ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ)

ปริญญา

เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ
สาขา	**ภาควิชา**

เรื่อง การใช้ *Bacillus* spp. เป็นโปรไบโอติกในการยับยั้งเชื้อ *Vibrio harveyi* และ การกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*, Boone)

Application of *Bacillus* spp. as Probiotics for the Inhibition of *Vibrio harveyi* and Immunostimulation in Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone)

นามผู้วิจัย นางสาวมินตรา ศีลอุดม

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

(รองศาสตราจารย์นนทวิทย์ อารีย์ชน, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เรืองวิชญ์ ยุ้นพันธ์, D.Tech.Sc.)

หัวหน้าภาควิชา .....

(ศาสตราจารย์อุทัยรัตน์ ณ นคร, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... **เดือน** ..... **พ.ศ.** .....

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การใช้ *Bacillus* spp. เป็นโปรไบโอติกในการยับยั้งเชื้อ *Vibrio harveyi* และ การกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*, Boone)

Application of *Bacillus* spp. as Probiotics for the Inhibition of *Vibrio harveyi* and Immunostimulation in Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone)

โดย

นางสาวมินตรา ศีลอุดม

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ)
พ.ศ. 2552

มินตรา ศีลอุดม 2552: การใช้ *Bacillus* spp. เป็นโปรไบโอติกในการยับยั้งเชื้อ *Vibrio harveyi* และการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*, Boone) ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ) สาขาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์นนทวิทย์ อารีย์ชน, Ph.D. 123 หน้า

การแยกและจำแนกชนิดของเชื้อ *Bacillus* spp. จากลำไส้ของกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*, Boone) ที่เลี้ยงในฟาร์มเอกชน พบเชื้อ *Bacillus* spp. จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ *B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. coagulans* และ *B. sphaericus* พบว่า *B. licheniformis* ให้ผลในการยับยั้งเชื้อ *Vibrio harveyi* เมื่อทดสอบด้วยวิธี cross streak และ *B. licheniformis*, *B. subtilis* และ *B. sphaericus* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *V. harveyi* ในการทดสอบด้วยวิธี co-culture ในน้ำทะเลความเค็ม 20 ppt โดยสามารถลดปริมาณเชื้อ *V. harveyi* ลงได้ คิดเป็น ร้อยละ 67.86, 58.59 และ 78.12 ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจาก *Bacillus* sp. ชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

การทดลองใช้สปอร์ของ *B. licheniformis* และ *B. subtilis* ผสมอาหารเป็นโปรไบโอติกเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม พบว่าที่ระยะเวลา 30 วัน การใช้ *B. licheniformis* เพียงชนิดเดียวที่ระดับความเข้มข้น 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีผลทำให้องค์ประกอบทางภูมิคุ้มกันส่วนใหญ่ ทั้งปริมาณเม็ดเลือดรวม กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase กิจกรรมของเม็ดเลือดในการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม (Percent phagocytosis) และกิจกรรมของน้ำเลือดในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย (bactericidal activity) สูงกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ และแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อหยุดให้อาหารผสมโปรไบโอติก ระดับภูมิคุ้มกันส่วนใหญ่จะลดลง ยกเว้น ค่า percent phagocytosis ส่วนผลในการยับยั้งเชื้อ *Vibrio* spp. ในลำไส้ของกุ้ง พบว่า กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติกในทุกชุดการทดลองมีจำนวนเชื้อ *Vibrio* spp. ในลำไส้น้อยกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อทดลองให้อาหารผสม *B. licheniformis* ความเข้มข้น 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ทุกวัน และวันเว้นวัน พบว่าระดับภูมิคุ้มกันของทั้งสองชุดการทดลองไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ยกเว้นค่า bactericidal activity ของชุดการทดลองที่ให้อาหารผสมโปรไบโอติก ทุกวัน มีค่าสูงกว่าชุดการทดลองที่ให้อาหารผสมโปรไบโอติกวันเว้นวัน จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า การใช้ *B. licheniformis* ระดับความเข้มข้น 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เป็นโปรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม ให้ผลดีในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และลดปริมาณเชื้อ *Vibrio* spp. ในลำไส้ โดยสามารถให้วันเว้นวันได้ แต่ควรให้ต่อเนื่องตลอดการเลี้ยง

_____ / _____ / _____

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Mintra Seel-audom 2009: Application of *Bacillus* spp. as Probiotics for the Inhibition of *Vibrio harveyi* and Immunostimulation in Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone). Master of Science (Aquaculture), Major Field: Aquaculture, Department of Aquaculture. Thesis Advisor: Associate Professor Nontawith Areechon, Ph.D. 123 pages.

Isolation and identification of *Bacillus* spp. from intestine of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone) from commercial farms yielded five species of *Bacillus* including *B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. coagulans* and *B. sphaericus*. Inhibition activity of *B. licheniformis* over *Vibrio harveyi* by cross streak method was detected. While co-culture method in 20 ppt sea water indicated the reduction of *V. harveyi* at 67.86, 58.59 and 78.12% by *B. licheniformis*, *B. subtilis* and *B. sphaericus*, respectively which were significantly different from other *Bacillus* spp. ($P<0.05$).

Supplementation of spore form of *B. licheniformis* and/or *B. subtilis* as probiotics in Pacific white shrimp diet was conducted to investigate the effects on immunity. After one month of feeding trial, diet with *B. licheniformis* at 5 g/kg could significantly enhance the total haemocyte count, phenoloxidase activity, percent phagocytosis and bactericidal activity ($P<0.05$). But after feeding with normal diet for 20 days, most immune parameters were not significantly different ($P>0.05$) except the percent phagocytosis. All probiotics shrimp had significantly lower number of *Vibrio* spp. in the intestine than the control ($P<0.05$). The frequency of probiotics application in Pacific white shrimp was conducted. There were no significant differences of most immune parameters between shrimp fed with probiotics diet every day and once in two days ($P>0.05$) except the bactericidal activity in which the every day group was higher. This study clearly indicated the benefits of *B. licheniformis* as probiotics in shrimp diet in term of immunostimulation and inhibition of pathogenic bacteria. It also revealed that *B. licheniformis* was an effective probiont when applied at 5 g/kg in Pacific white shrimp diet for once in two days throughout the culture period.

_____ _____ ___ / ___ / ___

Student's signature Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.นนทวิทย์ อารีย์ชน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่ให้คำปรึกษาในด้านการเรียน การค้นคว้าวิจัย ตลอดจนเป็นกำลังใจ เป็นแรงบันดาลใจ ในการดำเนินชีวิต และเป็นแบบอย่างในความตั้งใจ มุมานะในการทำงาน พร้อมทั้งช่วยเหลือ สนับสนุนและส่งเสริมความก้าวหน้าทางด้านการศึกษา ให้ผู้วิจัยได้มีโอกาสที่ดีในชีวิตมากขึ้น รวมทั้งให้คำแนะนำตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. เรืองวิชญ์ ยุ้นพันธ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำในการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความถูกต้องสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ผศ.ดร. วราห์ เทพาหุดี ประธานการสอบขั้นสุดท้าย ดร. สุดา ตัณฑวณิช ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ในการสอบปากเปล่าขั้นสุดท้าย รองศาสตราจารย์ส่งศรี มหาสวัสดิ์ ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัยในการสอบประมวลความรอบรู้ และขอกราบขอพระคุณอาจารย์ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทุกท่าน ที่ได้อบรมสั่งสอน และมอบความรู้อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง

ขอขอบคุณเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งขาว ที่ให้ความเอื้อเฟื้อในการเก็บตัวอย่าง และสนับสนุนตัวอย่างกุ้งขาวในการวิจัย และขอขอบคุณเพื่อนพี่น้องสมาชิกห้องปฏิบัติการสุขภาพสัตว์น้ำที่คอยแนะนำ ช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง และมอบกำลังใจที่ดีมาตลอด จนงานวิจัยครั้งนี้เสร็จสมบูรณ์

ขอบคุณเพื่อนๆ SL 48 เพื่อนๆ เบญจมฯรุ่น109 เพื่อนพี่น้องชาวหอพักหญิงราชาวดี และเพื่อนๆ มีนกร 53 ที่คอยผลักดัน เป็นกำลังใจ อยู่เคียงข้างกัน และให้ความช่วยเหลือมาตลอดระยะเวลาที่ได้รู้จักกัน

ด้วยความดีหรือประโยชน์อันใดเนื่องจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ขอมอบแด่พ่อ แม่ ที่ได้ให้ชีวิต เลี้ยงดู อบรม ให้กำลังใจ และกำลังทรัพย์กับลูกคนนี้มาอย่างดีต่อเนื่องตลอดมา จนสำเร็จการศึกษา ขอบคุณน้องชายทั้งสาม และขออุทิศความดีอีกส่วนหนึ่งให้กั๋ง เทียน ศีลอุดม ที่ล่วงลับไปแล้ว ผู้ซึ่งเป็นบุคคลสำคัญยิ่งในการสนับสนุนการศึกษาของข้าพเจ้าตลอดมา

มินตรา ศีลอุดม

สิงหาคม 2552

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	26
อุปกรณ์	26
วิธีการ	31
ผลและวิจารณ์	47
ผลการทดลอง	47
วิจารณ์ผลการศึกษา	86
สรุปและข้อเสนอแนะ	94
สรุป	94
ข้อเสนอแนะ	95
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	96
ภาคผนวก	111
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	123

