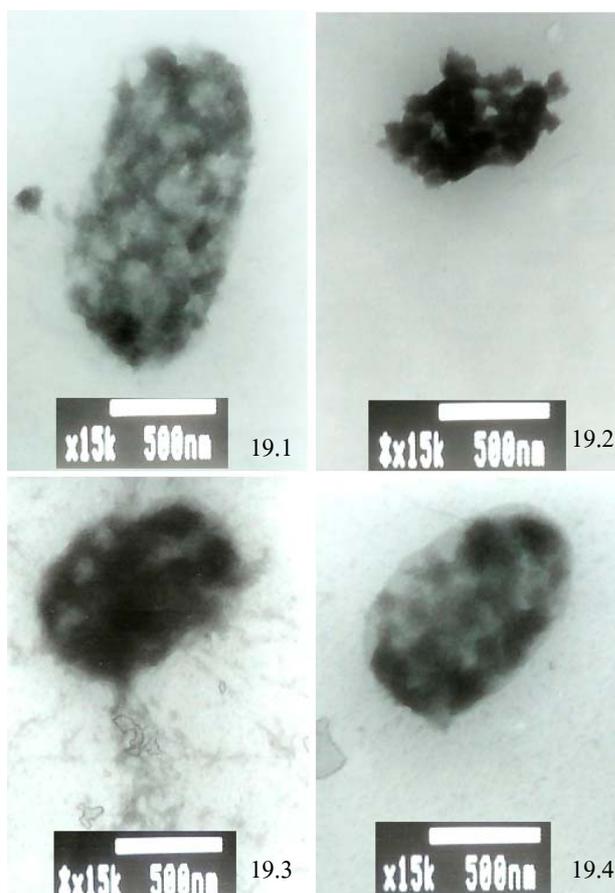
ภาพที่ 17 ปริมาณเชื้อ *Bacillus* WP2 และ *Vibrio harveyi* (CFU/มิลลิลิตร) ที่ระยะเวลา 0, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง



ภาพที่ 18 ปริมาณเชื้อ *Bacillus* WP3 และ *Vibrio harveyi* (CFU/มิลลิลิตร) ที่ระยะเวลา 0, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง

3.4 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เชื้อแบคทีเรียก่อโรคเมื่อเจริญร่วมกับเชื้อโพรไบโอติก

การศึกษาความผิดปกติของเชื้อ *V. harveyi* เมื่อเจริญร่วมกับเชื้อแบคทีเรียสกุล *Bacillus* spp. ทั้ง 3 ชนิด โดยวิธี cross streak method ด้วยกล้อง TEM (Transmission Electron Microscope) เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเชืวดังกล่าวพบว่าที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง เชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปโดยมีการหดสั้นกว่าเซลล์ปกติ ในทุกกลุ่มการทดลอง (ภาพที่ 19)



ภาพที่ 19 ภาพจากกล้อง Transmission Electron Microscope แสดงลักษณะเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ที่ถูกยับยั้งโดยเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* ทั้ง 3 ชนิด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (19.1 *V. harveyi* ปกติ 19.2 *V. harveyi* ถูกยับยั้งโดย *Bacillus* WP1 19.3 *V. harveyi* ถูกยับยั้งโดย *Bacillus* WP2 19.4 *V. harveyi* ถูกยับยั้งโดย *Bacillus* WP3)

3.5 ผลการทดสอบการรอดชีวิตของแบคทีเรียในผงสปอร์

จากการนำเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด มาเลี้ยงในอาหาร NB เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และนำไปเข้าเครื่อง centrifuge ที่ 4,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำตะกอนที่ได้ผสมกับ clay ในอัตราส่วนแบคทีเรีย 1 ส่วน : clay 2 ส่วน ทำให้แห้ง นำแบคทีเรียที่ได้นับจำนวนเซลล์เพื่อตรวจสอบการรอดชีวิตโดยสุ่มตัวอย่างแบคทีเรียแต่ละชนิดที่ผสมกับ clay เมื่อ 0, 1, 2, 3, 6, 12 เดือน พบว่าจำนวนเซลล์ของแบคทีเรีย 3 ชนิด ทั้งเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสม ในเดือนที่ 1 ถึงเดือนที่ 3 มีค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 23 และภาพที่ 19 แต่เมื่อเวลาผ่านไป 6 เดือน จำนวนเซลล์ของแบคทีเรียในผงสปอร์มีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับจำนวนเริ่มต้น โดยปริมาณของเชื้อแบคทีเรียจะลดลง 32.77-38.01 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 6 เดือน และลดลง 46.19-56.05 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 12 เดือน

ตารางที่ 23 จำนวนเซลล์ของแบคทีเรียทั้งเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสม 7 ชนิดเฉลี่ย (CFU/กรัม)

หลังจากผสมกับ clay เป็นระยะเวลา 0, 1, 2, 3, 6 และ 12 เดือน

| ชนิดที่ เวลา (เดือน) | จำนวนเซลล์เฉลี่ย ($\times 10^{10}$ CFU/กรัม) | | | | | | |
|----------------------------|---|-----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 0 | 81.33±18.15 ^a | 115.33±46.6 ^a | 25.67±12.1 ^{ab} | 38.33±26.08 ^a | 66.33±29.14 ^a | 60.33±32.52 ^a | 79.33±5.51 ^a |
| 1 | 93.33±31.01 ^a | 120.3±66.38 ^a | 40±26.06 ^a | 51.67±31.01 ^a | 59.67±30.35 ^a | 61±30.12 ^a | 54±16.37 ^{ab} |
| 2 | 97.67±60.01 ^a | 118±79 ^a | 17.33±1.53 ^{ab} | 17±17.69 ^b | 47.67±29.02 ^a | 30±6.25 ^{ab} | 58.33±24.79 ^{ab} |
| 3 | 63±14.42 ^a | 58±8.72 ^a | 10.67±2.52 ^b | 16.67±7.77 ^b | 22.67±5.13 ^a | 15.33±3.51 ^b | 32.67±15.01 ^b |
| 6 | 0.007±0.002 ^b | 0.003±0.001 ^b | 0.003±0.001 ^c | 0.004±0.004 ^c | 0.003±0.001 ^b | 0.003±0.002 ^c | 0.01±0.002 ^c |
| 12 | 0.000043 ± 0.000015 ^c | 0.00002 ± 0.00001 ^c | 0.0001 ± 0.00002 ^d | 0.0000233 ± 0.0000058 ^d | 0.00023 ± 0.00008 ^c | 0.000113 ± 0.0000493 ^d | 0.00005 ± 0.0000265 ^d |

ค่าเฉลี่ยตามด้วยอักษรเหมือนกันภายในแถวตั้งเดียวกันจะไม่แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ $P>0.05$, DMRT

*หมายเหตุ ผงสปอร์ชนิดที่ 1 คือ *Bacillus* WP1

ผงสปอร์ชนิดที่ 2 คือ *Bacillus* WP2

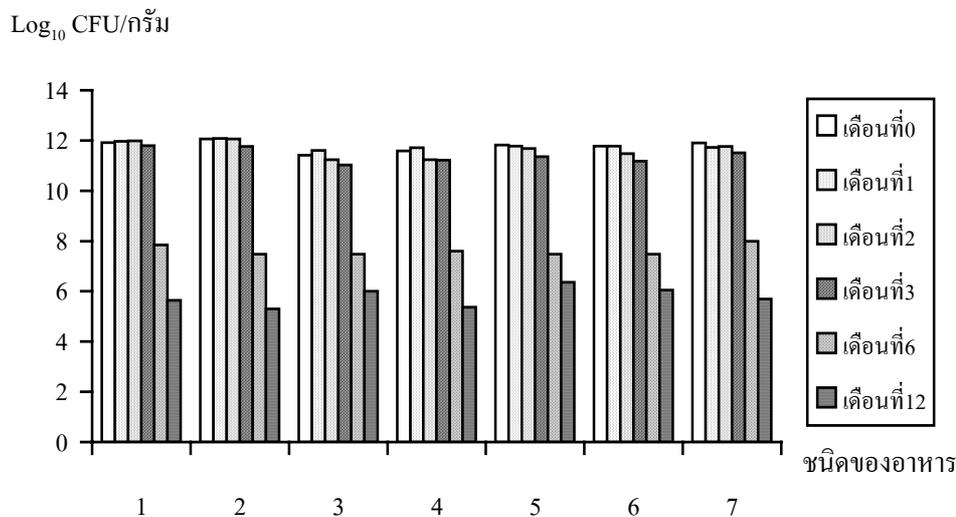
ผงสปอร์ชนิดที่ 3 คือ *Bacillus* WP3

ผงสปอร์ชนิดที่ 4 คือ *Bacillus* WP1, WP2 (1:1)

ผงสปอร์ชนิดที่ 5 คือ *Bacillus* WP1, WP3 (1:1)

ผงสปอร์ชนิดที่ 6 คือ *Bacillus* WP2, WP3 (1:1)

ผงสปอร์ชนิดที่ 7 คือ *Bacillus* WP1, WP2, WP3 (1:1:1)



ภาพที่ 20 ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์แบคทีเรีย (CFU/กรัม) ของแบคทีเรียสกุล *Bacillus* แต่ละชนิด หลังจากผสมกับ clay เป็นระยะเวลา 0, 1, 2, 3, 6 และ 12 เดือน

3.6 ผลการทดสอบในกึ่งอุตสาหกรรม

เมื่อนำผงสปอร์ของแบคทีเรียทั้ง 7 ชนิด ไปผสมอาหารในอัตราส่วน 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม นำไปเลี้ยงกึ่งอายุ 1 เดือน ในรูปของเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสม 7 ชนิด ได้แก่

อาหารชนิดที่ 1 คือ *Bacillus* WP1

อาหารชนิดที่ 2 คือ *Bacillus* WP2

อาหารชนิดที่ 3 คือ *Bacillus* WP3

อาหารชนิดที่ 4 คือ *Bacillus* WP1, WP2

อาหารชนิดที่ 5 คือ *Bacillus* WP1, WP3

อาหารชนิดที่ 6 คือ *Bacillus* WP2, WP3

อาหารชนิดที่ 7 คือ *Bacillus* WP1, WP2 และ WP3

เป็นระยะเวลา 1 เดือน แล้วมีการประเมินประสิทธิภาพของการใช้ อาหารแต่ละชนิด ได้ผลดังนี้

3.6.1 ผลของการใช้อาหารผสมแบคทีเรียทั้ง 7 ชนิด ต่ออัตราการเจริญเติบโตของกึ่ง กุลาดำ

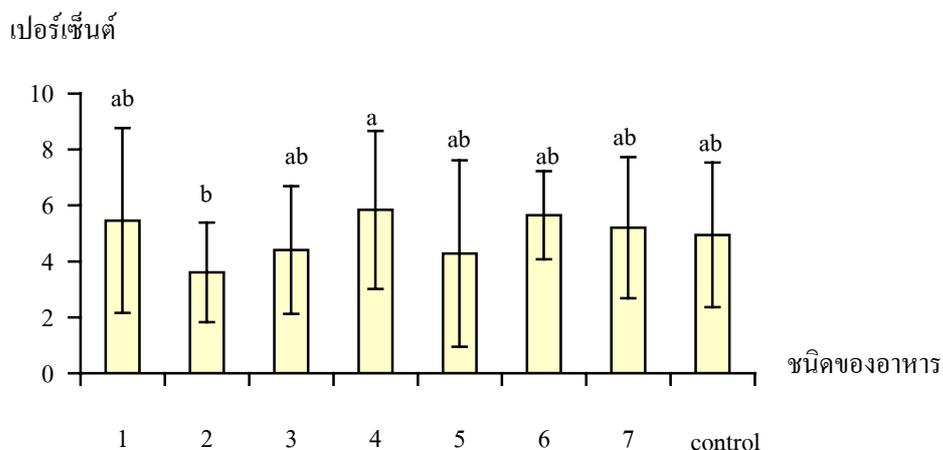
3.6.1.1 ผลของการใช้อาหารผสมแบคทีเรียทั้ง 7 ชนิด ต่ออัตราการเจริญเติบโต (น้ำหนัก) ของกึ่งกุลาดำ

หลังจากทำการเลี้ยงกึ่งกุลาดำเป็นระยะเวลา 1 เดือน ทำการชั่งน้ำหนัก กึ่งกุลาดำ พบว่า กึ่งกลุ่มที่ได้รับอาหารชนิดที่ 4 คือ *Bacillus* WP1 และ WP2 มีเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของ น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นสูงสุด โดยมีค่าเฉลี่ย 5.84 ± 2.82 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จาก กลุ่มที่ได้รับอาหารชนิดที่ 2 คือ *Bacillus* WP2 ซึ่งมีน้ำหนักเพิ่มขึ้น 3.6 ± 1.78 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มที่ได้รับอาหารชนิดที่ 1 *Bacillus* WP1, อาหารชนิดที่ 3 *Bacillus* WP3, อาหารชนิดที่ 5 คือ *Bacillus* WP1 และ WP3, อาหารชนิดที่ 6 คือ *Bacillus* WP2 และ WP3, อาหารชนิดที่ 7 คือ *Bacillus* WP1, WP2 และ WP3 และกลุ่มควบคุม ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์เฉลี่ย ของน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นเท่ากับ 5.46 ± 3.3 , 4.4 ± 2.29 , 4.28 ± 3.33 , 5.65 ± 1.57 , 5.2 ± 2.52 และ 4.95 ± 2.58 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 24 และ ภาพที่ 21

ตารางที่ 24 เปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของกึ่งกุลาดำเมื่อได้รับอาหารผสมแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ทั้ง 7 ชนิด เป็นระยะเวลา 1 เดือน

| อาหารชนิดที่ | เปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น |
|--------------|---|
| กลุ่มควบคุม | 4.95 ± 2.58^{ab} |
| 1 | 5.46 ± 3.3^{ab} |
| 2 | 3.6 ± 1.78^b |
| 3 | 4.4 ± 2.29^{ab} |
| 4 | 5.84 ± 2.82^a |
| 5 | 4.28 ± 3.33^{ab} |
| 6 | 5.65 ± 1.57^{ab} |
| 7 | 5.2 ± 2.52^{ab} |

ค่าเฉลี่ยตามด้วยอักษรเหมือนกันภายในแถวตั้งเดียวกันจะไม่แตกต่างกันทางสถิติ อย่างมีนัยสำคัญ $p > 0.05$, DMRT



ภาพที่ 21 เปอร์เซนต์เฉลี่ยของน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของกึ่งกลาดำเมื่อได้รับอาหารผสมแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ทั้ง 7 ชนิด เป็นระยะเวลา 1 เดือน

3.6.1.2 ผลของการใช้อาหารผสมแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ทั้ง 7 ชนิด ต่ออัตราการเจริญเติบโต (ความยาว) ของกึ่งกลาดำ

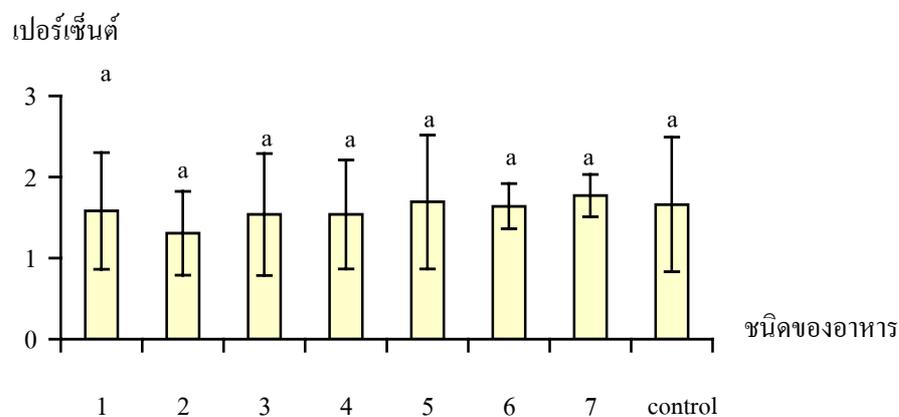
หลังจากทำการเลี้ยงกึ่งกลาดำเป็นระยะเวลา 1 เดือน ทำการวัดความยาว พบว่ากึ่งกลาดำทุกชุดการทดลองได้แก่ กลุ่มที่ได้รับอาหารชนิดที่ 1 *Bacillus* WP1, อาหารชนิดที่ 2 *Bacillus* WP2, อาหารชนิดที่ 3 *Bacillus* WP3, อาหารชนิดที่ 4 คือ *Bacillus* WP1 และ WP2, อาหารชนิดที่ 5 คือ *Bacillus* WP1 และ WP3, อาหารชนิดที่ 6 คือ *Bacillus* WP2 และ WP3, อาหารชนิดที่ 7 คือ *Bacillus* WP1, WP2 และ WP3 และกลุ่มควบคุม มีเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของความยาวที่เพิ่มขึ้นไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ทุกกลุ่มการทดลอง โดยมีค่า 1.58 ± 0.72 , 1.31 ± 0.52 , 1.54 ± 0.75 , 1.54 ± 0.67 , 1.69 ± 0.83 , 1.64 ± 0.28 , 1.77 ± 0.26 และ 1.66 ± 0.83 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 25 และภาพที่ 22

ตารางที่ 25 เปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของความยาวที่เพิ่มขึ้นของกึ่งกลาดำเมื่อได้รับอาหารผสมแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ทั้ง 7 ชนิด เป็นระยะเวลา 1 เดือน

| อาหารชนิดที่ | เปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของความยาวที่เพิ่มขึ้น |
|--------------|---|
| กลุ่มควบคุม | 1.66 ± 0.83^a |
| 1 | 1.58 ± 0.72^a |
| 2 | 1.31 ± 0.52^a |
| 3 | 1.54 ± 0.75^a |
| 4 | 1.54 ± 0.67^a |
| 5 | 1.69 ± 0.83^a |
| 6 | 1.64 ± 0.28^a |
| 7 | 1.77 ± 0.26^a |

ค่าเฉลี่ยตามด้วยอักษรเหมือนกันภายในแถวตั้งเดียวกันจะไม่แตกต่างกันทางสถิติ

อย่างมีนัยสำคัญ $p > 0.05$, DMRT



ภาพที่ 22 เปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของความยาวที่เพิ่มขึ้นของกึ่งกลาดำเมื่อได้รับอาหารผสมแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ทั้ง 7 ชนิด เป็นระยะเวลา 1 เดือน

3.6.2 ผลของการใช้อาหารผสมแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ทั้ง 7 ชนิด ต่อระบบภูมิคุ้มกันของกึ่งกุลาคำ

หลังจากเลี้ยงกึ่งกุลาคำด้วยอาหารผสมแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ทั้ง 7 ชนิด เป็นระยะเวลา 1 เดือน ทำการเก็บเลือดกึ่ง และตรวจองค์ประกอบทางภูมิคุ้มกันต่าง ๆ ทางด้านความต้านทานโรค ได้ผลดังนี้

3.6.2.1 ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase

ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase ของกึ่งกุลาคำที่ได้รับอาหารผสมแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ชนิดที่ 4 มีปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase เฉลี่ยสูงสุดคือ 286.52 ± 29.24 หน่วย/นาที/มก.โปรตีน แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับกึ่งกุลาคำที่ได้รับอาหารชนิดที่ 6 และกลุ่มควบคุมโดยมีค่า 255.05 ± 32.6 และ 221.16 ± 48.27 หน่วย/นาที/มก.โปรตีน ตามลำดับ แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) กับกึ่งกุลาคำที่ได้รับอาหารชนิดที่ 1, 2, 3, 5 และ 7 โดยมีค่าเฉลี่ย 268.93 ± 39.72 , 266.98 ± 29.63 , 274.43 ± 46.03 , 279.48 ± 28.33 และ 256.65 ± 64.56 หน่วย/นาที/มก.โปรตีน ตามลำดับ ส่วนกึ่งกุลาคำในกลุ่มควบคุมจะมีปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase ต่ำสุดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับกึ่งกุลาคำที่ได้รับอาหารที่ผสมแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ในทุกกลุ่มการทดลอง ดังตารางที่ 26 และภาพที่ 23

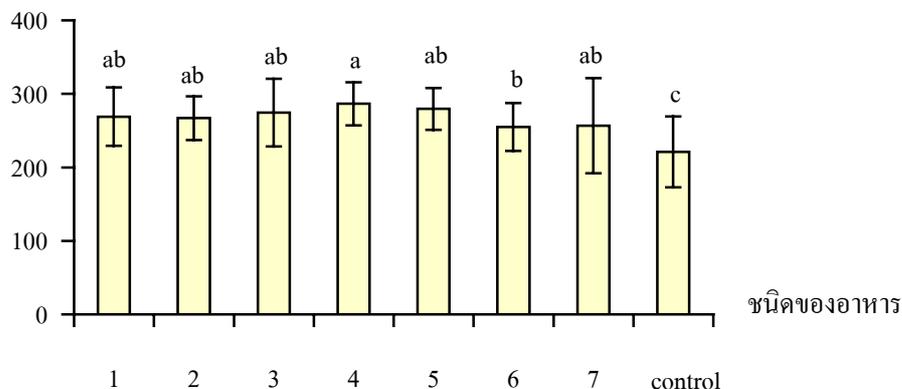
ตารางที่ 26 ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase (หน่วย/นาที/มก. โปรตีน) เฉลี่ยของกึ่งกุลาคำเมื่อได้รับอาหารผสมแบคทีเรียสกุล *Bacillus* 7 ชนิด เป็นระยะเวลา 1 เดือน

| อาหารชนิดที่ | ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase เฉลี่ย (หน่วย/นาที/มก. โปรตีน) |
|--------------|--|
| กลุ่มควบคุม | 221.16 ± 48.27^c |
| 1 | 268.93 ± 39.72^{ab} |
| 2 | 266.98 ± 29.63^{ab} |
| 3 | 274.43 ± 46.03^{ab} |
| 4 | 286.52 ± 29.24^a |
| 5 | 279.48 ± 28.33^{ab} |
| 6 | 255.05 ± 32.60^b |
| 7 | 256.65 ± 64.56^{ab} |

ค่าเฉลี่ยตามด้วยอักษรเหมือนกันภายในแถวตั้งเดียวกันจะไม่แตกต่างกันทางสถิติ

อย่างมีนัยสำคัญ $p > 0.05$, DMRT

หน่วย/นาที่/มก. โปรตีน



ภาพที่ 23 ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase เฉลี่ย (หน่วย/นาที่/มิลลิกรัมโปรตีน) ของกึ่งกุลาดำเมื่อได้รับอาหารผสมแบคทีเรียสกุล *Bacillus* 7 ชนิด เป็นระยะเวลา 1 เดือน

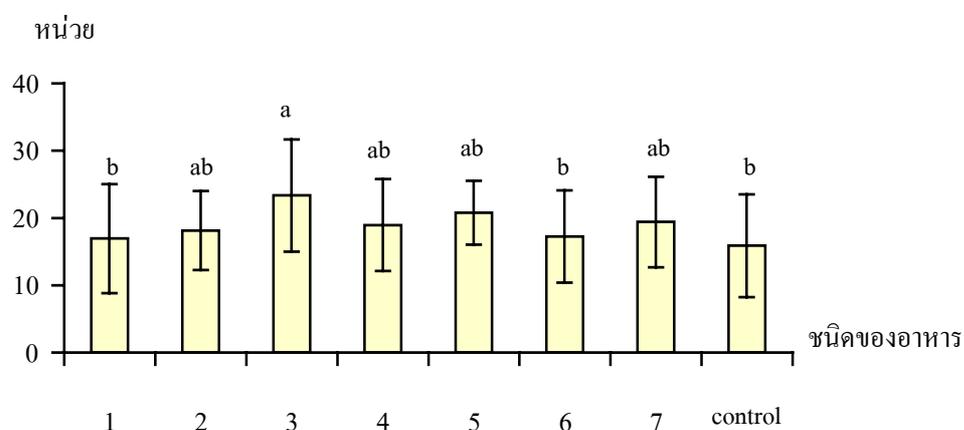
3.6.2.2 การผลิต superoxide anion

ปริมาณ superoxide anion ของกึ่งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ชนิดที่ 3 มีปริมาณ superoxide anion เฉลี่ยสูงสุด คือ 23.33 ± 8.33 หน่วย ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับกลุ่มที่ได้รับอาหารชนิดที่ 1, 6 และกลุ่มควบคุมโดยมีค่า 16.93 ± 8.08 , 17.27 ± 6.86 และ 15.87 ± 7.66 หน่วย ตามลำดับ แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกึ่งกุลาดำที่ได้รับอาหารชนิดที่ 2, 4, 5 และ 7 โดยมีค่าเฉลี่ย 18.13 ± 5.87 , 18.93 ± 6.84 , 20.8 ± 4.74 และ 19.4 ± 6.75 หน่วย ตามลำดับ ส่วนกึ่งกุลาดำในกลุ่มควบคุมจะมีปริมาณ superoxide anion ต่ำสุดแต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) กับกึ่งกุลาดำที่ได้รับอาหารที่ผสมแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ชนิดที่ 1, 2, 4, 5, 6 และ 7 ดังตารางที่ 27 และภาพที่ 24

ตารางที่ 27 ปริมาณ superoxide anion เฉลี่ย (หน่วย) ของกิ้งกูดาคำเมื่อได้รับอาหารผสม
แบคทีเรียสกุล *Bacillus* 7 ชนิด เป็นระยะเวลา 1 เดือน

| อาหารชนิดที่ | ปริมาณsuperoxide anionเฉลี่ย (หน่วย) |
|--------------|--------------------------------------|
| กลุ่มควบคุม | 15.87 ± 7.66 ^b |
| 1 | 16.93 ± 8.08 ^b |
| 2 | 18.13 ± 5.87 ^{ab} |
| 3 | 23.33 ± 8.33 ^a |
| 4 | 18.93 ± 6.84 ^{ab} |
| 5 | 20.8 ± 4.74 ^{ab} |
| 6 | 17.27 ± 6.86 ^b |
| 7 | 19.4 ± 6.75 ^{ab} |

ค่าเฉลี่ยตามด้วยอักษรเหมือนกันภายในแถวตั้งเดียวกันจะไม่แตกต่างกันทางสถิติ
อย่างมีนัยสำคัญ $p > 0.05$, DMRT



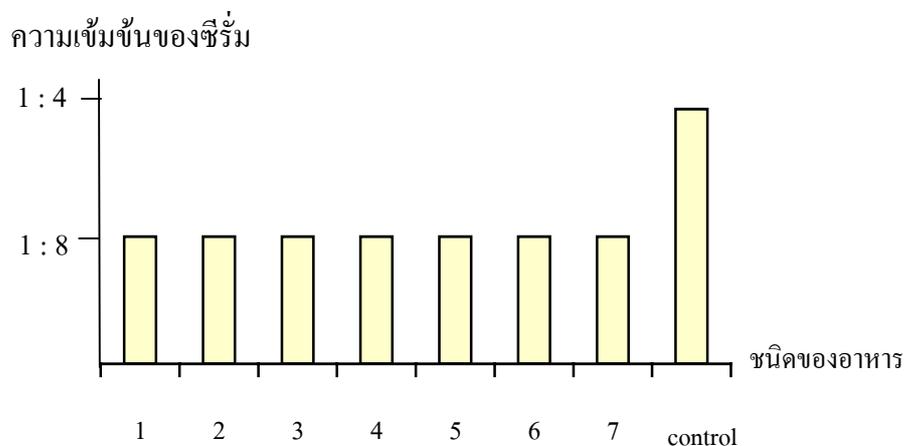
ภาพที่ 24 ปริมาณ superoxide anion เฉลี่ย (หน่วย) ของกิ้งกูดาคำเมื่อได้รับอาหารผสม
แบคทีเรียสกุล *Bacillus* 7 ชนิด เป็นระยะเวลา 1 เดือน

3.6.2.3 Bactericidal activity

ค่า bactericidal activity ของกิ้งกูดาคำกลุ่มที่ได้รับอาหารผสม
แบคทีเรียสกุล *Bacillus* ชนิดที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 มีค่าเท่ากับ 1 : 8 ซึ่งมีสูงกว่าในกลุ่มควบคุม ซึ่ง
มีค่าเท่ากับ 1:4 ดังตารางที่ 28 และ ภาพที่ 25

ตารางที่ 28 ค่า bactericidal activity ของกึ่งกลูตาต้าที่ได้รับอาหารผสมแบคทีเรียสกุล *Bacillus* 7 ชนิดเป็นระยะเวลา 1 เดือน

| อาหารชนิดที่ | ความเข้มข้นของซีรัมที่มีค่าต่ำสุด ที่ทำให้แบคทีเรียลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ |
|--------------|---|
| กลุ่มควบคุม | 1 : 4 |
| 1 | 1 : 8 |
| 2 | 1 : 8 |
| 3 | 1 : 8 |
| 4 | 1 : 8 |
| 5 | 1 : 8 |
| 6 | 1 : 8 |
| 7 | 1 : 8 |



ภาพที่ 25 ค่า bactericidal activity ของกึ่งกลูตาต้าที่ได้รับอาหารผสมแบคทีเรียสกุล *Bacillus* 7 ชนิดเป็นระยะเวลา 1 เดือน

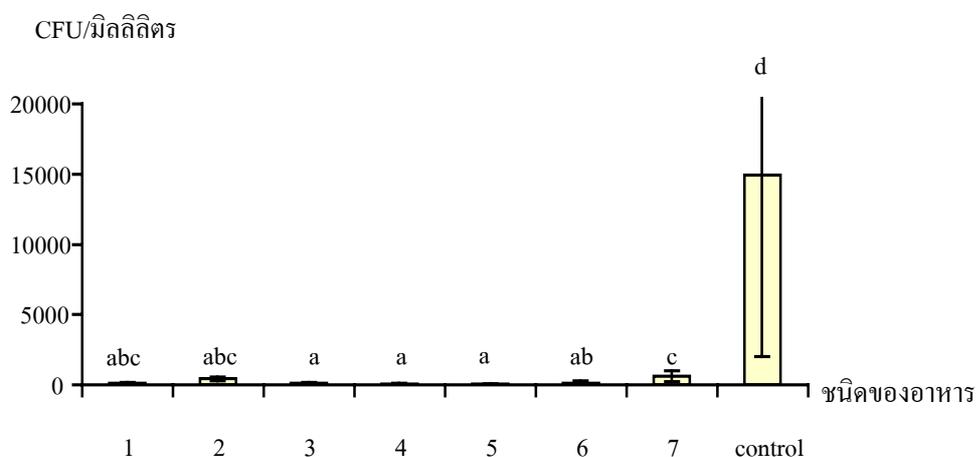
3.6.2.4 Clearance ability

ค่า clearance ability เมื่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำโดยใช้อาหารผสมแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ชนิดที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 พบว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ชนิดที่ 5 มีจำนวนเซลล์แบคทีเรีย *V. harveyi* ต่ำสุด คือ 53.33 ± 24.22 CFU/มิลลิลิตร แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) กับกุ้งกุลาดำในทุกกลุ่มทดลองที่ได้รับอาหารผสมแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ชนิดที่ 1, 2, 3, 4 และ 6 ซึ่งมีจำนวนเซลล์แบคทีเรีย *V. harveyi* เท่ากับ 116.67 ± 51.25 , 430 ± 154.27 , 106.67 ± 79.67 , 80 ± 41.95 และ 136.67 ± 161.7 CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับกุ้งกุลาดำในทุกกลุ่มทดลองที่ได้รับอาหารผสมแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ชนิดที่ 7 และกลุ่มควบคุมซึ่งมีจำนวนเซลล์แบคทีเรีย *V. harveyi* เท่ากับ 620 ± 396.79 และ $14,920 \pm 12,894.7$ CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนกุ้งกุลาดำในกลุ่มควบคุมพบว่ามีจำนวนเซลล์แบคทีเรีย *V. harveyi* สูงสุดและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับกุ้งกุลาดำในทุกกลุ่มทดลองที่ได้รับอาหารผสมแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ดังตารางที่ 29 และภาพที่ 26