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ผลการทดสอบเชื้อ *Bacillus* sp. ที่แยกได้จากลำไส้ของกุ้งขาวแวนนาไม โดยศึกษาทางสัณฐานวิทยาและวิธีทางชีวเคมี	48
2	ปริมาณเชื้อ *V. harveyi* AQVH03 ที่เลี้ยงร่วมกับเชื้อ *Bacillus* sp. ชนิดต่าง ๆ	54
3	น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาว หลังจากให้อาหารโปรไบโอติก เป็นระยะเวลา 30 วัน	60
4	ปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมด (Total Hemocytes Count) ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก ในแต่ละชุดการทดลอง	62
5	กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก ในแต่ละชุดการทดลอง	65
6	Percent phagocytosis ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก ในแต่ละชุดการทดลอง	68
7	กิจกรรมของน้ำเลือดในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย (Bactericidal activity) ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก ในแต่ละชุดการทดลอง	71
8	ปริมาณเชื้อ *Bacillus* spp. ทั้งหมดในลำไส้ของกุ้งขาวแวนนาไม หลังจากให้อาหารผสมโปรไบโอติกที่ชนิดและระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 30 วัน และหลังจากหยุดให้อาหารผสมโปรไบโอติกเป็นระยะเวลา 20 วัน	72
9	ปริมาณเชื้อ *Vibrio* spp. ทั้งหมดในลำไส้กุ้งขาวแวนนาไม หลังจากให้อาหารผสมโปรไบโอติกที่ชนิดและระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 30 วัน และหลังจากหยุดให้อาหารผสมโปรไบโอติกเป็นระยะเวลา 20 วัน	74
10	น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาว หลังจากให้อาหารโปรไบโอติก เป็นระยะเวลา 30 วัน	76
11	ปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมด (Total Hemocytes Count) ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกทุกวัน และวันเว้นวัน ที่ระยะเวลาทุก ๆ 10 วัน	77
12	กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกทุกวัน และวันเว้นวัน ที่ระยะเวลาทุก ๆ 10 วัน	79
13	Percent phagocytosis ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกทุกวัน และวันเว้นวัน ที่ระยะเวลาทุก ๆ 10 วัน	81

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
14	กิจกรรมของน้ำเลือดในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย (Bactericidal activity) ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก ทุกวัน และวันเว้นวัน ที่ระยะเวลาทุก ๆ 10 วัน	82
15	ปริมาณเชื้อ *Bacillus* spp. ทั้งหมดในลำไส้ของกุ้งขาวแวนนาไม หลังจากให้อาหารผสมโปรไบโอติก วันเว้นวัน และทุกวัน เป็นระยะเวลา 30 วัน และหลังจากหยุดให้อาหารผสมโปรไบโอติกเป็นระยะเวลา 20 วัน	83
16	ปริมาณเชื้อ *Vibrio* spp. ทั้งหมดในลำไส้กุ้งขาวแวนนาไม หลังจากให้อาหารผสมโปรไบโอติก วันเว้นวัน และทุกวัน เป็นระยะเวลา 30 วัน และหลังจากหยุดให้อาหารผสมโปรไบโอติกเป็นระยะเวลา 20 วัน	85
17	ผลของการใช้อาหารผสมโปรไบโอติกที่ชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ เลี้ยงกุ้งขาวที่ระยะเวลา 30 วัน ต่อองค์ประกอบภูมิคุ้มกันต่าง ๆ	92

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	การเขี่ยเชื้อเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* โดยวิธี cross streak	35
2	PCR product ของ BLF และ BSU เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค Gel electophoresis ปรากฏแถบ PCR product บนเจลมีขนาดประมาณ 1,500 bp	49
3	เปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16s rRNA ของ BLF กับแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ในฐานข้อมูลด้วย BlastN programs	50
4	เปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16s rRNA ของ BSU กับแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ในฐานข้อมูลด้วย BlastN programs	50
5	การยับยั้งเชื้อ *Vibrio harveyi* (inhibition) ของเชื้อ *Bacillus licheniformis* BLF และ *Bacillus licheniformis* BLS โดยวิธี cross streak	51
6	การเข้าครอบครองพื้นที่เชื้อ *Vibrio harveyi* (colonization) ของเชื้อ *Bacillus cereus* BCES และ *Bacillus sphaericus* BSP โดยวิธี cross streak	51
7	การเจริญของเชื้อ *Bacillus licheniformis* BLF และเชื้อ *Vibrio harveyi* AQVH03 ที่เลี้ยงเดี่ยว และเลี้ยงร่วมกันในน้ำทะเลความเค็ม 20 ppt	55
8	การเจริญของเชื้อ *Bacillus licheniformis* BLS และเชื้อ *Vibrio harveyi* AQVH03 ที่เลี้ยงเดี่ยว และเลี้ยงร่วมกันในน้ำทะเลความเค็ม 20 ppt	55
9	การเจริญของเชื้อ *Bacillus cereus* BCEF และเชื้อ *Vibrio harveyi* AQVH03 ที่เลี้ยงเดี่ยว และเลี้ยงร่วมกันในน้ำทะเลความเค็ม 20 ppt	56
10	การเจริญของเชื้อ *Bacillus cereus* BCES และเชื้อ *Vibrio harveyi* AQVH03 ที่เลี้ยงเดี่ยว และเลี้ยงร่วมกันในน้ำทะเลความเค็ม 20 ppt	56
11	การเจริญของเชื้อ *Bacillus coagulans* BCO และเชื้อ *Vibrio harveyi* AQVH03 ที่เลี้ยงเดี่ยว และเลี้ยงร่วมกันในน้ำทะเลความเค็ม 20 ppt	57
12	การเจริญของเชื้อ *Bacillus sphaericus* BSP และเชื้อ *Vibrio harveyi* AQVH03 ที่เลี้ยงเดี่ยว และเลี้ยงร่วมกันในน้ำทะเลความเค็ม 20 ppt	57
13	การเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* BSU และเชื้อ *Vibrio harveyi* AQVH03 ที่เลี้ยงเดี่ยว และเลี้ยงร่วมกันในน้ำทะเลความเค็ม 20 ppt	58

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
14	ปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมด (Total Hemocytes Count) ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก ในแต่ละชุดการทดลอง ที่ระยะเวลาทุก ๆ 10 วัน	63
15	กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก ในแต่ละชุดการทดลอง ที่ระยะเวลาทุก ๆ 10 วัน	66
16	Percent phagocytosis ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก ในแต่ละชุดการทดลอง ที่ระยะเวลาทุก ๆ 10 วัน	69
17	ปริมาณเชื้อ *Bacillus* count ทั้งหมดในลำไส้กุ้งขาวแวนนาไม หลังจากให้อาหารผสมโปรไบโอติก ที่ชนิดและระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 30 วัน และหลังจากหยุดให้อาหารผสมโปรไบโอติกเป็นระยะเวลา 20 วัน	73
18	ปริมาณเชื้อ *Vibrio* spp. ทั้งหมดในลำไส้กุ้งขาวแวนนาไม หลังจากให้อาหารผสมโปรไบโอติก ที่ชนิดและระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 30 วัน และหลังจากหยุดให้อาหารผสมโปรไบโอติกเป็นระยะเวลา 20 วัน	75
19	ปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมด (Total Hemocytes Count) ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกทุกวัน และวันเว้นวัน ที่ระยะเวลาทุก ๆ 10 วัน	77
20	กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก ทุกวัน และวันเว้นวัน ที่ระยะเวลาทุก ๆ 10 วัน	80
21	Percent phagocytosis ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก ทุกวัน และวันเว้นวัน ที่ระยะเวลาทุก ๆ 10 วัน	81
22	ปริมาณเชื้อ *Bacillus* count ทั้งหมดในลำไส้กุ้งขาวแวนนาไม หลังจากให้อาหารผสมโปรไบโอติก ทุกวัน และวันเว้นวัน ที่ระยะเวลา 30 วัน และ 50 วัน	84
23	ปริมาณเชื้อ *Vibrio* spp. ทั้งหมดในลำไส้กุ้งขาวแวนนาไม หลังจากให้อาหารผสมโปรไบโอติก ทุกวัน และวันเว้นวัน ที่ระยะเวลา 30 วัน และ 50 วัน	85

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่ **หน้า**

1 แผนที่ของ pGEM T-Easy cloning vector และ ตำแหน่ง Promoter และ Multiple cloning size 117

2 กราฟมาตรฐานโปรตีน (Bovine Serum Albumin) 122

การใช้ *Bacillus* spp. เป็นโปรไบโอติกในการยับยั้งเชื้อ *Vibrio harveyi* และ การกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*, Boone)

Application of *Bacillus* spp. as Probiotics for the Inhibition of *Vibrio harveyi* and Immunostimulation in Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone)

คำนำ

กุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*, Boone) เป็นกุ้งที่มีการเลี้ยงอย่างแพร่หลาย นับตั้งแต่มีการนำเข้ามาเลี้ยงทดแทนการเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่ประสบกับปัญหาโรคระบาด และการเจริญเติบโต ในช่วงหลายปีที่ผ่านมา ซึ่งนับเป็นจุดเริ่มต้นที่ส่งผลให้กุ้งขาวเป็นกุ้งเศรษฐกิจชนิดใหม่ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งของประเทศไทย เพื่อหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมีในการรักษา และป้องกันโรค และลดปัญหาการตกค้างของยาปฏิชีวนะ และคุณภาพการผลิต มีวิธีหนึ่งที่ได้รับความสนใจในปัจจุบันคือ การใช้แบคทีเรียโปรไบโอติกในสัตว์น้ำ ซึ่งโปรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์มีชีวิตที่ไม่ก่อให้เกิดโรค ช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน และช่วยป้องกันแบคทีเรียฉวยโอกาสและกลุ่มแบคทีเรียที่ไม่พึงปรารถนา (Moriarty, 1997) จึงมีการวิจัยพัฒนาสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพส่งเสริม การเจริญเติบโต และป้องกันการเกิดโรคระบาดมาใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลของประเทศ โดยแบคทีเรียที่มีการนำมาใช้มาก คือ แบคทีเรียในสกุล *Bacillus* spp. เนื่องจากแบคทีเรียในสกุลนี้มีความสามารถในการสร้างสปอร์ได้ มีชีวิตอยู่ในสภาพแวดล้อมได้นาน (Henriques and Moran, 2000; Nicholson *et al*., 2000) แบคทีเรียสกุล *Bacillus* spp. เป็นจุลินทรีย์ที่พบได้ทั่วไปที่เหงือก ผิวหนัง และทางเดินอาหารของกุ้ง (Sharmila *et al*., 1996) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการใช้ *Bacillus* เพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ (นิตยา และคณะ, 2549; วัชริยา, 2549; Rengpipat *et al*., 2000) โดยจุลินทรีย์ที่เหมาะสมในการเลือกนำมาใช้เป็นโปรไบโอติก ต้องมีประสิทธิภาพหลายประการด้วยกัน คือเป็นสายพันธุ์ที่ทนต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม เจริญได้ทุกสภาวะ มีความสามารถในการต่อต้านแบคทีเรียก่อโรค สามารถเจริญภายในตัวกุ้งและยึดเกาะผนังลำไส้ของกุ้งได้ และทำให้กุ้งมีความต้านทานโรค

ในการศึกษาครั้งนี้ เบื้องต้นจะทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่แยกได้จากลำไส้ของกุ้งขาวแวนนาไม และเลือกเฉพาะแบคทีเรียสกุล *Bacillus* spp. มาใช้ประโยชน์ในลักษณะเป็น

โปรไบโอติก โดยทำการศึกษาประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของกุ้งทะเลชนิด *Vibrio harveyi* และการนำมาใช้ในลักษณะของการผสมอาหารให้กุ้งกินเพื่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน

วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดแยกและจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกจากทางเดินอาหารของกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*, Boone)

2. ศึกษาประสิทธิภาพ และคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของเชื้อแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* ที่แยกได้จากลำไส้กุ้งขาวแวนนาไม ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของกุ้งทะเลชนิด *Vibrio harveyi*

3. ศึกษาชนิด ระดับความเข้มข้น และระยะเวลาการให้จุลินทรีย์โปรไบโอติก ที่เหมาะสมในการผสมอาหารเพื่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม

การตรวจเอกสาร

กุ้งขาวแวนนาไม

อนุกรมวิธานของกุ้งขาวแวนนาไม

กุ้งขาวแวนนาไม ถูกค้นพบโดย Boone ในปี ค.ศ. 1931 ชื่อวิทยาศาสตร์ของกุ้งชนิดนี้แต่เดิมไม่มีคำว่า “ Lito ” จะใช้เพียงคำว่า “ Penaeus ” ต่อมาในปี ค.ศ. 1997 Dr. Isabel Perez Farfante และ Dr. Brian Kensley ได้ลำดับอนุกรมวิธานของกุ้งชนิดนี้ โดยให้ใช้ชื่อเป็น *Litopenaeus vannamei*

อนุกรมวิธานของกุ้งขาวแวนนาไม (Perez Farfante and Kensley, 1997)

Phylum Arthropoda

Class Crustacea

Subclass Malacostraca

Order Decapoda

Suborder Natantia

Family Penaeidae

Genus *Litopenaeus*

Species *vannamei*

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Litopenaeus vannamei*

ลักษณะทั่วไปของกุ้งขาวแวนนาไม

ลักษณะทั่วไปของกุ้งสกุลนี้ คือ กรี (rostrum) มีความยาวปานกลาง มีฟันกรีด้านล่าง 2-4 อัน ในวัยอ่อนกรีจะยาวกว่า antennular peduncle และเมื่อโตขึ้นจะมีขนาดสั้นลง บางครั้งอาจมีความยาวเป็นครึ่งหนึ่งของปล้องที่ 2 หนวดคู่ที่ 1 (antennular) บริเวณ carapace มีหนวดคู่ที่ 2 (antenna) และ hepatic spine ชัดเจน ไม่พบ orbital spine และ pterygostomian spine ไม่มี postocular sulcus ส่วน postrostral carina มีหลายขนาด และในบางครั้งอาจพบว่ายาวถึงขอบด้านหลังของเปลือกคลุมหัว ไม่มี branchiocardiac carina, longitudinal sutres และ transverse sutures ลำตัวปล้องที่ 6 จะมีสันเรียงตัวตามขวางของลำตัวด้านบน (cicatrices) 3 อัน ร่องในแนวยาวลำตัวด้านบน (dorsolateral sulcus) แคบมาก หรืออาจไม่มี ส่วนหาง (telson) เรียบ หนวดคู่ที่ 1 (antennule) ไม่มี parapenaeid spine ส่วน antennular flagella สั้นกว่าส่วน carapace มาก แผ่นรยางค์ของ maxilla คู่ที่ 1 ยาว มี 3-4 ปล้อง ส่วนปลายเป็นเส้นเหมือน flagella ischial spine อยู่ปล้องที่ 1 และ basial spine ในปล้องที่ 2 ของขาเดิน (pereopod) คู่ที่ 1 (Perez Farfante and Kensley, 1997; จิราพร, 2547) ลักษณะที่สังเกตได้เด่นชัดของกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei* คือ สีของลำตัวเป็นสีขาว กรีด้านบนจะหยักและถี่ปลาย กรีตรง โดยที่มีฟันกรีด้านล่าง 2 อัน และด้านบน 8 อัน ความยาวของกรีจะยาวกว่าลูกตาไม่มาก และเห็นลำไส้ชัดเจนกว่ากุ้งอื่น ๆ (ภิญโญ, 2545) กุ้งชนิดนี้มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพน้ำ ตกใจง่าย ลักษณะพิเศษของกุ้งสายพันธุ์นี้ คือ สามารถปรับตัวเข้ากับสภาวะแวดล้อมภายใต้ระบบการเพาะเลี้ยงได้ โดยทำการเพาะเลี้ยงได้ทั้งในน้ำที่มีระดับความเค็ม 0-35 ppt แต่ระดับความเค็มที่เจริญเติบโตได้ดีคือ 10-22 ppt อุณหภูมิของน้ำในระดับที่เหมาะสมคือ 26-29 องศาเซลเซียส ซึ่งอาจทำการเพาะเลี้ยงได้ทั้งในบริเวณพื้นที่ชายฝั่งหรือบริเวณพื้นที่ที่เป็นเขตความเค็มต่ำ (ปิยะบุตร, 2546)

ถิ่นที่อยู่และการแพร่กระจายของกุ้งขาว

กุ้งขาว อาศัยอยู่ตามแนวชายฝั่ง บริเวณที่เป็นพื้นโคลน ลงไปจนถึงระดับความลึกประมาณ 72 เมตร หรือ 235 ฟุต พบตามบริเวณชายฝั่งมหาสมุทรแปซิฟิกตะวันออก จากตอนเหนือของประเทศเม็กซิโก เรื่อยลงมาตามแนวชายฝั่งทะเลโคลัมเบีย เปรู เวเนซูเอลา เบลิซ กัวเตมาลา อเมริกา และเปอร์โตริโก (Dore and Frimodt, 1987)

กุ้งขาว หรือ Pacific white shrimp หรือที่เรียกกันทั่วไปว่า White leg shrimp เป็นกุ้งพื้นเมืองในทวีปอเมริกาใต้ พบทั่วไปบริเวณชายฝั่งมหาสมุทรแปซิฟิกตะวันออก จากตอนเหนือ

ของประเทศเม็กซิโกจนถึงตอนเหนือของประเทศเปรู กุ้งชนิดนี้มีการเลี้ยงกันมากในประเทศเอกวาดอร์ (Holthuis, 1980) เม็กซิโก เปรู ปานามา ฮอนดูรัส โคลัมเบีย และบราซิล ซึ่งประเทศบราซิลเป็นประเทศที่เริ่มเลี้ยงกุ้งขาวไม่กี่ปี แต่มีผลผลิตสูง เนื่องจากรัฐบาลประเทศบราซิลให้การสนับสนุนการเลี้ยงกุ้งขาวแปซิฟิกอย่างจริงจัง ทำให้ผลผลิตของประเทศบราซิลเพิ่มอย่างรวดเร็วจนเป็นอันดับ 1 ของประเทศในทวีปอเมริกาใต้ในขณะนี้