ตารางที่ 29 ปริมาณแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* (CFU/มิลลิลิตร) ในเลือดกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมแบคทีเรียสกุล *Bacillus* 7 ชนิด เป็นระยะเวลา 1 เดือน หลังจากฉีดเชื้อ *V. harveyi* เข้าไปในระบบเลือดเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

| อาหารชนิดที่ | ปริมาณ <i>V. harveyi</i> เฉลี่ย (CFU/มิลลิลิตร) |
|--------------|---|
| กลุ่มควบคุม | $14,920 \pm 12,894.7^d$ |
| 1 | 116.67 ± 51.25^{abc} |
| 2 | 430 ± 154.27^{abc} |
| 3 | 106.67 ± 79.67^a |
| 4 | 80 ± 41.95^a |
| 5 | 53.33 ± 24.22^a |
| 6 | 136.67 ± 161.7^{ab} |
| 7 | 620 ± 396.79^c |

ค่าเฉลี่ยตามด้วยอักษรเหมือนกันภายในแถวตั้งเดียวกันจะไม่แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ $p > 0.05$, DMRT



ภาพที่ 26 ปริมาณแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* (CFU/มิลลิลิตร) ในเลือดกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมแบคทีเรียสกุล *Bacillus* 7 ชนิด เป็นระยะเวลา 1 เดือน หลังจากฉีดเชื้อ *V. harveyi* เข้าไปในระบบเลือดเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

3.6.3 ผลของการใช้อาหารผสมแบคทีเรียสกุล *Bacillus* 7 ชนิด ต่อจำนวนแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ในลำไส้กุ้งกุลาดำ

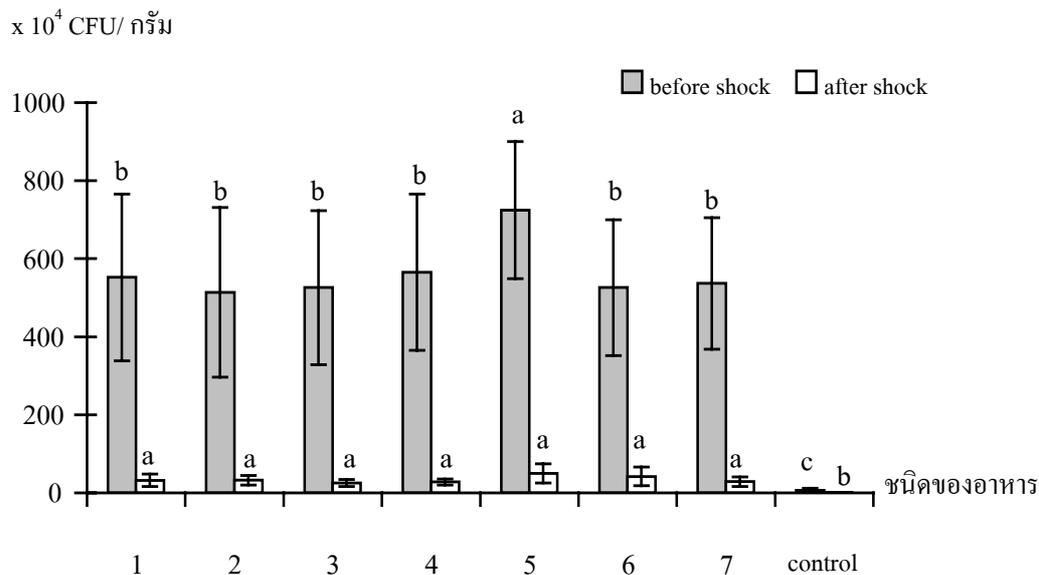
เมื่อทำการนับปริมาณของแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ในลำไส้กุ้งกุลาดำ หลังจากเลี้ยงด้วยอาหารผสมแบคทีเรียสกุล *Bacillus* 7 ชนิด เป็นระยะเวลา 1 เดือน โดยนับปริมาณก่อน heat shock และหลัง heat shock พบว่ามีจำนวนแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ในลำไส้สูงกว่ากลุ่มควบคุมในทุกกลุ่มการทดลองที่ได้รับอาหารผสมเชื้อ *Bacillus* โดยมีปริมาณที่พบแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 30 และภาพที่ 27

ตารางที่ 30 จำนวนแบคทีเรียสกุล *Bacillus* เฉลี่ย (CFU/กรัม) ในลำไส้กึ่งกลาคำก่อน heat shock, หลัง heat shock และเปอร์เซ็นต์ของ *Bacillus* ที่อยู่ในรูปสปอร์ในลำไส้หลังจากได้รับอาหารผสมแบคทีเรียสกุล *Bacillus* 7 ชนิด เป็นระยะเวลา 1 เดือน

| อาหารชนิดที่ | จำนวน <i>Bacillus</i> ก่อน heat shock (x 10 ⁴ CFU/กรัม) | จำนวน <i>Bacillus</i> หลัง heat shock (x 10 ⁴ CFU/กรัม) | เปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของ <i>Bacillus</i> ที่อยู่ในรูปสปอร์ในลำไส้ |
|--------------|--|--|---|
| กลุ่มควบคุม | 6.67 ± 5.25 ^c | 0.6 ± 0.51 ^b | 9.00 |
| 1 | 552 ± 213.45 ^b | 32 ± 16.12 ^a | 5.80 |
| 2 | 514 ± 217.25 ^b | 32.4 ± 12.1 ^a | 6.30 |
| 3 | 526 ± 197.66 ^b | 25.33 ± 9.15 ^a | 4.82 |
| 4 | 565.33 ± 200.07 ^b | 27.93 ± 7.64 ^a | 4.94 |
| 5 | 724.67 ± 176.14 ^a | 49.53 ± 24.21 ^a | 6.83 |
| 6 | 526 ± 174.06 ^b | 42 ± 23.96 ^a | 7.98 |
| 7 | 536.67 ± 168.59 ^b | 28.67 ± 12.46 ^a | 5.34 |

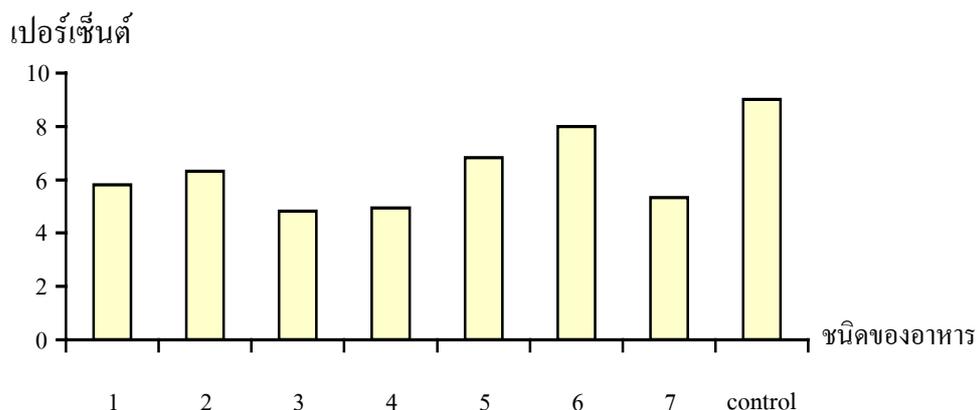
ค่าเฉลี่ยตามด้วยอักษรเหมือนกันภายในแถวตั้งเดียวกันจะไม่แตกต่างกันทางสถิติ

อย่างมีนัยสำคัญ p>0.05, DMRT



ภาพที่ 27 จำนวนแบคทีเรียสกุล *Bacillus* เณลีย (CFU/กรัม) ในลำไส้กุ้งกุลาดำหลังจากได้รับอาหารผสมแบคทีเรียสกุล *Bacillus* 7 ชนิด เป็นระยะเวลา 1 เดือน

เมื่อพิจารณาจากปริมาณของแบคทีเรีย *Bacillus* หลัง heat shock ซึ่งอยู่ในรูปของสปอร์ภายในลำไส้ เทียบกับปริมาณก่อนการ heat shock ซึ่งเป็นปริมาณของ *Bacillus* ทั้งหมด ในรูปของเซลล์ปกติและสปอร์พบว่า *Bacillus* มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 28) อยู่ในรูปของเซลล์ปกติ แสดงว่าสปอร์ของแบคทีเรีย *Bacillus* ที่ให้กุ้งกุลาดำกินเข้าไปสามารถที่จะเจริญเติบโตเป็นเซลล์ปกติภายในลำไส้กุ้งกุลาดำได้



ภาพที่ 28 เปอร์เซ็นต์ของแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ซึ่งอยู่ในรูปของสปอร์ เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ทั้งหมดในลำไส้กุ้งกุลาดำหลังจากได้รับอาหาร 7 ชนิด เป็นระยะเวลา 1 เดือน

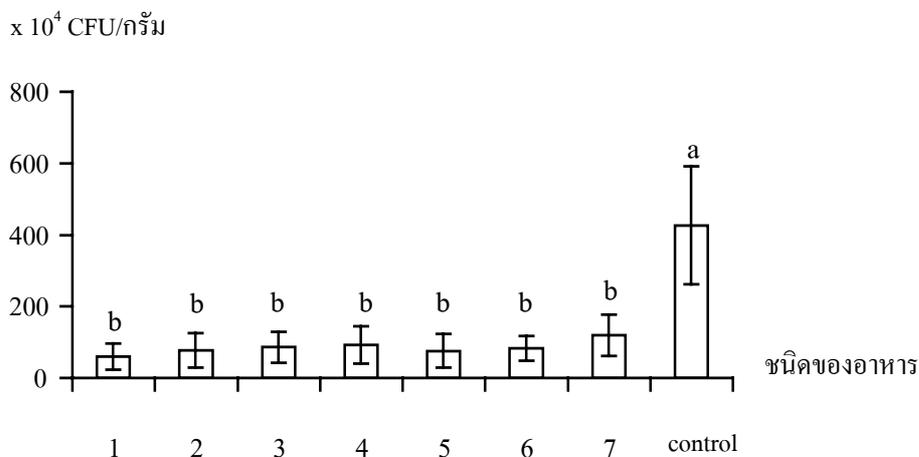
3.6.4 ผลของการใช้อาหารผสมแบคทีเรียสกุล *Bacillus* 7 ชนิด ต่อจำนวนแบคทีเรียสกุล *Vibrio* ในลำไส้กุ้งกุลาดำ

เมื่อทำการนับปริมาณของแบคทีเรียสกุล *Vibrio* ในลำไส้กุ้งกุลาดำทุกชุดการทดลอง หลังจากเลี้ยงด้วยอาหารผสมแบคทีเรียสกุล *Bacillus* เป็นระยะเวลา 1 เดือน พบว่ากุ้งกุลาดำทุกกลุ่มการทดลองที่ได้รับอาหารผสมแบคทีเรียสกุล *Bacillus* มีปริมาณของเชื้อ *Vibrio* ในลำไส้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกลุ่มควบคุม ซึ่งแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ในการไปลดจำนวนแบคทีเรียสกุล *Vibrio* ในลำไส้ โดยกุ้งกุลาดำในกลุ่มควบคุมมีปริมาณแบคทีเรียสกุล *Vibrio* เฉลี่ยในลำไส้ $426.133 \pm 164.73 \times 10^4$ CFU/กรัม ในขณะที่กุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารชนิดที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 มีปริมาณแบคทีเรียสกุล *Vibrio* เฉลี่ยเท่ากับ 59.73 ± 37 , 77.8 ± 48.03 , 85.93 ± 43.29 , 92.73 ± 51.87 , 76 ± 46.53 , 82.93 ± 35.06 และ $119.73 \pm 58.5 \times 10^4$ CFU/กรัม ตามลำดับ ดังตารางที่ 31 และภาพที่ 29

ตารางที่ 31 จำนวนแบคทีเรียสกุล *Vibrio* เฉลี่ย (CFU/กรัม) ในลำไส้กุ้งกุลาดำหลังจากได้รับอาหารผสมแบคทีเรียสกุล *Bacillus* 7 ชนิด เป็นระยะเวลา 1 เดือน

| อาหารชนิดที่ | จำนวนแบคทีเรียสกุล <i>Vibrio</i> ($\times 10^4$ CFU/กรัม) |
|--------------|---|
| กลุ่มควบคุม | 426.133 ± 164.73^a |
| 1 | 59.73 ± 37^b |
| 2 | 77.8 ± 48.03^b |
| 3 | 85.93 ± 43.29^b |
| 4 | 92.73 ± 51.87^b |
| 5 | 76 ± 46.53^b |
| 6 | 82.93 ± 35.06^b |
| 7 | 119.73 ± 58.5^b |

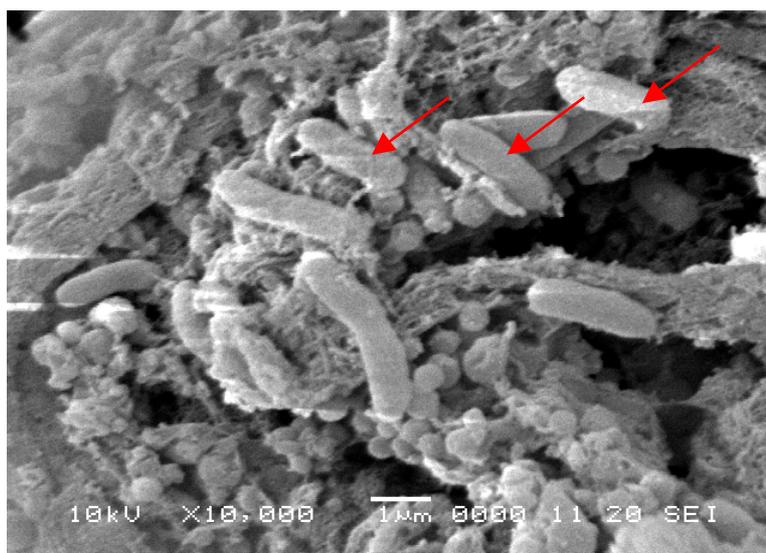
ค่าเฉลี่ยตามด้วยอักษรเหมือนกันภายในแถวตั้งเดียวกันจะไม่แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ $p > 0.05$, DMRT



ภาพที่ 29 จำนวนแบคทีเรียสกุล *Vibrio* เฉลี่ย (CFU/กรัม) ในลำไส้กุ้งกุลาดำหลังจากได้รับอาหารผสมแบคทีเรียสกุล *Bacillus* 7 ชนิด เป็นระยะเวลา 1 เดือน

3.6.5 ผลของการใช้อาหารผสมแบคทีเรียสกุล *Bacillus* 7 ชนิด ต่อชนิดของแบคทีเรียภายในลำไส้กุ้งกุลาดำ เมื่อศึกษาโดยใช้กล้อง Scanning Electron Microscope (SEM)

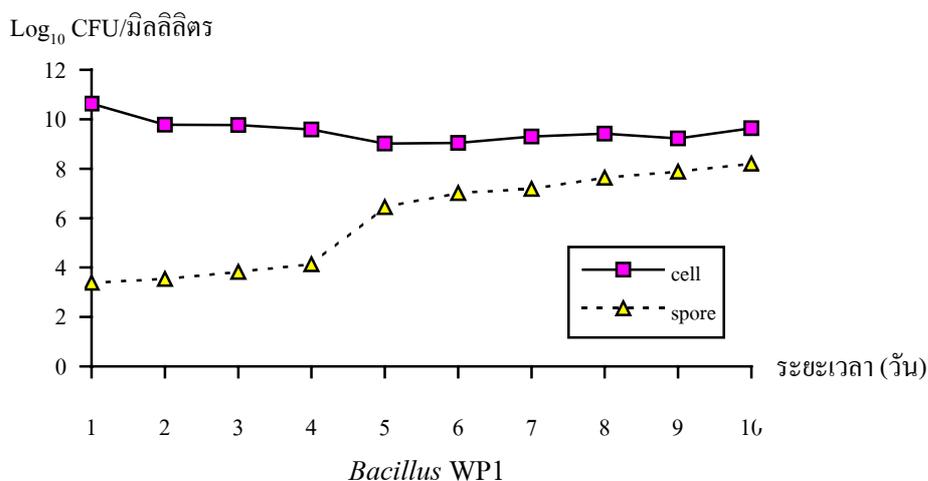
เมื่อทำการศึกษาแบคทีเรียในลำไส้กุ้งกุลาดำหลังจากเลี้ยงกุ้งกุลาดำด้วยอาหารผสมแบคทีเรียสกุล *Bacillus* เป็นระยะเวลา 1 เดือน โดยใช้กล้อง Scanning Electron Microscope พบว่ามีแบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นแท่งยาว ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่จะเป็นแบคทีเรียสกุล *Bacillus* เกาะอยู่ภายในลำไส้ (ภาพที่ 30)



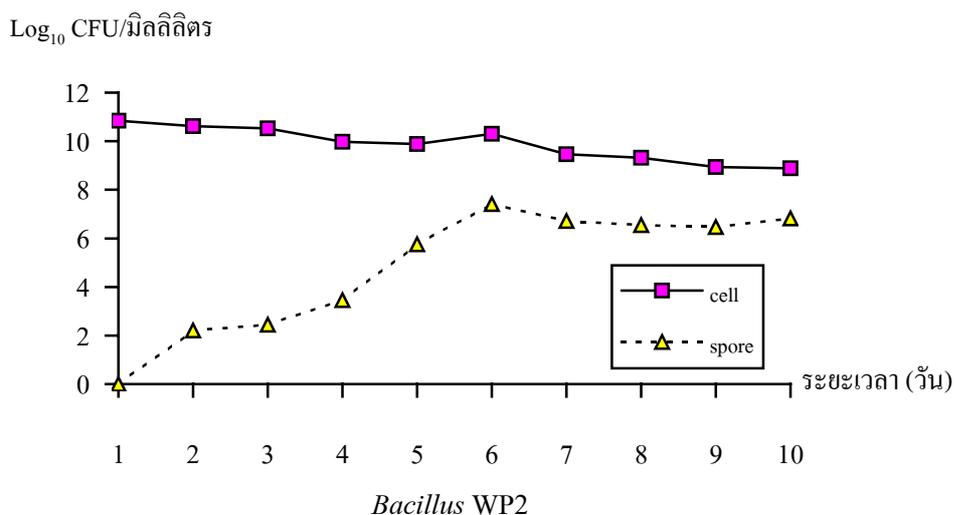
ภาพที่ 30 ภาพจากกล้อง Scanning Electron Microscope แสดงแบคทีเรียที่อยู่ในลำไส้กุ้งที่ได้รับอาหารผสมแบคทีเรียสกุล *Bacillus*

3.7 การศึกษาระยะเวลาในการเข้าสู่สปอร์ของแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ที่แยกได้

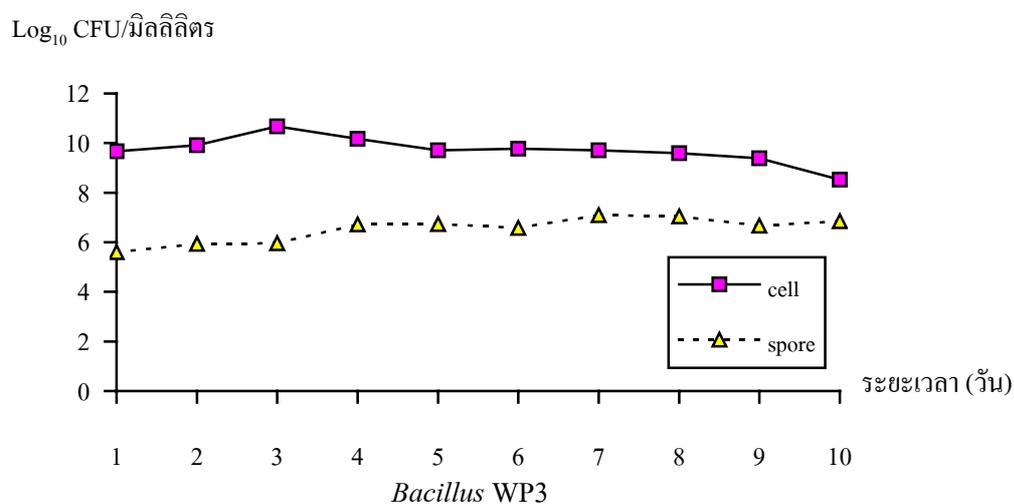
การศึกษาระยะเวลาในการสร้างสปอร์ของเชื้อ *Bacillus* ทั้ง 3 ชนิด โดยเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดใน NB 100 มิลลิลิตร ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^8 CFU/มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นับปริมาณของเชื้อ *Bacillus* ทุกวัน เป็นระยะเวลา 10 วัน โดยนับก่อน heat shock และหลัง heat shock ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 31, 32 และ 33



ภาพที่ 31 ปริมาณเชื้อ *Bacillus* WP1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ก่อนและหลัง heat shock



ภาพที่ 32 ปริมาณเชื้อ *Bacillus* WP2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ก่อนและหลัง heat shock



ภาพที่ 33 ปริมาณเชื้อ *Bacillus* WP3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ก่อนและหลัง heat shock

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเชื้อแต่ละชนิดอยู่ในรูปของสปอร์ในระยะเวลาที่ต่างกันโดยเชื้อ *Bacillus* WP1 และ *Bacillus* WP2 เริ่มอยู่ในรูปของสปอร์ในปริมาณมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 5 ส่วนเชื้อ *Bacillus* WP3 เชื้อเริ่มอยู่ในรูปของสปอร์ในปริมาณมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ตั้งแต่วันที่ 1 และปริมาณสปอร์สูงสุดในวันที่ 4 ผลจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* เพื่อให้อยู่ในรูปสปอร์ควรใช้เวลา 4-5 วันในการเลี้ยงเพื่อให้ได้ปริมาณสปอร์สูงสุด

วิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการศึกษาเพื่อหาปริมาณที่เหมาะสมในการใช้สารเบต้ากลูแคนเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันของ กุ้งกุลาดำโดยพิจารณาจากองค์ประกอบต่าง ๆ ทางด้านภูมิคุ้มกัน ได้แก่ ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase, การผลิต superoxide anion, bactericidal activity และ clearance ability พบว่าความเข้มข้นของสารเบต้ากลูแคนที่เหมาะสมที่สุดคือ 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม โดยความเข้มข้นดังกล่าวสามารถที่จะเพิ่มปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase, bactericidal activity และ clearance ability ได้โดยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) จากชุดการทดลองที่ใช้เบต้ากลูแคน 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม โดยสารเบต้ากลูแคนที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นสารเบต้ากลูแคนที่ผ่านขั้นตอนการทำบริสุทธิ์แล้ว เนื่องจากสารเบต้ากลูแคนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จะประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเล็ก เช่น กลูโคส ซึ่งง่ายต่อการดูดซึมเข้าสู่ระบบเลือดของกุ้ง แตกต่างจากสารเบต้ากลูแคนที่ยังไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ที่มีอนุภาคขนาดใหญ่ประกอบอยู่ ดังนั้นการดูดซึมเข้าสู่ระบบเลือดจะเป็นไปได้ช้ากว่าสารเบต้ากลูแคนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ (มลฤดี และคณะ, 2543 อ้างถึง Manners *et al.*, 1973)

ถึงแม้ว่าความเข้มข้นของสารเบต้ากลูแคนที่เหมาะสมที่สุดคือ 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม แต่อย่างไรก็ตามการใช้สารเบต้ากลูแคนปริมาณ 1 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ก็จะมีผลทำให้ระบบภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้นต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เช่นเดียวกัน โดยพิจารณาจากปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase ที่เพิ่มสูงขึ้นจาก 276.298 ± 22.751 เป็น 320.938 ± 25.256 หน่วย/นาทีก. โปรตีน และการผลิต superoxide anion ที่เพิ่มสูงขึ้นจาก 9.083 ± 2.678 เป็น 16.5 ± 5 หน่วย ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับการทดลองของมลฤดี และคณะ (2543) ซึ่งพบว่าการใช้สารเบต้ากลูแคนที่ผ่านขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ 1 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เลี้ยงกุ้งกุลาดำในห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 45 วัน ทำให้กุ้งมีปริมาณเม็ดเลือดรวมสูงกว่ากุ้งกุลาดำในชุดควบคุม

การศึกษาเพื่อหาความเข้มข้นของสารเบต้ากลูแคนที่เหมาะสมนั้น ในหลาย ๆ การทดลอง ผู้วิจัยจะเลือกความเข้มข้นที่ไม่สูงมาก และดูผลจากการที่ความเข้มข้นของสารเบต้ากลูแคนนั้น ๆ ให้ผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้รับสารเบต้ากลูแคนเท่านั้น ไม่ได้ทดลองใช้สารเบต้ากลูแคนความเข้มข้นที่สูงมากกว่านั้น และให้ผลการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันที่ดีกว่านั้น เช่น ในการทดลองของ Devaraja *et al.* (1998) ได้ทำการศึกษาพบว่า กุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารที่ผสมเบต้ากลูแคน 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 1 วัน สามารถชักนำให้เม็ดเลือดและน้ำเลือดฆ่าไวรัสได้สูงขึ้น การทดลองของ Itami *et al.* (1994) ซึ่งรายงานว่าความว่องไวของ

เมื่อดูผลในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมของกุ้ง kuruma (*Penaeus japonicus*) ที่ได้รับอาหารที่ผสม เบต้ากลูแคน 0.01 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 วัน หรือระดับ 0.005 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 วัน มีค่าสูงขึ้น รวมทั้งการทดลองของ Suphantharika *et al.* (2003) ได้ทดลองใช้ brewer's yeast β -glucan (BYG) ซึ่งมีปริมาณของคาร์โบไฮเดรตและเบต้ากลูแคนอยู่สูง พบว่าการที่กุ้งกุลาดำได้รับ BYG 0.2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ในอาหารเป็นเวลา 3 วัน จะไปเพิ่ม phenoloxidase activity ในเลือดของกุ้งกุลาดำซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มที่ไม่ได้ใช้ BYG

รวมทั้งการศึกษาของ Supamattaya *et al.* (2000) ซึ่งได้ทดลองเลี้ยงกุ้งกุลาดำขนาดน้ำหนักเฉลี่ย 0.6, 1.5 และ 6.5 กรัม โดยใช้อาหารผสมสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (β -glucan : MacroGard® ซึ่งได้มาจาก *Saccharomyces cerevisiae*) 4 ระดับ คือ 0, 0.25, 0.50 และ 1.0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม พบว่าเมื่อกุ้งได้รับสารเบต้ากลูแคน 1.0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม จะมีอัตราการรอด ปริมาณเม็ดเลือดรวม การผลิต superoxide anion และ ความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียในน้ำเลือดได้ดี หลังจากได้รับอาหารผสมสารเบต้ากลูแคนเป็นเวลา 6 สัปดาห์ ในขณะที่กุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมสารเบต้ากลูแคนชุดการทดลองอื่น ๆ มีค่าใกล้เคียงกับชุดควบคุม แต่เมื่อได้รับสารเบต้ากลูแคนเป็นระยะเวลา 11 สัปดาห์ กุ้งที่ได้รับสารเบต้ากลูแคนทุกชุดการทดลองจะมีค่าความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียในน้ำเลือดสูงกว่ากุ้งในชุดควบคุม ซึ่งการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารเบต้ากลูแคน ต้องขึ้นอยู่กับระยะเวลาที่ใช้สารเบต้ากลูแคนด้วย

ผลการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมของการใช้สารเบต้ากลูแคน 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม กับกุ้งกุลาดำ พบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมคือ 5 วัน/สัปดาห์ ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) จากการเลี้ยง 7 วัน/สัปดาห์ โดยพิจารณาจากองค์ประกอบต่าง ๆ ทางด้านภูมิคุ้มกัน ได้แก่ ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase, การผลิต superoxide anion, และ bactericidal activity ซึ่งเมื่อให้สารเบต้ากลูแคน 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เป็นระยะเวลา 1 เดือน แล้วหยุดให้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน พบว่าระบบภูมิคุ้มกันที่เพิ่มสูงขึ้นนั้นจะมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมไปอีกประมาณ 2-3 สัปดาห์ หลังจากนั้นจึงให้สารเบต้ากลูแคนครั้งที่ 2 ซึ่งก็สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันให้สูงขึ้นอีกครั้ง

ผลการศึกษาเพื่อหาปริมาณที่เหมาะสมในการใช้สารเปปติโดกลัยแคนเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกึ่งกลูตาต้าโดยพิจารณาจากองค์ประกอบทางด้านภูมิคุ้มกันต่าง ๆ ได้แก่ ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase, การผลิต superoxide anion, bactericidal activity และ clearance ability พบว่าความเข้มข้นของสารเปปติโดกลัยแคนที่เหมาะสมที่สุดคือ 6 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม โดยความเข้มข้นดังกล่าวสามารถที่จะเพิ่มปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase การผลิต superoxide anion, bactericidal activity และ clearance ability ได้สูงกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ ที่ใช้เปปติโดกลัยแคน 2 และ 4 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม รวมทั้งกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ใช้สารเปปติโดกลัยแคนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

สารเปปติโดกลัยแคนที่นำมาทดลองนี้มีองค์ประกอบของสารเปปติโดกลัยแคน 3 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นหากคิดเป็นปริมาณของสารเปปติโดกลัยแคนที่แท้จริงแล้ว ความเข้มข้นที่ให้ผลในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่ดีที่สุดคือ 0.18 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม แต่หากใช้ในปริมาณ 0.06 – 0.12 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม จะสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้เพียงบางองค์ประกอบคือ bactericidal activity และ clearance ability ซึ่งผลที่ได้ใกล้เคียงกับการทดลองของมะลิ และคณะ (2543) ที่ได้ทดลองใช้สารสกัดจากผนังเซลล์แบคทีเรีย คือ เปปติโดกลัยแคน ที่สกัดจากเชื้อแบคทีเรีย *Bifidobacterium thermophilum* นำมาผสมอาหารให้กึ่งกลูตาต้ากิน 3 ระดับความเข้มข้นคือ 0 เปอร์เซ็นต์, 0.01 เปอร์เซ็นต์ และ 0.0085 เปอร์เซ็นต์ โดยให้กึ่งกินอาหารทดลองเป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่าเม็ดเลือดของกึ่งกลูตาต้าที่ได้รับอาหารผสมเปปติโดกลัยแคน มีความสามารถในการผลิต superoxide anion และความสามารถในการต้านทานเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ได้ดีกว่ากึ่งกลูตาต้าชุดควบคุมที่ได้รับอาหารปกติ แต่ไม่พบความแตกต่างของเอนไซม์ phenoloxidase ของเม็ดเลือดกึ่งที่ได้รับอาหารทั้ง 3 ชุดการทดลอง

ผลการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมของการใช้สารเปปติโดกลัยแคน 0.18 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัมกับกึ่งกลูตาต้า พบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมคือ 5 วัน/สัปดาห์ โดยพิจารณาจากองค์ประกอบต่าง ๆ ทางด้านภูมิคุ้มกัน ได้แก่ ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase, การผลิต superoxide anion และ bactericidal activity ซึ่งเมื่อให้สารเปปติโดกลัยแคน 0.18 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เป็นระยะเวลา 1 เดือนแล้วหยุดให้ พบว่าระบบภูมิคุ้มกันที่เพิ่มสูงขึ้นนั้นจะมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมไปอีกประมาณ 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นจึงให้สารเปปติโดกลัยแคนครั้งที่ 2 ก็สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันให้สูงขึ้นอีกครั้ง

การศึกษาการใช้ประโยชน์จากเชื้อแบคทีเรียสกุล *Bacillus* จากลำไส้กุ้งกุลาดำ พบว่าเมื่อทำการแยกชนิดของแบคทีเรียที่สามารถสร้างสปอร์ได้ สามารถแยกออกมาได้ทั้งหมด 20 isolates แต่มีเพียง 6 isolates เท่านั้น ที่อยู่ในสกุล *Bacillus* และมี 3 isolates ที่สามารถแยกชนิดได้อย่างชัดเจน ได้แก่ *Bacillus* WP1, WP2 และ WP3 ซึ่งการแยกชนิดทำการแยกชนิดโดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป VITEK32, API50CHB, API20E และยืนยันชนิดโดยวิธีดั้งเดิม ซึ่งพบว่าการแยกโดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูปจะมีหลักการทดสอบที่แตกต่างกัน โดย VITEK32 (*Bacillus* identification card) เป็นการทดสอบการสร้างกรดจากคาร์โบไฮเดรต 20 ชนิด ได้แก่ sucrose, tagatose, glucose, inositol, galactose, arabinose, xylose, mannitol, raffinose, salicin, amygdalin, inulin, ribose, maltose, trehalose, palatinose, sorbitol, n-acetyl-d-glucosamine, amylopectin และ arabitol ปฏิกริยา reduction ของ tetrazolium red การเจริญในสภาพที่ไม่มีออกซิเจนใน potassium thiocyanate, sodium chloride 7%, mandelic acid, polyamidohydrostreptin, nalidixic acid และ oleandomycin การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดเป็นด่างโดยการเกิด ammonia รวมทั้งปฏิกริยา hydrolysis ของสาร esculin ผลจากการทดสอบพบว่าแบคทีเรีย WP1, WP2 และ WP3 มีความเป็นไปได้ 99 เปอร์เซ็นต์ที่จะเป็นเชื้อ *B. pumilus*, *B. sphaericus* และ *B. subtilis* ตามลำดับ