กุ้งขาว เป็นกุ้งที่เลี้ยงง่าย มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว เนื่องจากพ่อแม่พันธุ์ได้รับการพัฒนาสายพันธุ์มาอย่างต่อเนื่อง ทำให้มีการนำเข้าไปเลี้ยงในหลาย ๆ ประเทศ กุ้งชนิดนี้ได้มีการนำเข้ามาเลี้ยงในทวีปเอเชียครั้งแรกในประเทศไต้หวันปี พ.ศ. 2539 และต่อมาได้นำเข้าไปในประเทศจีนในปี พ.ศ. 2541 สำหรับประเทศไทยได้มีการนำกุ้งขาวเข้ามาทดลองเลี้ยงในปี พ.ศ. 2541 แต่การทดลองในครั้งนั้นไม่ประสบความสำเร็จมากนัก จนกระทั่งเดือนมีนาคม 2545 กรมประมงได้อนุญาตให้นำพ่อแม่พันธุ์ที่ปลอดเชื้อ (Specific Pathogen Free, SPF) จากต่างประเทศเข้ามาทดลองเลี้ยง ระยะเวลาการนำเข้าพ่อแม่พันธุ์ที่ปลอดเชื้อจากเดือนมีนาคม 2545 ถึง เดือนกุมภาพันธ์ 2546 ซึ่งเป็นช่วงเวลาเดียวกันที่การเลี้ยงกุ้งกุลาดำในประเทศไทยกำลังประสบปัญหากุ้งโตช้า ทำให้เกษตรกรส่วนใหญ่ประสบปัญหาขาดทุน เกษตรกรบางส่วนจึงได้เริ่มทดลองเลี้ยงกุ้งขาว ซึ่งส่วนใหญ่ให้ผลค่อนข้างดี จากกระแสการเลี้ยงกุ้งขาวที่ได้ผลดีกว่าการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ทำให้เกษตรกรจำนวนมากหันมาเลี้ยงกุ้งขาวกันมากขึ้น (ชลอ และพรเลิศ, 2547)

โรคที่เกิดกับกุ้งขาว

Limsuwan (2003) รายงานเกี่ยวกับโรคที่สำคัญของกุ้งขาวในประเทศไทยไว้ดังนี้ คือ

1. White Spot Syndrome Virus (WSSV) หรือโรคไวรัสดวงขาว โรคนี้เกิดกับกุ้งทะเลทุกชนิดรวมทั้งกุ้งขาวด้วย มักมีการระบาดของโรคในช่วงอากาศเย็น กุ้งที่เป็นโรคจะมีลักษณะ จุดขาวหรือดวงขาว มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.1-2 มิลลิเมตรที่บริเวณใต้เปลือก ซึ่งเกิดจากการสะสมแคลเซียมและฟอสฟอรัสที่ผิดปกติ กุ้งที่ป่วยจะทยอยตายเรื่อย ๆ ภายใน 5 – 7 วัน กุ้งจะตายหมด

2. Taura Syndrome Virus (TSV) เป็นโรคที่มีความรุนแรงจำเพาะต่อกุ้งขาวมากกว่าในกุ้งกุลาดำ (Srisuvan *et al*., 2005) กุ้งขาวที่เป็นโรคนี้จะมีลำตัวสีชมพูถึงแดง และบริเวณปลายแพนหางจะมีสีแดงเข้มขึ้น ลำตัวอ่อนนุ่ม กุ้งบางตัวอาจพบว่ามีเหงือกบวม กุ้งที่ตายจะมีสีเข้มอมชมพู กุ้งป่วย

บางตัวจะว่ายน้ำเข้าหาขอบบ่อ บางส่วนตายที่พื้นบ่อ กุ้งที่เหลือรอดบางตัวจะมีเปลือกลักษณะคล้ายแผลสีดำ กุ้งเหล่านี้บางตัวจะมีชีวิตรอดได้ หากสภาพบ่อมีคุณภาพน้ำที่ดี แต่หากสภาพแวดล้อมไม่ดีขึ้น กุ้งเหล่านี้อาจจะตายในการลอกคราบครั้งต่อไป โดยโรคที่มีสาเหตุมาจาก TSV แบ่งออกเป็น 3 ระยะ คือระยะเฉียบพลัน ระยะคาบเกี่ยว (transition) และระยะเรื้อรัง (Lightner, 1996)

3. Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV) หรือโรคตัวพิการ กุ้งที่ติดเชื้อไวรัสนี้จะมีลักษณะที่สังเกตได้ง่าย คือ กรีมีลักษณะผิดปกติ กุดหรือสั้นกว่าปกติ อาจบิดไปทางซ้ายหรือขวา ลำตัวกุ้งคดงอ ลักษณะดังที่กล่าวมาจะสังเกตได้หลังจากปล่อยลูกกุ้งลงเลี้ยงในบ่อประมาณ 30 วัน กุ้งที่มีการติดเชื้อจะโตช้ามาก

4. Gill disease โรคเหงือกที่พบมากในกุ้งขาว คือ เหงือกดำ มักเกิดในบ่อที่น้ำมีสีเข้ม หรือมีเลนกระจายอยู่ทั่วบ่อ ซึ่งมีสาเหตุมาจากมีสารอินทรีย์สะสมอยู่มากภายในบ่อ ก่อนที่กุ้งจะแสดงอาการป่วยหรือเริ่มตาย มักจะพบว่ากุ้งมีเหงือกสีดำ ถ้าแก้ปัญหาไม่ทันกุ้งจะตาย สามารถแก้ปัญหาได้โดย เมื่อพบว่าเหงือกของกุ้งบางตัวเริ่มมีสีเข้ม ควรจะลดอาหารลง เปลี่ยนถ่ายน้ำเพิ่มขึ้นและเพิ่มเครื่องให้อากาศ เมื่อสภาพบ่อดีขึ้นหลังจากกุ้งลอกคราบ 2-3 ครั้ง เหงือกสีดำก็จะหายไป

5. Vibriosis เป็นโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียสกุล *Vibrio* ได้แก่

- *V. haveyi* สาเหตุของโรคเรืองแสง
- *V. parahaemolyticus*
- *V. vulnificus* สาเหตุของโรคเสี้ยนดำ

โรคติดเชื้อแบคทีเรียเป็นสาเหตุการตายของกุ้งที่สำคัญและยังพบว่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคเกิดการดื้อยาสูงขึ้นเรื่อย ๆ

ระบบภูมิคุ้มกันโรคของกุ้ง

สัตว์น้ำในกลุ่ม arthropod ไม่มีระบบภูมิคุ้มกันโรคแบบจำเพาะเจาะจง ซึ่งทำงานโดยแอนติบอดี้ (antibody) แต่การป้องกันตัวของสัตว์น้ำกลุ่มนี้เป็นแบบไม่จำเพาะเจาะจง (non-specific immune response) (กิจการ และคณะ, 2543ค) ระบบภูมิคุ้มกันโรคของกุ้งขาวแวนนาไม สามารถแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ

1. ระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์ (cellular immunity) เซลล์ที่มีบทบาทสำคัญคือเซลล์เม็ดเลือด 3 ชนิด คือ hyaline cell, semigranular, large granular และ fix phagocyte กระจายอยู่ตามเนื้อเยื่อ ต่อมน้ำเหลือง กล้ามเนื้อหัวใจ และอวัยวะอื่น ๆ ซึ่งมีวิธีการหลายวิธีได้แก่ การจับกินเชื้อโรค (phagocytic activity) และ การห้อมล้อมตัวเชื้อหรือสิ่งแปลกปลอม (nodule formation และ encapsulation)

2. ระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด (humoral immunity) ระบบนี้เกิดจากการทำงานของหลาย ๆ ปฏิกิริยา เช่น การเกิดการแข็งตัวของเลือด (blood clotting) การเกิด melanin และ opsonization (Hoffmann *et al*., 1999) ระบบที่สำคัญคือ prophenol oxidase activating system และ lectin ซึ่งคอยดักจับสิ่งแปลกปลอม

เซลล์เม็ดเลือด (hemocytes) ในกุ้ง

เซลล์เม็ดเลือดของ crustacean แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ (กิจการ และคณะ, 2543ก) โดยพิจารณาจากการมีหรือไม่มี granules ของเซลล์เป็นหลัก คือ hyaline cell และเซลล์ที่มี granules (granular hemocyte)

1. hyaline cell เป็นเซลล์เม็ดเลือดที่มีขนาดเล็กที่สุด รูปร่างแบน กลม ผิวเรียบ บางครั้งอาจพบคล้ายรูปกระสวย หรือพระจันทร์เสี้ยว มีนิวเคลียสขนาดใหญ่อยู่ตรงกลางเซลล์ มี mitochondria มี smooth endoplasmic reticulum (SER) และ rough endoplasmic reticulum (RER) น้อย พบ cytoplasmic granules เพียงเล็กน้อยหรือไม่มีเลย ลักษณะโครงสร้างไม่พบ microvilli หรือเท้าเทียม (pseudopodium) ที่ผิวเซลล์ ขนาดของเซลล์มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 6.4-8.3 ไมครอน (ในกรณีที่เป็นเซลล์กลม) หรือมีความกว้าง 2.5-3.6 ไมครอน ยาว 6.8-13.9 ไมครอน (ในกรณีที่เป็น

เซลล์รูปรีหรือรูปกระสวย) หน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการจับกินสิ่งแปลกปลอม หรือ phagocytosis

2. semigranular cell มีรูปร่างเป็นรูปไข่หรือรูปกระสวย นิวเคลียสอยู่ตรงกลางหรือขอบ พบ SER และ RER ได้มาก มี cytoplasmic granules มากขึ้น เป็นเซลล์ที่เกาะพื้นผิวแก้วได้ดี มีส่วนยื่นของเซลล์ (cell process) หรือเท้าเทียมค่อนข้างมาก บริเวณผิวเซลล์อาจพบ microvilli ได้เล็กน้อย ขนาดของเซลล์มีความกว้าง 4.2-6.8 ไมครอน และยาว 9.0-14.2 ไมครอน ลักษณะgranules ภายในไซโตพลาสซึม มีขนาดเล็กและพบจำนวนน้อย สังเกตเห็นได้ไม่ชัดเจนจากผิวภายนอก ทำหน้าที่โดยตรงในการสร้าง nodule และ encapsulation รวมทั้งในระบบ prophenol oxidase activating system