ชุดทดสอบสำเร็จรูป API50CHB เป็นการแยกชนิดของ *Bacillus* โดยดูจากปฏิกริยา fermentation ของคาร์โบไฮเดรตชนิดต่าง ๆ 49 ชนิด ได้แก่ glycerol, erythritol, D-arabinose, L-arabinose, D-ribose, D-xylose, L-xylose, D-adonitol, Methyl-βD-xylopyranoside, D-galactose, D-glucose, D-fructose, D-mannose, L-sorbose, L-rhamnose, dulcitol, inositol, D-mannitol, D-sorbitol, Methyl-αD-mannopyranoside, Methyl-αD-glucopyranoside, N-acetylglucosamine, amygdalin, arbutin, esculin ferric citrate, salicin, D-celiobiose, D-maltose, D-lactose, D-melibiose, D-saccharose, D-trehalose, inulin, D-melezitose, D-raffinose, Amidon (starch), glycogen, xylitol, gentiobiose, D-turanose, D-lyxose, D-tagatose, D-fucose, L-fucose, D-arabitol, L-arabitol, potassium gluconate, potassium 2-ketogluconate และ potassium 5-ketogluconate ส่วน API20E เป็นข้อมูลที่ใช้ประกอบในการแยกชนิดของ *Bacillus* แต่ไม่สามารถแยกชนิดได้โดยตรง ซึ่งมีการทดสอบปฏิกริยา fermentation ของคาร์โบไฮเดรตชนิดต่าง ๆ ได้แก่ D-glucose, D-mannitol, inositol, D-sorbitol, L-rhamnose, D-sucrose, D-melibiose, amygdalin, L-arabinose การทดสอบ เอนไซม์ β-galactosidase, arginine dihydrolase, lysine decarboxylase, ornithine decarboxylase, citrate utilization, การผลิต H₂S, NO₂ โดยใช้ peptone เป็น substrate ซึ่งผลจากการทดสอบเชื้อ WP1, WP2 และ WP3 ตรงกับคุณสมบัติของเชื้อ *B. pumilus*, *B. sphaericus* และ *B. subtilis*

เมื่อนำผลที่ได้จากการแยกชนิดโดยใช้วิธีดั้งเดิม เปรียบเทียบกับการทดสอบโดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป 2 ชนิด ได้แก่ VITEK32 (*Bacillus* identification card) และ API50CHB พบว่าเชื้อ *Bacillus* ทั้ง 3 ชนิด ให้ผลการทดสอบตรงกับ 2 วิธีแรก คือเป็นเชื้อ *B. pumilus*, *B. sphaericus* และ *B. subtilis* ตามลำดับ

การศึกษาชนิดของแบคทีเรียในลำไส้จากกึ่งกลาดำที่เลี้ยงในบ่อดินนั้น ลีลา และคณะ (2540) ได้รายงานพบว่าพบแบคทีเรียแกรมบวก อย่างไรก็ตามการศึกษาดังกล่าวนั้นไม่ได้ระบุสกุลของแบคทีเรียแกรมบวกที่พบ จึงไม่ทราบว่าเป็นแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* หรือไม่ แบคทีเรียที่แยกได้จากลำไส้กึ่งนี้อาจเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียเหล่านี้เป็นแบคทีเรียที่อาศัยในลำไส้เดิม หรือกึ่งได้รับจากการกินเข้าไปไม่ว่าจะเป็นทางอาหาร จากน้ำ หรือดินในบ่อเลี้ยง เนื่องจากแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดนี้สามารถพบได้ทั่วไปในดิน หรือในน้ำทะเล ซึ่งจากการศึกษาของ Bonde (1981) พบว่าในน้ำทะเลที่สะอาดจะพบ *B. licheniformis* ในปริมาณมากที่สุด รองลงมา ได้แก่ *B. subtilis* และ *B. pumilus* ตามลำดับ และจะพบ *B. brevis*, *B. firmus* และ *B. sphaericus* ในปริมาณที่น้อย นอกจากนี้ สุภชัย และ ลีลา (2540) ได้ศึกษาปริมาณแบคทีเรียในดินก้นบ่อเลี้ยงกึ่งกลาดำในเขตจังหวัดจันทบุรี พบว่ามีแบคทีเรียหลายชนิด ได้แก่ *Escherichia coli*, *Pseudomonas spp.*, *Salmonella spp.*, *Vibrio harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, *V. anguillarum*, *V. damsela* และ *V. cholerae* รวมทั้งพบ *Bacillus spp.* ในดินก้นบ่อเลี้ยงกึ่งด้วย

การทดลองนี้ได้นำ *Bacillus* ที่ได้ทั้ง 3 ชนิด ไปทดสอบความสามารถในการยับยั้ง และการแข่งขันในการใช้สารอาหารในการเจริญร่วมกับเชื้อก่อโรค และทดสอบความสามารถในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในกึ่งกลาดำ สาเหตุที่เลือกเฉพาะแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* เนื่องจากแบคทีเรียสกุลนี้สามารถสร้างสปอร์ได้ จึงสามารถเก็บไว้ใช้ได้ยาวนานในรูปของสปอร์ มีการใช้ *Bacillus spp.* หลายชนิดเป็นโปรไบโอติกในกึ่งกลาดำ เช่น *Bacillus spp.* (Shivappa and Chanratchakool, 1997; Phianphak *et al.*, 1997), *Bacillus* S11 (Rengpipat *et al.*, 1998a) และ *B. mycoides* (วรรณิภา, 2539)

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *V. harveyi* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในกึ่งทะเล ของเชื้อ *Bacillus spp.* ทั้ง 3 ชนิดที่แยกได้จากลำไส้กึ่งแบบ *in vitro* โดยวิธี double layer agar พบว่าเชื้อทั้ง 3 ชนิดไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *V. harveyi* ได้ อย่างไรก็ตามเมื่อใช้เชื้อ *Bacillus spp.* ทั้ง 3 ชนิด เลี้ยงร่วมกับเชื้อ *V. harveyi* พบว่าสามารถลดปริมาณเชื้อดังกล่าวลงได้ รวมทั้งเมื่อทำการเลี้ยง

กุ้งกุลาดำเป็นระยะเวลา 1 เดือน พบว่าในลำไส้กุ้งกุลาดำมีจำนวนของเชื้อในสกุล *Vibrio* ลดลง แสดงถึงปฏิกริยาบางอย่างที่เชื้อทั้ง 2 สกุลนี้มีต่อกัน เช่นเดียวกับในการศึกษาของ Rico-Mora *et al.* (1998) ซึ่งได้ทดลองใช้แบคทีเรีย SK-05 เพื่อควบคุม *Vibrio alginolyticus* ในการเลี้ยง *Skeletonema costatum* ซึ่งพบว่าใช้ได้ผลดีในการควบคุมแบคทีเรียดังกล่าว แต่เมื่อนำแบคทีเรีย SK-05 ไปทดสอบความสามารถในการสร้างสาร antibiotic เพื่อควบคุมเชื้อ *V. alginolyticus* พบว่าไม่สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ได้ แต่ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงความสามารถของเชื้อ SK-05 ในการแข่งขันกับเชื้อก่อโรคในการเจริญเติบโต ทำให้ *Vibrio* ไม่สามารถเจริญได้

เมื่อทำการตรวจสอบความคงสภาพของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดซึ่งเก็บรักษาในรูปของผงสปอร์พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 3 เดือน จำนวนเซลล์ของแบคทีเรียไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับจำนวนเริ่มต้น แสดงว่าขบวนการผลิตผงสปอร์ดังกล่าวสามารถนำไปใช้ในการเก็บรักษาแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ได้ดีเนื่องจากจำนวนเซลล์ไม่มีการเปลี่ยนแปลงในระยะ 3 เดือนแรก แต่หากเก็บผงสปอร์นานเป็นเวลา 6 เดือนปริมาณของเชื้อแบคทีเรียจะลดลง 32.77-38.01 เปอร์เซ็นต์ และลดลง 46.19-56.05 เปอร์เซ็นต์ในเวลา 12 เดือน ซึ่งปริมาณเชื้อ *Bacillus* ที่ลดลงอาจเนื่องมาจากวิธีการผลิตสปอร์ ซึ่งใช้ระยะเวลาเพียง 2 วัน ทำให้ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณสปอร์น้อย โดยเมื่อพิจารณาจากการศึกษาระยะเวลาในการเข้าสปอร์พบว่าเชื้อ *Bacillus* WP1 และ *Bacillus* WP2 ต้องใช้ระยะเวลามากกว่า 5 วัน จึงมีปริมาณสปอร์สูงสุด อย่างไรก็ตามปัจจัยที่สำคัญที่ทำให้เชื้อ *Bacillus* เกิดการสร้างสปอร์คือ ปริมาณสารอาหารที่มีอยู่จำกัด เช่นปริมาณคาร์บอนหรือปริมาณไนโตรเจน เป็นต้น (Bauman, 2004) ดังนั้นการควบคุมปัจจัยเหล่านี้ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะสามารถทำให้เชื้อเข้าสปอร์ได้เร็วขึ้น

เมื่อเก็บตัวอย่างเลือดกุ้งเพื่อดูผลของการใช้อาหารผสมแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ทั้ง 7 ชนิดต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง พบว่าแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ทุกกลุ่มทดลองทั้งเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสม มีผลในการเพิ่มระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งการที่แบคทีเรียสกุล *Bacillus* มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน อาจเนื่องมาจากการที่แบคทีเรียสกุล *Bacillus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีองค์ประกอบของผนังเซลล์เป็นสารเปปติโดไกลัยแคน ซึ่งสารเปปติโดไกลัยแคนมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ ดังแสดงในผลการศึกษากการใช้เปปติโดไกลัยแคนกับการเลี้ยงกุ้งกุลาดำในการทดลองส่วนที่ 2 พบว่าการใช้สารเปปติโดไกลัยแคน ปริมาณ 0.18 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัมจะสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันต่าง ๆ ได้แก่ ปริมาณ เอนไซม์ phenoloxidase, การผลิต superoxide anion, bactericidal activity และ clearance ability

เช่นเดียวกับที่ มะลิ และคณะ (2543) ได้ทำการทดลองให้กุ้งกุลาดำกินอาหารผสมสารเปปติโดกลัยแคนเป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่าเม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำ มีความสามารถในการผลิต superoxide anion ได้ดีกว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารปกติ และมีความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียออกจากน้ำเลือดสูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ชุดควบคุมที่ไม่ได้รับเปปติโดกลัยแคน มีความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียออกจากน้ำเลือดเพียง 50 เปอร์เซ็นต์

เมื่อพิจารณาจากปริมาณแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองซึ่งผสมอาหารให้กุ้งกินจำนวน 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม โดยผนังเซลล์ของแบคทีเรียมีน้ำหนักประมาณ 30-60 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง (Todar, 2003) และผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกมีปริมาณเปปติโดกลัยแคน 50 เปอร์เซ็นต์ (Archibald, 1989) ดังนั้นปริมาณเปปติโดกลัยแคนมีประมาณ 15-30 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ในการทดลองใช้แบคทีเรียประมาณ 1.67 กรัม (น้ำหนักเปียก)/อาหาร 1 กิโลกรัม เลี้ยงกุ้งกุลาดำ (ผสมสปอร์ได้จากการผสม clay 2 ส่วน + ตะกอนแบคทีเรีย 1 ส่วน) ปริมาณเปปติโดกลัยแคนที่ได้รับควรมีน้อยกว่า 0.25 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ในการทดลองส่วนนี้จึงเห็นผลในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำได้น้อยกว่าการทดลองในส่วนที่ 2 ซึ่งใช้สารเปปติโดกลัยแคนโดยตรง

ปริมาณของแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ในลำไส้กุ้งกุลาดำทุกชุดการทดลอง หลังจากเลี้ยงด้วยอาหารผสมแบคทีเรียสกุล *Bacillus* เป็นระยะเวลา 1 เดือน พบว่ามีจำนวนแบคทีเรียสกุล *Bacillus* เพิ่มขึ้นในทุกชุดการทดลอง โดยมีปริมาณที่พบแตกต่างกัน ซึ่งแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียในการยึดเกาะกับลำไส้ และเมื่อนับจำนวนแบคทีเรียสกุล *Vibrio* ในลำไส้ พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ของแบคทีเรียสกุล *Vibrio* ลดลงจากเดิมประมาณร้อยละ 20.97-32.45 การลดลงของเชื้อ *Vibrio* อาจเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงสภาพของเชื้อ *Vibrio* เมื่อเจริญร่วมกับ *Bacillus* จากการศึกษาด้วยกล้อง Transmission Electron Microscope พบว่าเชื้อ *Vibrio* มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างโดยหดสั้นลง ซึ่งเป็นสิ่งที่น่าสนใจที่จะทำการศึกษาต่อไปว่าการเปลี่ยนแปลงรูปร่างนี้มีผลต่อความสามารถในการก่อโรคหรือไม่ และเซลล์จะกลับมาเป็นเซลล์ปกติได้หรือไม่ และใช้ระยะเวลาเท่าใด อย่างไรก็ตามมณจันทร์ และ กมลพร (2543) ได้ทำการศึกษาแบคทีเรียที่มีประโยชน์บางชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis* และ *B. licheniformis* ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *V. harveyi* พบว่ามีผลในการยับยั้งหลังการทดสอบ 72 ชั่วโมง และเมื่อนำ *V. harveyi* ที่ทดสอบด้วย *B. subtilis* มาศึกษาความผิดปกติด้วยกล้อง Scanning Electron Microscope พบว่ารูปร่างของเซลล์เล็กกว่าปกติมาก ซึ่งเป็นความผิดปกติที่ถาวร

ความแตกต่างระหว่างการใช้เชื้อเดี่ยวของ *Bacillus* ได้แก่ *B. pumilus*, *B. sphaericus* และ *B. subtilis* และเชื้อผสม ได้แก่ *B. pumilus* + *B. sphaericus*, *B. pumilus* + *B. subtilis*, *B. sphaericus* + *B. subtilis* และ *B. pumilus* + *B. sphaericus* + *B. subtilis* ผสมอาหารเลี้ยงกึ่งกลุ่ดาคำ พบว่าเชื้อ *Bacillus* ทั้ง 3 ชนิดที่นำมาทดลองมีความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกึ่งกลุ่ดาคำโดยพิจารณาจากค่า phenoloxidase, bactericidal activity และ clearance ability ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกลุ่มควบคุม แต่อย่างไรก็ตามเชื้อเดี่ยวของ *B. subtilis* จะมีความสามารถในการกระตุ้นการทำงานของขบวนการ phagocytosis ได้ดีกว่าเชื้อ *Bacillus* ชนิดอื่น ซึ่งจะเห็นได้จากค่า superoxide anion ซึ่งสูงกว่าทุกกลุ่มทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่เมื่อนำไปผสมรวมกับ *Bacillus* ชนิดอื่นจะมีประสิทธิภาพลดลง โดยอาจเกิดปฏิกิริยาบางอย่างระหว่างเชื้อ *Bacillus* แต่ละชนิด เช่นการสร้างเอนไซม์ หรือการสร้างสารปฏิชีวนะมายับยั้งการทำงานหรือการเจริญของเชื้ออีกชนิด ส่วนความสามารถในการแข่งขันการใช้สารอาหาร และความสามารถในการลดแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* ของ *Bacillus* ทั้ง 3 ชนิดในรูปของเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมนั้น ไม่แตกต่างกัน

วิธีการทดลองการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันโดยสาร 3 ชนิด ได้แก่ สารเบต้ากลูแคน เปปติโดกลัยแคน และ แบคทีเรียสกุล *Bacillus* จะมีความแตกต่างกัน เนื่องจากสารเบต้ากลูแคน และ เปปติโดกลัยแคน เป็นสารที่มีการใช้เพื่อกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในกึ่งกลุ่ดาคำอยู่แล้วในปัจจุบัน ดังนั้นความมุ่งหมายในการศึกษาสารทั้ง 2 ชนิดนี้ เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสม และระยะเวลาที่เหมาะสมเพื่อให้เกิดความคุ้มทุนในการที่เกษตรกรผู้เลี้ยงกึ่งกลุ่ดาคำจะนำผลนี้ไปใช้ แต่ไม่ได้ศึกษาในแง่ของการเพิ่มอัตราการเจริญเติบโต เนื่องจาก Supamattaya *et al.* (2000) ได้ทำการศึกษาพบว่าการใช้สารเบต้ากลูแคน 4 ระดับ คือ 0, 0.25, 0.50 และ 1.0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เลี้ยงกึ่งกลุ่ดาคำเป็นเวลา 10 สัปดาห์ ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ

นอกจากนั้นในการศึกษาการใช้ประโยชน์จากเชื้อแบคทีเรียสกุล *Bacillus* จะทดลองโดยใช้ระยะเวลาเพียง 1 เดือน โดยการทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกชนิดของแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ที่ดีที่สุดในการนำมาใช้ประโยชน์เป็นโพรไบโอติก โดยสามารถที่จะให้โพรไบโอติกนี้ตลอดการเลี้ยงเพื่อช่วยในการเพิ่มระบบภูมิคุ้มกัน และลดปริมาณเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหารด้วย

เมื่อพิจารณาความสามารถในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของสารทั้ง 3 ชนิด เมื่อใช้เลี้ยงกุ้งกุลาดำในระยะเวลา 1 เดือน โดยพิจารณาจากค่า phenoloxidase, การผลิต superoxide anion และ bactericidal activity พบว่าการใช้เบต้ากลูแคนปริมาณ 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม สัปดาห์ละ 5 วัน เป็นระยะเวลา 1 เดือน จะมีประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันสูงสุด โดยสามารถเพิ่มค่า phenoloxidase, การผลิต superoxide anion และ bactericidal activity 41.6%, 80% และ 4 เท่า ตามลำดับเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม การใช้สารเปปติโดกลัยแคน 0.18 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม สัปดาห์ละ 5 วัน เป็นระยะเวลา 1 เดือนจะมีประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันรองลงมาโดยสามารถเพิ่มค่า phenoloxidase, การผลิต superoxide anion และ bactericidal activity 37.05%, 61.99% และ 4 เท่า ตามลำดับเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ส่วนการใช้แบคทีเรีย *Bacillus* เลี้ยงกุ้งกุลาดำนั้นจะมีประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่ำสุด โดยสามารถเพิ่มค่า phenoloxidase, การผลิต superoxide anion และ bactericidal activity 24.09%, 47% และ 2 เท่า ตามลำดับเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

ปัจจัยทางสภาพแวดล้อมซึ่งอาจมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันคือ คุณภาพน้ำ ซึ่งในการทดลองทั้ง 3 การทดลองพบว่า ทุกกลุ่มทดลองมีคุณภาพน้ำอยู่ในเกณฑ์ปกติ โดยมีค่าออกซิเจนที่ละลายน้ำ 5.09 – 5.91 มิลลิกรัม/ลิตร ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 7.27 – 8.17 ปริมาณแอมโมเนีย 0.07 – 0.35 ppm และปริมาณไนไตรท์ 0.13 – 0.86 ppm

สรุปผลการทดลอง

เบต้ากลูแคน

จากการทดลองเพื่อศึกษาหาปริมาณที่เหมาะสมในการใช้สารเบต้ากลูแคนเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันกึ่งกลาดำ พบว่าความเข้มข้นของสารเบต้ากลูแคนที่น้อยที่สุดที่ให้กับกึ่งกลาดำแล้วมีผลในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน คือความเข้มข้น 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม โดยประเมินจากผลการตรวจองค์ประกอบต่าง ๆ ทางด้านภูมิคุ้มกัน ได้แก่ ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase, การผลิต superoxide anion, bactericidal activity และ clearance ability

การทดลองเพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการให้สารเบต้ากลูแคนพบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมคือ 5 วัน/สัปดาห์ โดยพิจารณาจากการตรวจองค์ประกอบต่าง ๆ ทางด้านภูมิคุ้มกัน ได้แก่ ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase, การผลิต superoxide anion และ bactericidal activity ซึ่งเมื่อให้สารเบต้ากลูแคน 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม สัปดาห์ละ 5 วัน เป็นระยะเวลา 1 เดือน แล้วหยุดให้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน พบว่าระบบภูมิคุ้มกันที่เพิ่มสูงขึ้นนั้นจะมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมไปอีกประมาณ 2-3 สัปดาห์

ดังนั้น ในการเลี้ยงกึ่งกลาดำพบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารเบต้ากลูแคนที่มีผลในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน คือ 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ส่วนระยะเวลาในการใช้คือ 5 วัน/สัปดาห์ ในช่วงเวลา 1 เดือน แล้วหยุดให้นาน 1 เดือน และให้ซ้ำอีกครั้งเป็นเวลา 1 เดือน

เปปติโดกลัยแคน

จากการทดลองเพื่อศึกษาหาปริมาณที่เหมาะสมในการใช้สารเปปติโดกลัยแคนเพื่อเสริมสุขภาพกึ่งกลาดำ พบว่าความเข้มข้นของสารเปปติโดกลัยแคนที่น้อยที่สุดที่ให้กับกึ่งกลาดำแล้วมีผลในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน คือความเข้มข้น 0.18 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม โดยประเมินจากผลการตรวจองค์ประกอบต่าง ๆ ทางด้านภูมิคุ้มกัน ได้แก่ ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase, การผลิต superoxide anion, bactericidal activity และ clearance ability

การทดลองเพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการให้สารเปปติโดกลัยแคนพบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมคือ 5 วัน/สัปดาห์ โดยพิจารณาจากการตรวจองค์ประกอบต่าง ๆ ทางด้านภูมิคุ้มกัน ได้แก่ ปริมาณแอนไทม์ phenoloxidase, การผลิต superoxide anion และ bactericidal activity ซึ่งเมื่อให้สารเปปติโดกลัยแคน 0.18 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม สัปดาห์ละ 5 วัน เป็นระยะเวลา 1 เดือน แล้วหยุดให้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน พบว่าระบบภูมิคุ้มกันที่เพิ่มสูงขึ้นนั้นจะมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมไปอีกประมาณ 2-3 สัปดาห์

ดังนั้นในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำพบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารเปปติโดกลัยแคนที่มีผลในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน คือ 0.18 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ส่วนระยะเวลาในการใช้คือ 5 วัน/สัปดาห์ ในช่วงเวลา 1 เดือน แล้วหยุดให้นาน 1 เดือน และให้ซ้ำอีกครั้งเป็นเวลา 1 เดือน

แบคทีเรียสกุล *Bacillus*

ผลการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียจากลำไส้กุ้งกุลาดำ พบว่าภายในลำไส้กุ้งกุลาดำมีทั้งแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบอยู่ โดยในกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวกนั้น ได้คัดเลือกเฉพาะกลุ่มที่สามารถสร้างสปอร์ได้ และอยู่ในสกุล *Bacillus* spp. จากการทดลองพบแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* 3 ชนิด ได้แก่ *B. pumilus*, *B. sphaericus* และ *B. subtilis*

จากผลการทดลองพบว่า เชื้อ *V. harveyi* เมื่อเลี้ยงรวมกับเชื้อ *Bacillus* ทั้ง 3 ชนิด จะมีปริมาณลดลงประมาณ 46.47-48.41 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เชื้อ *Bacillus* ทั้ง 3 ชนิดเมื่อเลี้ยงรวมกับเชื้อ *V. harveyi* จะมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำเชื้อ *Bacillus* ทั้ง 3 ชนิด มาใช้เป็นโพรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำต่อไป

การทดสอบความคงสภาพของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ที่ผลิตในรูปผงสปอร์ พบว่าเชื้อที่ผลิตมีความคงสภาพประมาณ 3 เดือน โดยมีจำนวนเซลล์เริ่มต้นประมาณ 10^{11} - 10^{12} CFU/กรัม เมื่อนำผงสปอร์ดังกล่าวผสมอาหารให้กุ้งกุลาดำกินในรูปของเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสม ปริมาณ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เป็นระยะเวลา 1 เดือน เพื่อดูคุณสมบัติในการเป็นโพรไบโอติกและคุณสมบัติในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน พบว่าการที่กุ้งได้รับแบคทีเรียดังกล่าวไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ แต่มีผลต่อปริมาณของแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ในลำไส้กุ้งกุลาดำ โดยกุ้งทุกชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสม แบคทีเรียสกุล *Bacillus* จะมีจำนวนแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ในลำไส้เพิ่มขึ้น ซึ่ง

แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียในการยึดเกาะกับลำไส้ รวมทั้ง มีปริมาณแบคทีเรียสกุล *Vibrio* ลดลงประมาณ 20.97-32.45 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ในการไปลดจำนวนแบคทีเรียสกุล *Vibrio* ในลำไส้ โดยอาจเกิดการแข่งขันกับเชื้อก่อโรคในการเจริญเติบโต ทำให้ *Vibrio* ไม่สามารถเจริญได้

เมื่อเลี้ยงกุ้งเป็นระยะเวลา 1 เดือน ทำการเก็บตัวอย่างเลือดกุ้งเพื่อดูผลของการใช้อาหารผสมแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ทั้ง 7 ชนิด ต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ พบว่ามีค่าขององค์ประกอบทางระบบภูมิคุ้มกันแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 32 ซึ่งจะเห็นว่าอาหารผสมแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ทุกชนิดทั้งในรูปแบบเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสม มีผลในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ ดังนั้นแบคทีเรียสกุล *Bacillus* จึงสามารถใช้ได้ทั้งการเป็นโปรไบโอติกเพื่อไปลดปริมาณเชื้อก่อโรคในลำไส้ และใช้เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้อีกด้วย

ตารางที่ 32 ผลของการใช้อาหารผสมแบคทีเรียสกุล *Bacillus* 7 ชนิด เลี้ยงกุ้งกุลาดำเป็นระยะเวลา 1 เดือนต่อองค์ประกอบทางระบบภูมิคุ้มกันต่าง ๆ

| อาหารชนิดที่ | ชนิดของแบคทีเรียสกุล <i>Bacillus</i> | พารามิเตอร์ทางภูมิคุ้มกันที่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) | | | |
|--------------|---|---|------------------|-----------------------|-------------------|
| | | Phenol oxidase | Superoxide anion | Bactericidal activity | Clearance ability |
| 1 | <i>Bacillus pumilus</i> | ✓ | - | ✓ | ✓ |
| 2 | <i>Bacillus sphaericus</i> | ✓ | - | ✓ | ✓ |
| 3 | <i>Bacillus subtilis</i> | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| 4 | <i>Bacillus pumilus</i> <i>Bacillus sphaericus</i> | ✓ | - | ✓ | ✓ |
| 5 | <i>Bacillus pumilus</i> <i>Bacillus subtilis</i> | ✓ | - | ✓ | ✓ |
| 6 | <i>Bacillus sphaericus</i> <i>Bacillus subtilis</i> | ✓ | - | ✓ | ✓ |
| 7 | <i>Bacillus pumilus</i> <i>Bacillus sphaericus</i> <i>Bacillus subtilis</i> | ✓ | - | ✓ | ✓ |

เอกสาร และสิ่งอ้างอิง

กระทรวงพาณิชย์. 2548. มูลค่าสินค้าส่งออก. <http://www.moc.go.th/>, 2 กรกฎาคม 2548.

กิจการ สุภมาตย์ และ สิทธิ บุญยรัตผลิน. 2539. การศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อและเซลล์ในกิ่งกุหลาบที่ติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองและโรคตัวแดงดวงขาว. วารสารสงขลานครินทร์ ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 18 (1): 17-33.

กิจการ สุภมาตย์, สุภาพ เกียรติทับทิว และ R. Hoffmann. 2543 ก. ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกิ่งกุหลาบ: III. การศึกษาทางจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของเม็ดเลือดกิ่งกุหลาบ. วารสารสงขลานครินทร์ ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22 (ฉบับพิเศษ): 589-596.

กิจการ สุภมาตย์, จรีพร เรืองศรี, สุภภา คีรีรัฐนิคม และ นเรศ ช้วนยุค. 2543 ข. ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกิ่งกุหลาบ: V. ผลของอุณหภูมิ ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำและความเป็นกรด-ด่างของน้ำต่อระบบภูมิคุ้มกัน โรคและองค์ประกอบเลือดในกิ่งกุหลาบ. วารสารสงขลานครินทร์ ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22 (ฉบับพิเศษ): 605-613.

กิจการ สุภมาตย์, จรีพร เรืองศรี, สุภภา คีรีรัฐนิคม และ นเรศ ช้วนยุค. 2543 ค. ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกิ่งกุหลาบ: VI. ผลของโรคติดเชื้อต่อระบบภูมิคุ้มกัน โรคและองค์ประกอบเลือดในกิ่งกุหลาบ. วารสารสงขลานครินทร์ ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22 (ฉบับพิเศษ): 615-621.

กิจการ สุภมาตย์, วุฒิพร พรหมขุนทอง, ชุติมา ดันติกิตติ และ R. Hoffmann. 2543 ง. ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกิ่งกุหลาบ: II. เซลล์และเนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมในกิ่งกุหลาบ. วารสารสงขลานครินทร์ ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22 (ฉบับพิเศษ): 581-588.

กิจการ ศุภมาตย์, วุฒิพร พรหมขุนทอง, ชุตติมา ตันตติกิตติ และ R. Hoffmann. 2543 ง. ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ: II. เซลล์และเนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมในกุ้งกุลาดำ. **วารสารสงขลานครินทร์ ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี** 22 (ฉบับพิเศษ): 581-588. อ้างถึง Rabin, H. 1970. Hemocyte, hemolymph and the defense reactions of crustaceans. **J. Reticuloendothel. Soc.** 7: 195-207.

กิจการ ศุภมาตย์, อุษณีย์ เอกปนิธานพงศ์, T. Itami และ จิราพร เกษรจันทร์. 2543 จ. ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ: I. เทคนิคในการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันโรคและองค์ประกอบเลือดในกุ้งกุลาดำ. **วารสารสงขลานครินทร์ ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี** 22 (ฉบับพิเศษ): 567-580.

_____. 2543 จ. ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ: I. เทคนิคในการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันโรคและองค์ประกอบเลือดในกุ้งกุลาดำ. **วารสารสงขลานครินทร์ ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี** 22 (ฉบับพิเศษ): 567-580. อ้างถึง Hose, J. E., G. E Martin, V. A. Nguyen, J. Lucus and T. Rusentein. 1987. Cytichemical features of shrimp hemocytes. **Biol. Bull. Mar. Biol. Lab. Woods. Hole.** 173 (1): 178-187.

_____. 2543 จ. ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ: I. เทคนิคในการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันโรคและองค์ประกอบเลือดในกุ้งกุลาดำ. **วารสารสงขลานครินทร์ ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี** 22 (ฉบับพิเศษ): 567-580. อ้างถึง Johansson, M. W. and K. Soderhall. 1985. Exocytosis of the prophenoloxidase activating system from crayfish hemocytes. **J. Comp. Physiol.** 156: 175-181.

_____. 2543 จ. ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ: I. เทคนิคในการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันโรคและองค์ประกอบเลือดในกุ้งกุลาดำ. **วารสารสงขลานครินทร์ ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี** 22 (ฉบับพิเศษ): 567-580. อ้างถึง Smith, V. J. and K. Soderhall. 1983. β -1, 3-glucan activation of crustacean hemocytes *in vitro* and *in vivo*. **Biol. Bull.** 164: 299-314.