3. large granular cell มีขนาดใหญ่ที่สุด รูปร่างเป็นรูปไข่ คล้ายกับ semigranular cell แต่ขนาดของเซลล์จะโตกว่า นิวเคลียสอยู่บริเวณขอบ มี SER และ RER ปานกลาง และพบ cytoplasmic granules มาก ขนาดของ granules ในไซโตพลาสซึมมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7-1.0 ไมครอน ซึ่งใหญ่กว่า granules ใน semigranular cell ลักษณะการยืดของเท้าเทียมหรือส่วนยื่นของเซลล์ชนิดนี้เห็นได้ชัดเจน ขนาดของเซลล์มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 8-10 ไมครอน ความยาว 12.2-14.6 ไมครอน และ ความกว้าง 7.2-7.8 ไมครอน มีหน้าที่หลักในการทำงานในระบบ prophenol oxidase activating system (Soderhall and Cerenius, 1992)

การแข็งตัวของเลือด (Hemolymph clotting หรือ Coagulation)

การแข็งตัวของเลือดเป็นปฏิกิริยาที่สำคัญทั้งในสัตว์มีกระดูกสันหลัง และไม่มีกระดูกสันหลัง เพื่อป้องกันการสูญเสียเลือดจากบาดแผล เป็นปฏิกิริยาตกตะกอนหรือการเกิดปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนในเลือด โดยเฉพาะเอนไซม์ Transglutaminase หรือ TGase กับ Clottable protein หรือ coagulogen ตรงบริเวณที่เกิดบาดแผลมีผลทำให้เกิดปฏิกิริยา Polymerization แล้วได้เจลหรือโครงข่ายโปรตีน ปิดบริเวณบาดแผล เพื่อป้องกันสิ่งแปลกปลอมจากภายนอกเข้าสู่ร่างกาย และไม่ให้องค์ประกอบของเลือดต้องสูญเสียไป เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นโดยเม็ดเลือดชนิดที่มี granules อยู่ภายใน เมื่อ granules ถูกปล่อยออกมาแล้วแตกออก สารเคมีที่ถูกปล่อยออกมาจะไปกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของโปรตีนที่เกี่ยวกับการแข็งตัวของเลือด ซึ่งอยู่ในน้ำเลือดของ crustacean หลายชนิด ทำให้เกิดการแข็งตัวของเลือด การที่เลือดไม่สามารถแข็งตัวได้ อาจเกิดมาจากการที่เม็ดเลือดชนิด hyaline cell มีปริมาณลดลงจากการติดเชื้อจุลินทรีย์ (Martin *et al.,* 1993)

Phagocytosis

Phagocytosis เป็นขบวนการแรกในการป้องกันเมื่อมีสิ่งแปลกปลอมผ่านชั้นผิวปกคลุมเข้ามาสู่ร่างกาย phagocytes เป็นเม็ดเลือดที่สามารถทำลายสิ่งแปลกปลอมที่เป็นเซลล์ หรือสิ่งมีชีวิตเล็ก ๆ ซึ่งอาจเป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรคได้ โดยกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม ตัวอย่างของเม็ดเลือดที่ทำหน้าที่ในกระบวนการนี้ ได้แก่ hyaline cell

กระบวนการเกิดการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม เป็นกระบวนการที่ไม่จำเพาะเจาะจง โดยเริ่มจากการยึดกันระหว่างสิ่งแปลกปลอมกับผิวของเซลล์ phagocytes หลังจากนั้นผิวของเซลล์จะเว้าเข้าไป เกิดเป็น phagosome ซึ่งจะไปสัมผัสกับ lysosome ที่อยู่ภายในเซลล์ โดยภายใน lysosome บรรจุเอนไซม์หลายชนิดที่เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลายเรียกว่า acid hydrolases ซึ่งรวมถึงเอนไซม์ DNases, RNases, proteases, phosphatases และ lipases ที่สามารถไปลดขนาดของโมเลกุลสิ่งแปลกปลอมทั้งหลายให้เหลือเป็นหน่วยย่อย ๆ

เมื่อ phagosome รวมกับ lysosome จะเกิดเป็น phagolysosome และมีการแตกตัวของออกซิเจน (oxygen burst) น้ำตาลที่ถูกเก็บสะสมไว้ ที่ใช้ในการสร้าง NADPH จะรวมกับออกซิเจนเกิดเป็น toxic peroxide (H_2O_2) และ superoxide (O_2^-) การแตกตัวของออกซิเจนสามารถที่จะผลิตออกซิเจนในรูปแบบที่เป็นพิษ จำนวนโมเลกุลทั้งหมดจะมีความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาสูง และมีการทำลายอนุภาคภายใน phagolysosome โดยกลไกทางเคมีอย่างไม่จำเพาะเจาะจง หลังจากทำการย่อยสลายแล้วก็จะปล่อยส่วนที่ถูกทำลายแล้วออกมาจากเซลล์

การเพิ่มจำนวนอิเล็กตรอนโดยมี NADPH เป็นตัวให้อิเล็กตรอนทำให้เกิดอนุภาคต่าง ๆ ดังนี้

Superoxide : $O_2 + e^- \rightarrow O_2^-$

Hydrogen peroxide : $O_2^- + e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$

Hydroxyl radical : $H_2O_2 + e^- + H^+ \rightarrow OH^- + H_2O$

ภายใน lysosome จะมีค่า pH เป็นกรดอยู่ที่ระดับ pH 4.8 เพราะเยื่อบุผิวของ lysosome จะปั๊มไฮโดรเจนไอออน (H^+) เข้าไปใน lysosome เพื่อที่จะรักษาค่า pH ให้อยู่ในสภาพกรด ที่ทำให้โปรตีนหลายชนิดเสื่อมสภาพ (denature) และง่ายต่อการทำให้แตกออก โดยสภาพการเป็นกรดจะเป็นการเร่งให้เกิดการสร้างสารประกอบออกซิเจนบางชนิดที่เป็นพิษเช่น peroxide (Pick and Keisari, 1980)

ระยะเวลาในการเกิดกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมตั้งแต่เริ่มจนถึงการเกิด phagolysosome และการกระตุ้นการเกิดกระบวนการแตกตัวของออกซิเจนจะใช้เวลาหลายชั่วโมง ระยะเวลาการเกิดการแตกตัวของอนุภาคสิ่งแปลกปลอมจะแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น ชนิดของสิ่งแปลกปลอม และระดับของการกระตุ้นเซลล์ที่ทำหน้าที่กลืนกินสิ่งแปลกปลอม เป็นต้น (Sung *et al*., 1996)

Nodule formation และ Encapsulation

โดยทั่วไปกระบวนการ phagocytosis จะทำลายเชื้อจุลินทรีย์ที่มีขนาดเล็ก โดยเซลล์เม็ดเลือดเดี่ยว ๆ ส่วน nodule formation และ encapsulation เป็นการที่เม็ดเลือดจำนวนมากเข้าห้อมล้อมตัวเชื้อ หรือสิ่งแปลกปลอม ซึ่งมีวิธีการที่ซับซ้อนมากกว่า สามารถทำให้สิ่งแปลกปลอมที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคที่มีขนาดใหญ่ หรือมีจำนวนมากถูกกำจัดไป การเกิด nodules จะเกิดขึ้นเมื่อมีสิ่งแปลกปลอมเข้ามาเป็นจำนวนมาก ส่วนการห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอมโดย encapsulation จะเกิดเมื่อสิ่งแปลกปลอมนั้นมีขนาดใหญ่มากกว่า 10 ไมโครเมตร เช่น เชื้อรา หนอนตัวกลม ไข่ของปรสิต และระยะตัวอ่อน ซึ่งเซลล์เม็ดเลือดไม่สามารถทำลายได้ ต้องอาศัยเซลล์เม็ดเลือดจำนวนมากมาล้อมรอบและห่อหุ้มเอาไว้ (Gunnarsson and Lackie, 1985; Hoffmann *et al*., 1996; Koizumi *et al*., 1999; Gillespie *et al*., 1997)

การเกิด nodule formation จะเห็นลักษณะเป็นก้อน แสดงให้เห็นการรวมตัวของเซลล์เม็ดเลือด เพื่อที่จะโอบล้อมสิ่งแปลกปลอม เพื่อไม่ให้กระจายไปทั่วร่างกาย มักพบการสร้าง nodules บริเวณเหงือก และตับ โดยภายหลังจากที่เกิดปฏิกิริยาดังกล่าว พบว่าสิ่งแปลกปลอมจะถูกทำให้เกิดเป็น melanin ซึ่งมีสีดำ โดยเป็นผลมาจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ phenoloxidase (Lee, 2001)