- กิจการ ศุภมาตย์, อุษณีย์ เอกปนิธานพงศ์, T. Itami และ จิราพร เกษรจันทร์. 2543 จ. ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ: I. เทคนิคในการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันโรคและองค์ประกอบเลือดในกุ้งกุลาดำ. **วารสารสงขลานครินทร์ ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี** 22 (ฉบับพิเศษ): 567-580. อ้างถึง Soderhall, K. 1982. Prophenoloxidase activating system and melanization a recognition mechanism of arthropods. A review. **Dev. Comp. Immunol.** 6: 601-611.
- _____. 2543 จ. ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ: I. เทคนิคในการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันโรคและองค์ประกอบเลือดในกุ้งกุลาดำ. **วารสารสงขลานครินทร์ ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี** 22 (ฉบับพิเศษ): 567-580. อ้างถึง Soderhall, K., A. Aspan and B. Duvic. 1990. The proPO system and associated proteins: Role in cellular communication in arthropods. **Res. Immunol.** 141: 896-907.
- _____. 2543 จ. ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ: I. เทคนิคในการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันโรคและองค์ประกอบเลือดในกุ้งกุลาดำ. **วารสารสงขลานครินทร์ ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี** 22 (ฉบับพิเศษ): 567-580. อ้างถึง Sung, H. H., Y. L. Yung and Y. L. Song. 1996. Enhancement of microbicidal activity in the black tiger prawn *Penaeus monodon* via immunostimulation. **J. Crust. Biol.** 16 (2): 278-284.
- _____. 2543 จ. ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ: I. เทคนิคในการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันโรคและองค์ประกอบเลือดในกุ้งกุลาดำ. **วารสารสงขลานครินทร์ ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี** 22 (ฉบับพิเศษ): 567-580. อ้างถึง Unestam, T. and K. Soderhall. 1977. Soluble fragments from fungal cell walls elicit defence reactions in crayfish. **Nature** 267: 45-46.
- ชลอ ลิมสุวรรณ. 2528. **โรคปลา**. ภาควิชาชีววิทยาประมง, คณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- นนทวิทย์ อารีชัยชน. 2545. **เอกสารประกอบการสอนวิชาการใช้ยาและสารเคมีในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ**. ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นิเวศน์ เรื่องพานิช. 2529. **วิธีการเพาะฟักกุ้งทะเล**. สถาบันเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง จังหวัดสงขลา. กรมประมง, กรุงเทพฯ.

ประจวบ หล้าอุบล และ สุนันท์ ภัทรจินดา. 2531. **การเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ**. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล. คณะประมง. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

มณจันทร์ เหมชน. 2540. การใช้จุลินทรีย์ในบ่อเลี้ยงกุ้ง, น. 70-72. ใน **การสัมมนาและนิทรรศการทางวิชาการ งานวันกุ้งจันทร์ 40**. กรมประมง, กรุงเทพฯ.

มณจันทร์ เหมชน และ กมลพร มาแสวง. 2543. ศักยภาพของแบคทีเรียที่มีประโยชน์บางชนิดในการยับยั้งแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ที่ทำให้เกิดโรคเรืองแสง, น. 259-268. ใน **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38**. กรุงเทพฯ.

มฤดี สิทธิพันธ์, อรัญ หันพงษ์กิตติกุล และ กิจการ สุขมาตย์. 2543. สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันและการใช้วัคซีนในกุ้งกุลาดำ: I. การสกัดสารเบต้ากลูแคนจากยีสต์และการประยุกต์ใช้ในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius). **วารสารสงขลานครินทร์ ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22 (ฉบับพิเศษ): 653-662**.

_____. 2543. สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันและการใช้วัคซีนในกุ้งกุลาดำ : I. การสกัดสารเบต้ากลูแคนจากยีสต์และการประยุกต์ใช้ในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius). **วารสารสงขลานครินทร์ ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22 (ฉบับพิเศษ): 653-662**. อ้างถึง Knaap, W. V. D. 1993. Defence in Invertebrate in Biotol (Biotechnology by open learning). Butterworth-Heinemann LTD. Linnae Honsel, Jordan Hill., Oxford.

_____. 2543. สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันและการใช้วัคซีนในกุ้งกุลาดำ: I. การสกัดสารเบต้ากลูแคนจากยีสต์และการประยุกต์ใช้ในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius). **วารสารสงขลานครินทร์ ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22 (ฉบับพิเศษ): 653-662**. อ้างถึง Manners, D. J., A. J. Masson and J. C. Patterson. 1973. The structure of β -(1,3)-D-glucan from yeast cell walls. **Biochem. J.** 135: 19-30.

มฤดี สิทธิพันธ์, อรัญ หันพงษ์กิตติกุล และ กิจการ สุขมาตย์. 2543. สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันและการใช้วัคซีนในกุ้งกุลาดำ : I. การสกัดสารเบต้ากลูแคนจากยีสต์และการประยุกต์ใช้ในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius). วารสารสงขลานครินทร์ ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22 (ฉบับพิเศษ): 653-662. อ้างถึง Sung, H. H., G. H. Kou and Y. L. Song. 1994. Vibriosis resistance induced by glucan treatment in the tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Fish Pathol. 29 (1): 11-17.

มะลิ บุญยรัตผลิน, กิจการ สุขมาตย์, จุอะดี พงศ์มณีรัตน์, สิทธิ บุญยรัตผลิน และ Y. Toride. 2543. สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันและการใช้วัคซีนในกุ้งกุลาดำ: IV. ผลของเปปติโดกลัยแคนโมเลกุลใหญ่และเล็กต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ. วารสารสงขลานครินทร์ ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22 (ฉบับพิเศษ): 689-696.

วรรณิภา เพ็ชรภักตร์. 2539. การใช้แบคทีเรียเสริมในอาหารกุ้ง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

วลัยพร ทิมบุญธรรม. 2544. การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ลิลา เรืองแป้น. 2545. ปัญหาสารปฏิชีวนะกับการเพาะเลี้ยงกุ้ง. วารสารการประมง 55 (3): 203-208.

ลิลา เรืองแป้น, วารินทร์ ธนาสมหวัง และ กุลวรา แสงรุ่งเรือง. 2540. แบคทีเรียในกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในบ่อระบบพัฒนา, น. 3-10. ใน การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 35, 3-5 กุมภาพันธ์ 2540.

ศุภชัย ประพัศพร และ ลิลา เรืองแป้น. 2540. แบคทีเรียฟลอราในดินบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ, น. 133-144. ใน รายงานการประชุมสัมมนาทางวิชาการสถาบันเทคโนโลยีราชมงคล ครั้งที่ 14, 26-29 มกราคม 2546. โรงแรมพาววิลเลียมและวิทยาเขตภาคใต้ จ.สงขลา.

เศรษฐเกียรติ กระจ่างวงษ์, สุพจน์ วัฒนพงศ์ชาติ และ ธนพงศ์ อินทรธนู. 2533. การศึกษาเชื้อแบคทีเรียในอวัยวะภายในของพ่อแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สมปอง หิรัญรัตน์. 2545. การติดตามเฝ้าระวังและมาตรการควบคุมปัญหาสารตกค้างในการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. วารสารการประมง 55 (3): 255-258.

อัครเดช แก้ววิเชียร. 2545. โพรไบโอติก: ทางเลือกเพื่อแก้ปัญหาการตกค้างยาต้านจุลชีพในกุ้ง. LAB. TODAY (4): 37-40.

Archibald, A.R. 1989. The *Bacillus* Cell Envelop, pp. 217-254. In C.R. Harwood, ed. *Bacillus*. Plenum Press, London.

Austin, B. and D. A. Austin. 1987. **Bacterial fish pathogens: disease in farmed and wild fish.** Wiley, New York.

Bachere, E., E. Mialhe and J. Rodriguez. 1995. Identification of defence effectors in the haemolymph of crustaceans with particular reference to the shrimp *Penaeus japonicus* (Bate): prospects and applications. **Fish & Shellfish Immunol.** 5: 597-612.

Bauman, R.W. 2004. **Microbiology.** Pearson Benjamin Cummings, San Francisco.

Baumann, P. and L. Baumann. 1981. The marine gram negative eubacteria: Genera *Phorobacterium, Beneckea, Alteromonas, Pseudomonas* and *Alcaligenes*, pp. 1303- 1331. In M.P. Starr, H. Stolp, H.G. Taper, A. Balows and H.G. Schlegel, eds. **The Prokaryotes.** Springer, Berlin.

Baumann, P., L. Baumann and M. Mandell. 1971. Taxonomy of marine bacteria: the genus *Beneckea*. **J. Bacteriol.** 107: 268-294.

- Bell, K. L. and V. J. Smith. 1993. *In vitro* superoxide production by hyaline cells of the shore crab *Carcinus maenas* (L.). **Dev. Comp. Immunol.** 17: 211-219.
- Berkeley, R. C. W., N. A. Logan, L. A. Shute, A. G. Capey. 1984. Identification of *Bacillus* Species. **Methods in Microbiol.** 16: 291-328.
- Bernet, M. F., D. Brassart, J. R. Neeser and A. L. Servin. 1994. *Lactobacillus acidophilus* LA 1 binds to cultured human intestinal cells and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. **Gut** 35: 483-489.
- Blomberg, L., A. Henriksson and P. L. Conway. 1993. Inhibition of adhesion of *Escherichia coli* K88 to piglet ileal mucus by *Lactobacillus* spp. **Environ. Microbiol.** 59: 34-39.
- Bonde, G. J. 1981. *Bacillus* from marine habitats : Allocation to phenotypes established by numerical techniques, pp. 181-215. In R. C. W. Berkeley and M. Goodfellow, eds. **The Aerobic Endospore-Forming Bacteria : Classification and Identification.** Academic Press, London.
- Boyd, C. D., W. D. Hollerman, J. A. Plum and M. Saeed. 1984. Effect of treatment with a commercial bacterial suspension on water quality of channel catfish pond. **Prog. Fish-Cult.** 46: 36-40.
- Bruno, M. E. C. and T. J. Montville. 1993. Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.** 59: 3003- 3010.
- Buchanan, R.E., N.E. Gibbons, S.T. Cowan, J.G. Holt, J. Liston, R.G.E. Murray, C.F. Niven, A.W. Rawlin and R.Y. Stanier. 1974. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.** 8th ed. The William and Wikins Co., Baltimore.

- Carmignani, G. M. and J. P. Bennett. 1977. Rapid start-up of a biological filter in a closed aquaculture system. **Aquaculture** 11: 85–88.
- Chen, J. C. and S. Y. Cheng. 1993. Studies on hemocyanin and haemolymph protein levels of *Penaeus japonicus* based on sex, size and moulting cycle. **Comp. Biochem. Physiol.** 106: 293-296.
- Chiayuvareesajja, S. and C. D. Boyd. 1993. Effect of zeolite, formalin, bacterial augmentation and aeration on total ammonia nitrogen concentrations. **Aquaculture**. 116: 33–45.
- Colwell, R.R. 1984. **Vibrios in the environment**. Wiley, New York.
- Cowan, S. T. 1975. **Cowan and Steel's Manual for Identification of Media Bacteria**. Cambridge Univ. Press, London.
- de la Pena, L.D., T. Tamaki, K. Momoyama, T. Nakai, K. Muroga. 1993. Characteristics of the causative bacterium of vibriosis in the kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. **Aquaculture** 115:1–12.
- Dijkgraaf, G.J.P., H. Li and H. Bussey. 2002. Cell wall β -glucans of *Saccharomyces cerevisiae*, pp. 179-213. In S. De Baets, E.J. Vandamme and A. Steinbüchel, eds. **Biopolymers : Polysaccharides II. Polysaccharides from Eukaryotes**. Wiley-VCH, Weinheim.
- Dikkeboom, R., J. M. G. H Tijnagel, E. C. Mulder and W. P. W. Knaap. 1987. Hemocytes of the pond snail *Lymnaea stagnalis* generate reactive forms of oxygen. **J. Invertebr. Pathol.** 49: 321-331.

- Devaraja, T. N., S. K. Otta, G. Shubha, I. Karunasagar, P. Tauro and I. Karunasagar. 1998. Immunostimulant of shrimp through oral administration of *Vibrio* bacterin and yeast glucan, pp. 167-170. In Flegel, T. W., ed. **Proceeding to the Special Session on Shrimp Biotechnology 5th Asian Fisheries Forum**. Advances in Shrimp Biotechnology. Chiangmai, Thailand.
- Djangmah, J. S. 1970. The effects of feeding and starvation on copper in the blood and hepatopancreas and on blood proteins of *Crangon vulgaris* (Fabricius). **Comp. Biochem. Physiol.** 32: 709-731.
- Egidius, E. 1987. Vibriosis: pathogenicity and pathology. A review. **Aquaculture** 67: 15-28.
- Fontaine, C. T. and D. V. Lightner. 1974. Observations on the phagocytosis and elimination of carmine particles injected into the abdominal musculature of the white shrimp, *Penaeus setiferus*. **J. Invertebr. Pathol.** 24: 141-148.
- Fuller, R. 1992. **Probiotics**. The Scientific Basis. Chapman and Hall, London.
- Fuller, R. and A. Turvy. 1971. Bacteria associated with the intestinal wall of the fowl *Gallus domesticus*. **J. Appl. Bact.** 34: 617-622.
- Gibson, G.R., J. M. Saavendra, S. MacFarlane and G. T. MacFarlane. 1997. Probiotics and intestinal infections. In R. Fuller, ed. **Probiotics 2, Application and Practical Aspects**. Chapman and Hall, London.
- Gillespie, J. P., M. R. Kanost and T. Trenczek. 1997. Biological mediators of insect immunity. **Ann. Rev. Entomol.** 42: 611-643.
- Goldenberg, P. Z., E. Huebner and A. H. Greenberg. 1984. Activation of lobster hemocytes for phagocytosis. **J. Invertebr. Pathol.** 43: 77-88.

- Gomez-Gil, B., M.A. Herrera-Vega, F.A. Abreu-Grobois and A. Roque. 1998. Bioencapsulation of two different *Vibrio* species in nauplii of the brine shrimp (*Artemia franciscana*). **Appl. Environ. Microbiol.** 64: 2318–2322.
- Gram, L., J. Melchiorson, B. Spanggaard, I. Huber and T. Nielsen. 1999. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* strain AH2-a possible probiotic treatment of fish. **Appl. Environ. Microbiol.** 65: 969–973.
- Gunnarsson, S. G. S. and A. M. Lackie. 1985. Haemocyte aggregation in *Schistocera gregaria* and *Periplaneta americana* as a response to injected substances of microbial origin. **J. Invertebr. Pathol.** 46: 312-319.
- Heidrich, C. and W. Vollmer. 2002. Murein (Peptidoglycan), pp. 431-463. In E.J. Vandamme, S. De Baets and A. Steinbüchel, eds. **Biopolymers : Polysaccharides I. Polysaccharides from Prokaryotes.** Wiley-VCH, Weinheim.
- Hjelm, M., O. Bergh, A. Riaza, J. Nielsen, J. Melchiorson, S. Jensen, H. Duncan, P. Ahrens, H. Birkbeck and L. Gram. 2004. Selection and Identification of Autochthonous Potential Probiotic Bacteria from Turbot Larvae (*Scophthalmus maximus*) Rearing Units. System. **Appl. Microbiol.** 27: 360–371.
- Hoffmann, J. A., J. M. Reichhart and C. Hetru. 1996. Innate immunity in higher insects. **Curr. Opin. Immunol.** 8: 8-13.
- Hoffmann, J. A., F. C. Kafatos, C. A. Jr. Janeway and R. A. B. Ezekowitz. 1999. Phylogenetic perspectives in innate immunity. **Science** 248: 1313-1318.
- Hoshino T., K. Ishizaki, T. Sakamoto, H. Kumeta, I. Yumoto, H. Matsuyama and S. Ohgiya. 1997. Isolation of a *Pseudomonas* species from fish intestine that produces a protease active at low temperature. **Lett. Appl. Microbiol.** 25: 70–72.

- Inglis, V., R. J. Roberts and N. R. Bromage. 1993. **Bacterial Diseases of Fish**. Institute of Aquaculture. The University Press, Cambridge.
- Irianto, A. and B. Austin. 2002. Probiotics in aquaculture (review). **J. Fish Dis.** 25: 633-642.
- Itami, T., Y. Takahashi, E. Tsuchihira and H. Igusa. 1994. Enhancement of disease resistance of kuruma prawn, *Penaeus japonicus*, and increase in phagocytic activity of prawn hemocytes after oral administration of β -1,3-glucan (Schizophyllan), pp. 375-378. In L.M. Chou, A.D. Munro, T. J. Lam, T. W. Chen, L. K. K. Cheong, J. K. Ding, K. K. Hooi, H. W. Khoo, V. P. E. Phang, K. F. Shim, C. H. Tan, eds. **The Third Asian Fisheries Forum**. Asian Fisheries Society, Manila, Philippines.
- Iwanaga, S. 1993. The limulus clotting reaction. **Curr. Opin. Immunol.** 5: 74-82.
- Jock, S., B. Volsch, L. Mansvelt and K. Geider. 2002. Characterization of *Bacillus* strains from apple and pear trees in South Africa antagonistic to *Erwinia amylovora*. **FEMS Microbiol. Lett.** 211: 247-252.
- Johnson, P. T. 1987. A review of fixed phagocytic and pinocytic cells of decapod crustaceans, with remarks on hemocytes. **Dev. Comp. Immunol.** 11: 679-704.
- Karunasagar, I., S.K. Otta and I. Karunasagar. 1996. Biofilm formation by *Vibrio harveyi* on surfaces. **Aquaculture** 140: 241-245.
- Koizumi, N., M. Imamura, T. Kadotani, K. K. Yaoi, H. Iwahana and R. Sato. 1999. The lipopolysaccharide-binding protein participating in hemocyte nodule formation in the silkworm *Bombyx mori* is a novel member of the C-type lectin superfamily with two difference tandem carbohydrate-recognition domains. **FEBS Lett.** 443: 139-143.

- Krovacek, K., A. Faris, W. Ahne and I. Mansson. 1987. Adhesion of *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio anguillarum* to fish cells and to mucuscoated glass slides. **FEMS Microbiol. Lett.** 42: 85–89.
- Lanz, H., V. Tsutsumi and H. Arechiga. 1993. Morphological and biochemical characterization of *Procambarus clarki* blood cells. **Dev. Comp. Immunol.** 17: 389-397.
- Lavilla-Pitogo, C.R., M.C.L. Baticados, E.R. Cruz-Lacierda and L.D. de la Pena. 1990. Occurrences of luminous bacterial diseases of *Penaeus monodon* larvae in the Philippines. **Aquaculture** 87: 237-242.
- Lee, M., G.T. Taylor, V.M. Bricelj, S.E. Ford and S. Zahn. 1996. Evaluation of *Vibrio* spp. and microplankton blooms as causative agents of juvenile oyster disease in *Crassostrea virginica* Gmelin. **J. Shellfish Res.** 15: 319–329.
- Lee, S. Y. 2001. Initiation of innate immune responses in the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. Acta Universitatis Upsalensis. **Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology.**
- Lemos, M. L., C. P. Dopazo, A. E. Toranzo and J. L. Barja. 1991. Competitive dominance of Antibiotic producing marine bacteria in mixed cultures. **J. Appl. Bacteriol.** 71: 228–232.
- Lewis, W. M. and D. P. Morris. 1986. Toxicity of nitrite to fish: a review. **Trans. Am. Fish. Soc.** 115: 183–195.
- Lightner, D.V. 1988. *Vibrio* disease, pp. 42–47. In C.J. Sindermann, D.V. Lightner, eds. **Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture and Fisheries Science**, vol. 6, Elsevier, Amsterdam.

- Lowry, O.H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193: 265-275.
- Maeda, M., K. Nogami, M. Kanematsu and K. Hirayama. 1997. The concept of biological control methods in aquaculture. **Hydrobiologia** 358: 285–290.
- Martin, G. G., D. Poole, C. Poole, J. E. Hose, M. Arias, L. Reynolds, N. Mckrell and A. Whang. 1993. Clearance of bacteria injected into the hemolymph of the Penaeid shrimp, *Sicyonia ingentis*. **J. Invertebr. Pathol.** 62: 308-315.
- Montes, A. J. and D. G. Pugh. 1993. The use of probiotics in food-animal practice. **Vet. Med.** 88: 282–288.
- Moriarty, D.J.W. 1998. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. **Aquaculture** 164: 351–358.
- Muroga, K. 1995. Viral and bacterial diseases in larval and juvenile marine fish and shellfish: a review. **Fish Pathol.** 30: 71–85.
- Nair, S., K. Tsukamoto and U. Shimidu. 1985. Distribution of bacteriolytic bacteria in the coastal marine environments of Japan. **Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.** 51: 1469–1473.
- Olsson, J. C., A. Westerdahl, P. Conway and S. Kjelleberg. 1992. Intestinal colonization potential of turbot (*Scophthalmus maximus*) and dab (*Limanda limanda*) associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*. **Appl. Environ. Microbiol.** 58: 551–556.

- Onarheim, A. M. and J. Raa. 1990. Characteristics and possible biological significance of an autochthonous flora in the intestinal mucosa in sea-water fish, pp. 197–201. In R. L. Sel, ed. **Microbiology in poecilothersms**. Proceedings of the International Symposium on Microbiology in Poecilothersms. Elsevier Science Publishers B.V., Paris, France.
- Parazzolo, L. M. and M. A. Barracco. 1997. The prophenoloxidase activating system of the shrimp *Penaeus paulensis* and associated factor. **Dev. Comp. Immunol.** 21 (5): 385-395.
- Parker, R.B. 1974. Probiotics, the other half of the antibiotic story. **Animal Nutrition and Health** 29: 4–8.
- Perfettini, J. and M. Bianchi. 1990. The comparison of two simple protocols designed to initiate and stimulate ammonia oxidation in closed aquaculture systems. **Aquaculture** 88: 179–188.
- Phianphak, W., S. Piyatirativarakul, P. Menasveta and S. Rengpipat. 1997. Use of Probiotics in *Penaeus monodon*. In 2nd **Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference 1997**, abstract of poster session. Phuket, Thailand.
- Priest, F.G. 1989. Isolation and Identification of Aerobic Endospore-Forming Bacteria, pp. 27-56. In C.R. Harwood, ed. **Bacillus**. Plenum Press, New York.
- Prieur, D. 1981. Experimental studies of trophic relationships between bacteria and bivalve molluscs. **Kiel. Meeresforsch. Sonderh.** 5: 376–383.
- Pybus, V., M. W. Loutit, I. L. Lamont and J. R. Tagg. 1994. Growth inhibition of the salmon pathogen *Vibrio ordalii* by a siderophore produced by *Vibrio anguillarum* strain VL4335. **J. Fish Dis.** 17: 311–324.

- Ramesh, A. and V.K. Venugopalan. 1989. Response of enteric luminous bacteria to environmental conditions in the gut of the fish. **J. Appl. Bacteriol.** 66: 529– 533.
- Reid, R. T., D. H. Live, D. J. Faulkner and A. Butler. 1993. A siderophore from a marine bacterium with an exceptional ferric ion affinity constant. **Nature** 366: 455–458.
- Rengpipat, S., S. Rukpratanporn, S. Piyatiratvarakul and P. Menasveta. 1998 a. Probiotic in Aquaculture : A case study of probiotic for larvae of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). pp. 177-181. In T.W. Flegel, ed. **National Center for Genetic Engineering and Biotechnology**. Advance in Shrimp Biotechnology, Bangkok.
- Rengpipat, S., W. Phianphak., S. Piyatiratvarakul and P. Menasveta. 1998 b. Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. **Aquaculture** 167: 301-313.
- Rengpipat, S., S. Rukpratanporn, S. Piyatiratvarakul and P. Menasveta. 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). **Aquaculture** 191: 271-288.
- Rico-Mora, R., D. Voltolina and J. A. Villaescusa-Celaya. 1998. Biological control of *Vibrio alginolyticus* in *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae) cultures. **Aquacult. Eng.** 19: 1–6.
- Ring, E. and F. J. Gatesoupe. 1998. Lactic acid bacteria in fish: a review. **Aquaculture** 160: 177–203.
- Roach, S. and G.W. Tannock. 1980. Indigenous bacteria that influence the number of *Salmonella typhimurium* in the spleen. **J. Fish Dis.** 25: 633–642.

- Robertson, P.A.W., C. O'Dowd, C. Burrells, P. Williams and B. Austin. 2000. Use of *Carnobacterium* sp. as a probiotic for Atlantic salmon *Salmo salar* L. and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* Walbaum. **Aquaculture** 185: 235–243.
- Ruby, G.E. and K. H. Nelson. 1978. Seasonal changes in the species composition of luminous bacteria in nearshore seawater. **Limnol. Oceanogr.** 23: 530–531.
- Sakai, M. 1999. Current research status of fish immunostimulants. **Aquaculture** 172: 63–92.
- Salminen S., E. Isolauri and E. Salminen. 1997. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. **Antonie van Leeuwenhoek** 70: 347–358.
- Salminen S., A. Ouwehand, Y. Benno and Y.K. Le. 1999. Probiotics: how should they be defined?. **Trends in Food Science and Technology** 10: 107–110.
- Scura, E. D. 1995. Dry seasons production problems on shrimp farms in Central America and the Caribbean Basin, p. 200–213. In C. L. Browdy and J. S. Hopkins, ed. **Swimming through troubled water**. Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture '95. World Aquaculture Society, Baton Rouge, La.
- SEAFDEC. 1988. **Biology and culture of *Penaeus monodon*, brackish water**. Aquaculture Information System. Aquaculture Department. Tigbauan, Philippines.
- Shivappa, R.B. and P. Chanratchakool. 1997. Efficiency of probiotics and disinfectant in controlling *Vibrio harveyi* in *Penaeus monodon* larvae under normal and stress conditions. **Proceedings of the Seminar on Biotechnology**. NSTDA, Bangkok.
- Sizemore, R.K. and J.W. Davis. 1985. Source of *Vibrio* spp. found in the hemolymph of the blue crab, *Callinectes sapidus*. **J. Invertebr. Pathol.** 46: 109–110.

- Sizemore, R.K., R.R. Colwell, H.S. Tubiash and T.E. Lovelace. 1975. Bacterial flora of the hemolymph of the blue crab, *Callinectes sapidus*: numerical taxonomy. **Appl. Microbiol.** 29: 393–399.
- Smith, V. J. and J.R.S Chisholm. 1992. Non-cellular immunity in crustaceans. **Fish & Shellfish Immunol.** 2 (1): 1-31.
- Smith, V. J., K. Soderhall and M. Hamilton. 1984. β -1, 3-glucan induced cellular defence reactions in the shore crab, *Carcinus maenas*. **Comp. Biochem. Physiol.** 77: 635-639.
- Smoragiewicz W., M. Bielecka, A. Babuchowski, A. Boutard and H. Dubeau. 1993. Les probiotiques. **Can. J. Microbiol.** 39: 1089–1095.
- Soderhall, K. and L. Cerenius. 1992. Crustacean immunity. **Annu. Rev. Fish Dis.** 2: 3-23.
- Soderhall, K. and L. Hall. 1984. Lipopolysacchride induced activation of prophenoloxidase activating system in crayfish hemocyte lysate. **Biochem. Biophys. Acta.** 797: 99-104.
- Spanggaard B., I. Huber, J. Nielsen, E. B. Sick, C. B. Pipper, T. Martinussen, W.J. Slierendrecht. and L. Gram. 2001. The probiotic potential against vibriosis of the indigenous microflora of rainbow trout. **Environ. Microbiol.** 3: 755– 765.
- Sritunyalucksana, K., P. Sithisarn, B. Withayachumnarnkul and T. W. Flegel. 1999. Activation of prophenoloxidase, agglutinin and antibacterial activity in haemolymph of the black tiger prawn, *Penaeus monodon* by immunostimulants. **Fish & Shellfish Immunol.** 9 (1): 21-30.
- Stanier, R. Y., M. Doudoroff and E. A. Adelberg. 1963. **The microbial world.** Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, N.J.

- Stoffels, G., I. F. Nes and A. Gudmundsdottir. 1992. Isolation and properties of a bacteriocin-producing *Carnobacterium piscicola* isolated from fish. **J. Appl. Bacteriol.** 73:309-326.
- Strehler, B.L. 1953. Luminescence in Cell Free Extracts of Luminous Bacteria and its Activation by DPN. **J. AM. Chem. Soc.** 75: 1264-1265.
- Sugita H., C. Miyajima and H. Deguchi. 1991. The vitamin B12 producing ability of the intestinal microflora of freshwater fish. **Aquaculture** 92: 267–276.
- Sugita H., J. Takahashi and H. Deguchi. 1992. Production and consumption of biotin by the intestinal microflora of cultured freshwater fishes. **Biosciences, Biotechnology and Biochemistry** 56: 1678–1679.
- Sugita H., J. Kawasaki, J. Kumazawa and Y. Deguchi. 1996. Production of amylase by the intestinal bacteria of Japanese coastal animals. **Lett. in Appl. Microbiol.** 23: 174–178.
- Sugita, H., N. Matsuo, Y. Hirose, M. Iwato and Y. Deguchi. 1997. *Vibrio* sp. strain NM10, isolated from the intestine of a Japanese coastal fish, has an inhibitory effect against *Pasteurella piscida*. **Appl. Environ. Microbiol.** 63: 4986–4989.
- Sugita, H., R. Ueda, L.R. Berger and Y. Deguchi. 1987. Microflora in the gut of Japanese coastal Crustacea. **Nippon Suisan Gakk.** 53: 1647–1655.
- Sugumar, G., T. Nakai, Y. Hirata, D. Matsubara and K. Muroga. 1998. *Vibrio splendidus* Biovar II as the causative agent of bacillary necrosis of Japanese oyster *Crassostrea gigas* Larvae. **Dis. Aquat. Org.** 33: 111–118.
- Sunaryanto, A. and A. Mariam. 1986. Occurrence of a pathogenic bacteria causing luminescence in penaeid larvae in Indonesian hatcheries. **Bull. Brackishwater Aquacult. Dev. Cent.** 8: 64-70.

- Supamattaya, K., J. Kasornchadra and S. Boonyaratpalin. 1994. Comparative study of simple methods for the diagnosis of yellow head baculovirus in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Songklanakarín J. Sci. Technol.** 16 (1): 37-48.
- Supamattaya, K., J. Pongmaneerat and T. Klowklieng. 2000. The effect of β -glucan (MacroGard[®]) on growth performance, immune response and disease resistance in black tiger shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius. **Songklanakarín J. Sci. Technol.** 22: 677-688.
- Suphantharika, M., P. Khunrae, P. Thanardkit and C. Verduyn. 2003. Preparation of spent brewer's yeast β -glucans with a potential application as an immunostimulant for black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. **Bioresource Technol.** 88 (1): 55-60.
- Todar, K. 2003. **The Genus *Bacillus***. Available Source: <http://textbookofbacteriology.net/Bacillus.html>, January 24, 2005.
- Terry, T. 2001. **Phagocytosis and bacterial pathogens**. Available Source: <http://www.sp.uconn.edu/~terry/Common/phago053.html>, April 10, 2003.
- Tucker, C. S., R. Francis-Floyd and M. H. Bealeu. 1989. Nitrite-induced anemia in channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** 43: 295-310.
- Ueda, R., H. Sugita and Y. Deguchi. 1993. Microflora in the hemolymph of Japanese coastal Crustacea. **Nippon Suisan Gakk.** 59: 1637.
- Ueda, R., H. Sugita, Y. Deguchi and J. Kittaka. 1995. The intestinal microflora of the Japanese spiny lobster and other coastal animals. **Crustaceana** 68: 170-173.
- Vandenbergh, P. 1993. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. **FEMS Microbiol. Rev.** 12: 221-238.

- Vargas-Albores, F., J. Hernandez-Lopes, T. Gokkas-Galvan, K. Montano-Perez, F. Jimenes-Vega and G. Yepiz-Plascencia. 1998. Activation of shrimp cellular defence functions by microbial products. pp. 161-166. *In* Flegel, T. W., ed. **Proceeding to the Special Session on Shrimp Biotechnology 5th Asian Fisheries Forum**. Advances in Shrimp Biotechnology, Chiangmai, Thailand.
- Westerdahl, A., C. Olsson, S. Kjelleberg and P. Conway. 1991. Isolation and characterization of turbot (*Scophthalmus maximus*) associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*. **Appl. Environ. Microbiol.** 57: 2223–2228.
- Williams, S. T. and J. C. Vickers. 1986. The ecology of antibiotic production. **Microbial Ecol.** 12: 43–52.