ระบบ Prophenoloxidase activating system

ระบบ Prophenoloxidase เป็นระบบการทำลายเชื้อโรคและการควบคุมการกระจายของเชื้อโรค ประกอบด้วยเอนไซม์ที่สำคัญ คือ phenoloxidase ซึ่งอยู่ในรูป proenzyme เป็นเอนไซม์ที่เกิดจากการกระตุ้นระบบ prophenoloxidase ของ crustacean โดย lipopolysaccharide (LPS), peptidoglycan (PG) และ β-1,3-glucan ซึ่งเป็นส่วนประกอบผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย และยีสต์ phenoloxidase จะไป oxidize สารกลุ่ม phenol ให้เป็นสารประกอบ quinine แล้วเปลี่ยนไปเป็น melanin ได้ในที่สุด หน้าที่ของ melanin จะช่วยในการยับยั้งหรือป้องกันการเจริญเติบโตของพวกเชื้อแบคทีเรีย สารต่อต้านแบคทีเรีย (antibacterial substances) เป็นสารประกอบขั้นสุดท้ายที่ได้จากกระบวนการของระบบ prophenoloxidase เช่นเดียวกับเอนไซม์ phenoloxidase รวมทั้งคุณสมบัติในการป้องกันการเจริญเติบโตของพวกแบคทีเรียและเชื้อรา (Hose *et al*., 1987; Smith and Chisholm, 1992; Soderhall and Cerenius, 1992; Bachere *et al*., 1995)

จากการศึกษาของ กิจการ และคณะ (2543ค) พบว่าความกิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase ที่วิเคราะห์ได้จากเม็ดเลือดและน้ำเลือดกุ้งมีค่าแตกต่างกัน โดยพบปริมาณเอนไซม์ดังกล่าวค่อนข้างสูงในเม็ดเลือด และปริมาณต่ำในน้ำเลือดกุ้งกุลาดำ ปริมาณที่พบในเม็ดเลือดมีค่า 352.72±52.30 หน่วย/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน ในขณะที่ในน้ำเลือดมีค่า 32.23±6.04 หน่วย/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน

ในสิ่งมีชีวิตพวกกุ้งพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ในระบบ prophenoloxidase จะมีมากในถุง (vesicle) ซึ่งอยู่ภายใน cytoplasm ของเม็ดเลือด เช่น ในกุ้ง *Astacus astacus* และใน *Procambarus clarkii* (กิจการ และคณะ, 2543ค อ้างถึง Smith and Soderhall, 1983; กิจการ และคณะ, 2543ค อ้างถึง Johansson and Soderhall, 1985; Lanz *et al*., 1993) ในขณะที่กิจการ และคณะ (2543ค) Sung *et al*. (1996) และ Parazzolo and Barracco (1997) พบว่า prophenoloxidase ของกุ้งกุลาดำ กุ้งก้ามกราม และ กุ้งขาว ส่วนใหญ่จะอยู่ในไซโตพลาสซึมของเม็ดเลือดในกลุ่มที่มี granules นอกจากนี้ยังพบเอนไซม์ชนิดนี้มีการแพร่กระจายอยู่ในเนื้อเยื่อหลายส่วนของกุ้ง (กิจการ และคณะ, 2543ค อ้างถึง Hose *et al*., 1987; กิจการ และคณะ, 2543ค อ้างถึง Soderhall, 1982; กิจการ และคณะ , 2543ค อ้างถึง Soderhall *et al*., 1990)

สารออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (bactericidin)

สารออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย เป็นสารต้านแบคทีเรียที่สามารถถูกชักนำให้มีปริมาณสูงขึ้นเมื่อได้รับการกระตุ้น มีความจำเพาะต่อเชื้อบางชนิด และไม่ทนต่อความร้อน โดยสารออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียนี้สามารถพบได้ทั้งในส่วนของพลาสมา ซีรั่ม และในสารละลาย hemocyte lysate supernatant (HLS) (ชัยชาญ, 2545)

Cytokine-like factors

Cytokine-like factors มีหน้าที่ช่วยรักษาความสมดุลของเลือดในระบบภูมิคุ้มกัน และช่วยในการประสานงานระหว่างระบบภูมิคุ้มกันกับระบบอื่น ๆ ในร่างกาย Cytokine-like factors ในกุ้งได้แก่ โปรตีนขนาด 76 kDa ซึ่งมีหน้าที่ช่วยกระตุ้นกระบวนการ phagocytosis ช่วยในการยึดติดระหว่างเซลล์เม็ดเลือดกับสิ่งแปลกปลอมขณะเกิดการห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอม (Smith and Chisholm, 1992) และส่งเสริมการทำงานของระบบ prophenoloxidase โดยช่วยให้เซลล์เม็ดเลือดชนิด semigranular และ large granular เกิด degranulation มากขึ้น ทำให้เอนไซม์ในระบบ prophenoloxidase ถูกปล่อยออกมามากขึ้น (Johansson and Soderhall, 1989)

เซลล์และเนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมในกุ้ง

กิจการ และคณะ (2543ข) พบว่า ที่เหงือก ต่อมน้ำเหลือง หัวใจ ตับ ตับอ่อน และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เป็นอวัยวะที่มีความสามารถในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมได้ดี ส่วนกล้ามเนื้อและระบบประสาทสามารถกำจัดได้เพียงเล็กน้อย โดยพบเซลล์เม็ดเลือด และเซลล์จับกินกับที่ (fixed phagocyte) ทำหน้าที่ในการดักจับสิ่งแปลกปลอมในเนื้อเยื่อดังกล่าว กลไกการกำจัดสิ่งแปลกปลอมเกิดขึ้นโดยเริ่มจากมีเซลล์เดี่ยวเข้ามาล้อมจับแล้วมีเซลล์เม็ดเลือดเข้ามาล้อมรอบมากขึ้นจนเกิดเป็นลักษณะที่เรียกว่า nodule formation และ encapsulation สุดท้ายมีการสร้าง melanin ขึ้น และถูกกำจัดออกนอกร่างกาย

ระบบภูมิคุ้มกันโรคของสิ่งมีชีวิตกลุ่ม Crustacean ในการต่อต้านสิ่งแปลกปลอมมีทั้งกิจกรรมที่เกิดขึ้นโดยการตอบสนองของเซลล์ และสารน้ำ (cellular and humoral response) (กิจการ และคณะ, 2543ข อ้างถึง Rabin, 1970) ซึ่งกิจกรรมที่เกิดขึ้นมีหลายแบบ คือ กิจกรรมที่เกิดจากโปรตีนชนิดต่าง ๆ ในซีรั่ม เช่น โปรตีน agglutinin, hemolysin, lysozyme และโปรตีนที่ช่วยใน

การแข็งตัวของเลือด (clotting protein) ส่วนกิจกรรมของเซลล์เม็ดเลือด จะก่อให้เกิดกระบวนการเกาะกลุ่ม (adhesion) กิจกรรม phagocytosis การห่อหุ้มโดยวิธี encapsulation และการสร้างเม็ดสี (melanization)

เนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในกุ้ง คือ ต่อมน้ำเหลือง (lymphoid organ) อวัยวะสร้างเม็ดเลือด (hemopoietic tissue) รวมทั้งอวัยวะต่าง ๆ ที่มีเซลล์จับกินกับที่กระจายอยู่ (Johnson, 1987)

จากการศึกษาของ กิจการ และคณะ (2543ข) พบลักษณะของ nodule formation หรือ encapsulation กระจายอยู่ทั่วไปตามเนื้อเยื่อต่าง ๆ เช่น ต่อมน้ำเหลือง ตับและตับอ่อน หัวใจ เหงือก ซึ่งกระบวนการกำจัดสิ่งแปลกปลอมก็จะมีเซลล์เม็ดเลือดในระบบไหลเวียน และเซลล์จับกินอยู่กับที่ เข้ามาเกี่ยวข้องเป็นหลัก ในระยะสุดท้ายของการกำจัดสิ่งแปลกปลอมก็จะมีการสร้าง melanin ขึ้น เนื่องจากกระบวนการของ prophenoloxidase

Fontaine and Lightner (1974) พบว่าหลังจากฉีดอนุภาคของสี carmine เข้าไปในเนื้อเยื่อกุ้งทะเลชนิด *Penaeus setiferus* ภายใน 1 ชั่วโมง จะมีการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดเข้ามาห้อมล้อมอนุภาคสี เซลล์ที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดอนุภาคสี คือ เซลล์เม็ดเลือด และเซลล์จับกินกับที่ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ โดยอนุภาคสีสามารถคงอยู่ในตัวกุ้งได้นาน 33 วัน

กิจการ และคณะ (2543ข) รายงานว่า ลักษณะของเซลล์จับกินกับที่เมื่อตรวจสอบโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอน พบว่ากระจายอยู่ตามเนื้อเยื่อหลายส่วน เช่น หัวใจ เหงือก ทางเดินอาหาร ลักษณะของเซลล์จับกินกับที่นี้จะต่างจากเม็ดเลือดกุ้ง คือไม่พบ granules ภายใน cytoplasm มี vacuole ขนาดใหญ่ใน cytoplasm และมักพบเศษเซลล์ (debris) และลักษณะของ myelin figure ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการจับกินสิ่งแปลกปลอม และการเกิด autophagic vacuoles จากโครงสร้างที่พบแสดงให้เห็นว่ากระบวนการกำจัดสิ่งแปลกปลอมของกุ้งเกิดขึ้นได้ในเนื้อเยื่อเกือบทุกส่วนของร่างกาย โดยในกรณีสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายเป็นสิ่งไม่ก่อให้เกิดโรค และไม่มีผลทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อต่าง ๆ กุ้งก็สามารถทำลายและขับออกมาภายนอกตัวได้ แต่ถ้าสิ่งแปลกปลอมนั้นเป็นเชื้อโรค เช่น แบคทีเรียหรือไวรัสที่สามารถสร้างสาร hemolysin ย่อยสลายเม็ดเลือด สร้างเอนไซม์ chitinase ย่อยสลายเปลือกกุ้ง รวมถึงอนุภาคของไวรัส เชื้อรา และโปรโตซัวชนิดต่าง ๆ ที่เข้าทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อโดยตรง หรือสร้างสารรบกวนกิจกรรมของเซลล์และเนื้อเยื่อ ก็จะส่งผลให้ระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายกุ้งลดลงและก่อให้เกิดโรคได้

โปรไบโอติก

โปรไบโอติก คือจุลินทรีย์ซึ่งอาจมีเพียงชนิดเดียว หรือเป็นส่วนผสมของจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถปรับปรุงคุณสมบัติของจุลินทรีย์ดั้งเดิมที่อาศัยอยู่ในลำไส้ของสัตว์นั้น โดยจุลินทรีย์เหล่านี้อาจอยู่ในรูปของเซลล์แห้งจากกระบวนการระเหิดแห้ง (freeze-dried cells) หรืออยู่ในรูปผลิตภัณฑ์หมักซึ่งนอกจากไปส่งเสริมการเจริญเติบโตแล้ว ยังทำให้สัตว์มีสุขภาพดีขึ้นด้วย

มีผู้ให้คำจำกัดความของโปรไบโอติกไว้หลายความหมายดังต่อไปนี้

Fuller (1992) ให้คำจำกัดความว่า โปรไบโอติกเป็นการเลี้ยงจุลินทรีย์ที่มีชีวิตในอาหารซึ่งจะไปมีผลต่อการปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ ซึ่งจากคำจำกัดความนี้โปรไบโอติกจะต้องเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิต และให้กับเจ้าบ้านโดยการผสมอาหาร

Maeda *et al.* (1997) ได้ให้คำจำกัดความว่า โปรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อร่างกายของสิ่งมีชีวิต โดยการทำงานแบบ biological control

Moriarty (1998) ให้คำจำกัดความว่า โปรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ จะรวมถึงการใส่แบคทีเรียลงในบ่อ หรือถังเลี้ยงสัตว์น้ำด้วย

Gram *et al*. (1999) ให้คำจำกัดความว่า โปรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อสิ่งมีชีวิตโดยการปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในร่างกาย โดยที่ไม่จำเป็นที่ต้องให้โปรไบโอติกโดยการผสมอาหาร

Salminen *et al*. (1999) ให้คำจำกัดความว่า โปรไบโอติกเป็นกลุ่มของจุลินทรีย์ซึ่งไม่จำเป็นต้องมีชีวิตแต่ได้มาจากเซลล์ของจุลินทรีย์ และมีประโยชน์ต่อสิ่งมีชีวิตที่ได้รับโปรไบโอติกเข้าไป

อย่างไรก็ตามโปรไบโอติกต้องไม่เป็นอันตรายต่อเจ้าบ้าน (Salminen *et al*., 1999) และมีประสิทธิภาพในสภาพที่มีอุณหภูมิและความเค็มหลาย ๆ ช่วง (Fuller, 1992) ซึ่งอาจให้โดยการผสมอาหาร การแช่ หรือโดยการฉีดเข้าไป นอกจากนั้นโปรไบโอติกจะต้องเป็นประโยชน์ต่อสิ่งมีชีวิตที่ได้รับเข้าไป รวมทั้งสามารถมีชีวิตอยู่ได้ในระบบทางเดินอาหารของเจ้าบ้าน

คุณสมบัติที่ดีของโปรไบโอติก (Fuller, 1989; Havenaar and Huis in't Veld, 1992; อัครเดช, 2545)

คุณสมบัติที่สำคัญที่นำมาใช้สำหรับการคัดเลือกแบคทีเรียที่จะนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกในสัตว์น้ำนั้น ควรมีคุณสมบัติต่อไปนี้ คือ

1. ควรเป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการต่อต้านแบคทีเรียที่ก่อโรคได้ โดยอาจแสดงผลในหลอดทดลองว่ามีความสามารถในการแข่งขันการใช้สารอาหารหรือผลิตสารเพื่อฆ่าหรือยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค

2. มีความสามารถในการยึดเกาะลำไส้ได้ หรือสามารถอยู่ในลำไส้ได้ชั่วระยะเวลาหนึ่ง

3. ทำให้เจ้าบ้านแข็งแรงมีความต้านทานโรค โดยมีการยืนยันผลด้วยการทดสอบการต้านทานโรค (challenge test)

4. มีความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้

5. ไม่เป็นสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรค จุลินทรีย์โปรไบโอติกและองค์ประกอบของเซลล์รวมทั้งผลิตภัณฑ์ของเซลล์ต้องไม่สร้างปฏิกิริยาที่เป็นพิษหรือก่อมะเร็งต่อตัวเจ้าบ้าน

6. ทนต่อสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ได้ดี เช่น สภาพกรด สภาพปริมาณสารอาหารน้อย และมีความทนทานต่อสารพิษ

7. ผลิตง่าย สามารถทนต่อสภาพการเก็บรักษาก่อนมีการใช้งาน และมีจำนวนเซลล์ที่ออกฤทธิ์คงที่ เช่น ทนต่อสภาพแห้งแล้งในรูปผง

8. เป็นสายพันธุ์ที่มีลักษณะพันธุกรรมคงที่

การใช้โปรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้ง

การใช้โปรไบโอติก คือ การใช้จุลินทรีย์เพียงชนิดเดียว หรือการใช้จุลินทรีย์หลาย ๆ ชนิดที่ทำการคัดเลือกสายพันธุ์แล้ว นำมาประยุกต์ใช้กับการเลี้ยงกุ้งเพื่อให้เกิดประโยชน์โดยเป็นจุลินทรีย์

ที่พบได้ทั่วไปในแหล่งน้ำ ตะกอนพื้นบ่อ และสามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างมาก มีผลโดยตรงต่อการควบคุมและยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในกุ้งซึ่งอาจจะใช้ในลักษณะการผสมอาหารให้กุ้งกิน หรือใช้ในน้ำโดยตรง

นอกจากนี้โปรไบโอติกยังจัดเป็นจุลินทรีย์เพื่อเสริมการเจริญเติบโต และเสริมภูมิคุ้มกันแก่กุ้ง เพื่อให้เกิดความสมดุลในทางเดินอาหาร ซึ่งปกติจุลินทรีย์ประจำถิ่นมีทั้งดีและไม่ดีต่อตัวกุ้ง เมื่อมีการเสียสมดุลและมีปริมาณแบคทีเรียก่อโรคมากกว่าจะทำให้กุ้งเกิดโรคและเป็นสาเหตุการตายในที่สุด

กลไกการทำงานของโปรไบโอติก

1. การผลิตสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโต

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

การผลิตสารที่มีคุณสมบัติในการต้านทานเชื้อแบคทีเรียจะขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ ซึ่งบางครั้งมีปัจจัยเดียว หรืออาจเกิดจากหลาย ๆ ปัจจัยร่วมกันในการผลิตสารปฏิชีวนะ (antibiotics) (Williams and Vickers, 1986) สารต้านทานแบคทีเรีย (bacteriocins) (Bruno and Montville, 1993; Vandenbergh, 1993) lysozymes, proteases, hydrogen peroxide และการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) จากการผลิตกรดอินทรีย์ (Sugita *et al.*, 1997)

แบคทีเรียกลุ่ม lactic acid bacteria สามารถผลิตสารหลายชนิด เช่น bacteriocins ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดอื่น (Vandenbergh, 1993) มีการศึกษาหลายรายงานเกี่ยวกับปฏิกิริยาในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ โดยแบคทีเรียในกลุ่ม lactic acid bacteria ซึ่งเกิดปฏิกิริยาโดยสาร bacteriocins แต่ไม่มีผลต่อแบคทีเรียแกรมบวก (Stoffels *et al.*, 1992)

2. การแข่งขันในการใช้สารเคมี และพลังงาน

ระบบนิเวศวิทยาของจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ จะเป็นการแข่งขันของจุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลาย โดยแข่งขันในการใช้ทั้งคาร์บอน และแหล่งพลังงาน Rico-Mora *et al*. (1998) ได้เลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่สามารถเจริญได้ดีในแหล่งที่มีสารอินทรีย์ในปริมาณต่ำ และเติมแบคทีเรียนั้นลงไปในการเลี้ยงไดอะตอม และสามารถป้องกันการเจริญของเชื้อ *Vibrio alginolyticus* ได้ ซึ่งแบคทีเรียที่เติมลงไปนั้นสามารถแข่งขันกับ *V. alginolyticus* ในการใช้ประโยชน์จากสิ่งขับถ่าย (exudates) ของไดอะตอม

3. การแข่งขันในการใช้แร่ธาตุ

จุลินทรีย์ทุกชนิดนั้นต้องการแร่ธาตุในการเจริญเติบโต (Reid *et al*., 1993) โดยเฉพาะเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคส่วนใหญ่จะมีความต้องการไอออนสูง Pybus *et al*. (1994) ได้ทำการทดสอบ *Vibrio anguillarum* 30 สายพันธุ์ ในการเป็นโปรไบโอติกต่อเชื้อ *Vibrio ordalii* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในปลาซัลมอน โดยศึกษาคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโต พบว่า สายพันธุ์ *V. anguillarum* VL4335 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *V. ordalii* ได้ โดยเชื้อก่อโรคชนิดนี้จะหยุดการเจริญเมื่อไม่มีการเติมไอออนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

4. การแข่งขันในการยึดเกาะ

กลไกหนึ่งที่เป็นไปได้ในการป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้อที่ก่อให้เกิดโรค คือการแข่งขันในการยึดเกาะบนผิวทางเดินอาหารหรือบนเนื้อเยื่อของเจ้าบ้าน ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่าความสามารถในการยึดเกาะบนเมือก หรือบนพื้นผิวจำเป็นต่อแบคทีเรียที่จะเจริญในลำไส้ของสัตว์น้ำ (Olsson *et al*., 1992; Onarheim and Raa, 1990; Westerdahl *et al*., 1991) เมื่อแบคทีเรียมีการยึดเกาะบนผิวของเนื้อเยื่อจะเป็นระยะแรกของการติดเชื้อ (Krovacek *et al*., 1987) การแข่งขันในการยึดเกาะกับเชื้อที่ก่อให้เกิดโรค จึงนับว่าเป็นกลไกการทำงานแรกของโปรไบโอติก (Montes and Pugh, 1993) ในการใช้โปรไบโอติกในมนุษย์ สายพันธุ์ที่สามารถแข่งขันในการยึดเกาะนั้นถือว่าเป็นสายพันธุ์ที่จะพิจารณาในการนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกเป็นอันดับแรก (Salminen *et al*., 1997)

การยึดเกาะนั้นไม่จำเป็นต้องมีความจำเพาะ อาจขึ้นอยู่กับปัจจัยทางกายภาพ ทางเคมี หรือมีความจำเพาะเจาะจง รวมถึงโมเลกุลที่ทำหน้าที่ในการยึดเกาะบนพื้นผิวของแบคทีเรีย และโมเลกุลบริเวณที่เป็นตัวรับ (receptor molecules) บนผิวเซลล์ การยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อที่ทำให้เกิดโรคบนผิวของเซลล์ในมนุษย์ และในสัตว์อื่น ได้มีการทดลองในห้องปฏิบัติการโดยนักวิจัยหลายท่าน (Bernet *et al*., 1994; Blomberg *et al*., 1993) แต่การศึกษาในสัตว์น้ำนั้น กลไกของโปรไบโอติกในการแข่งขันในการยึดเกาะนั้นเป็นเพียงสมมติฐานซึ่งยังไม่มีการวิจัยเพื่อพิสูจน์สมมติฐานนี้

นิตยา และคณะ (2549) ได้ทำการทดลองใช้แบคทีเรียสกุล *Bacillus* เป็นโปรไบโอติกในกุ้งกุลาดำ โดยหลังจากเลี้ยงกุ้งกุลาดำด้วยอาหารผสมแบคทีเรีย *Bacillus* เป็นระยะเวลา 1 เดือน จึงนำลำไส้ไปตรวจหาเชื้อแบคทีเรียโดยส่องใต้กล้อง Scanning Electron Microscope (SEM) เพื่อประเมินบทบาทและการดำรงอยู่ของแบคทีเรียภายในลำไส้ พบว่ามีแบคทีเรียรูปร่างแท่งยาว ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าจะเป็นแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* โดยแบคทีเรียรูปร่างแท่งยาวนี้จะเกาะอยู่ในลำไส้ และ พบว่า ในลำไส้กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติกทุกกลุ่มทดลองมีจำนวนเชื้อ *Vibrio* spp. มีลักษณะเป็นแท่งงอ ยาวประมาณ 1 ไมครอน ในลำไส้น้อยกว่ากลุ่มควบคุม และมี *Bacillus* spp. ซึ่งมีลักษณะเป็นแท่งยาว ขนาดประมาณ 1.5-3 ไมครอนมากกว่ากลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แสดงให้เห็นว่า เชื้อ *Bacillus* สามารถดำรงชีวิตอยู่ในลำไส้ได้จริงโดยเข้าไปแย่งพื้นที่ แย่งอาหารรวมทั้งปัจจัยอื่น ๆ จากแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค เพื่อสร้างตัวเองให้โดดเด่นขึ้นมา

การยึดเกาะของเชื้อที่เป็นโปรไบโอติกบนผนังลำไส้ หรือเนื้อเยื่อไม่ได้เป็นเพียงกลไกเดียวในการทำงานของโปรไบโอติก นอกเหนือจากการยึดเกาะแล้วยังต้องมีความสามารถในการเพิ่มจำนวนด้วย เนื่องจากในผนังลำไส้ของสัตว์น้ำจะมีการป้องกันตัวมันเองโดยการหลั่งสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียด้วย

5. คุณสมบัติในการกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน

การใช้โปรไบโอติกนั้น บางครั้งสารที่นำมาใช้จะรวมถึงส่วนประกอบของผนังเซลล์ของจุลชีพ (Salminen *et al*., 1999) ซึ่งสารนั้นสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ โดยมีการศึกษามากมายที่กล่าวถึงเซลล์หรือส่วนประกอบของเซลล์จุลชีพที่นำมาเป็นสารกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันให้ต้านทานต่อเชื้อที่ทำให้เกิดโรค

เนื่องจากระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งเป็นแบบไม่จำเพาะเจาะจง ไม่มีความทรงจำที่จะสร้างแอนติบอดี้ได้เหมือนสัตว์ชั้นสูง ดังนั้นการทำงานจึงเป็นลักษณะชั่วคราว จำเป็นต้องได้รับการกระตุ้นเพื่อให้เกิดความพร้อมตลอดเวลา การกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายส่วนใหญ่เป็นการทำงานของเม็ดเลือด ซึ่งเป็นการทำงานร่วมกันเพื่อดักจับกินสิ่งแปลกปลอม โปรไบโอติกที่ผสมในอาหารกุ้งอาจจะประกอบด้วยจุลินทรีย์หลายชนิด และเมื่อตายลงก็พร้อมที่จะเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดยที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกจะพบสาร peptidoglycan

6. กระตุ้นการเจริญเติบโต

มีรายงานการใช้แบคทีเรียสกุล *Bacillus* เป็นโปรไบโอติก ในการผสมอาหารสำหรับเลี้ยงกุ้งกุลาดำ มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัว ความยาว และอัตราการเจริญเติบโต (สิทธิ และลิลา, 2541; ศิริรัตน์ และคณะ, 2547; Rengpipat *et al.,* 1998a; Rengpipat *et al.,*1998b)

การทดลองใช้โปรไบโอติกในกุ้ง

Rengpipat *et al.* (2000) พบว่ากุ้งกุลาดำที่ให้อาหารผสม *Bacillus* S11 มีอัตรารอดและการเจริญเติบโตดีกว่ากุ้งที่ไม่ได้รับอาหารผสม *Bacillus* S11 โดย *Bacillus* S11 มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นกระบวนการ phagocytosis ซึ่งทราบได้จากการวัดเปอร์เซ็นต์ phagocytosis และ phagocytic index (PI) ส่วนกิจกรรม phenoloxidase และกิจกรรมของน้ำเลือดกุ้งในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย (antibacterial activities) มีค่าสูงขึ้นหลังจากการใช้โปรไบโอติกเลี้ยงกุ้งเป็นระยะเวลา 90 วัน และเมื่อทำการทดสอบความคุ้มโรคด้วยเชื้อ *Vibrio harveyi* เป็นเวลา 10 วัน กุ้งที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกมีอัตรารอดดีกว่า อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยอัตรารอดของกุ้งที่ให้อาหารผสมโปรไบโอติก คือ 54.3 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับกุ้งที่ไม่ได้ให้อาหารผสมโปรไบโอติกมีอัตรารอด 35.5 เปอร์เซ็นต์ และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำที่ได้รับเชื้อ *V. harveyi* เป็นเวลา 10 วัน ในกลุ่มที่ให้อาหารผสมโปรไบโอติกมีค่า PI เท่ากับ 2.7 ± 0.8 ส่วนกลุ่มควบคุมมีค่า PI เท่ากับ 0.6 ± 0.3

นิตยา และคณะ (2549) ทำการทดลองใช้ *Bacillus subtilis* และ *B. licheniformis* เป็นโปรไบโอติก ซึ่งแยกได้จากลำไส้กุ้งกุลาดำผสมอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำเป็นเวลา 1 เดือน พบว่าการใช้ *B. subtilis* ร่วมกับ *B. licheniformis* ในอัตราส่วน 1:1 ที่ 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีผลทำให้ระดับภูมิคุ้มกันสูงขึ้นกว่ากลุ่มอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม

โปรไบโอติกทุกกลุ่มทดลองมีจำนวนเชื้อ *Vibrio* spp. ในลำไส้น้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมพบว่า กุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกชนิด *B. subtilis* และ *B. licheniformis* ที่ 3 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ทุกวันเป็นระยะเวลา 1 เดือน มีระดับภูมิคุ้มกันสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับวันเว้นวัน และกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติกทุกกลุ่มทดลองมีจำนวนเชื้อ *Vibrio* spp. ในลำไส้น้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และพบว่าระดับภูมิคุ้มกันสูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัดหลังจากหยุดให้ 1 สัปดาห์แล้วค่อย ๆ ลดลงเท่ากับกลุ่มควบคุมในสัปดาห์ที่ 2 และเมื่อให้อาหารผสมโปรไบโอติกอีกครั้งพบว่ากุ้งมีระดับภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ และจำนวนเชื้อ *Vibrio* spp. ในลำไส้มีจำนวนลดลง จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าการใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกชนิด *B. subtilis* ร่วมกับ *B. licheniformis* ที่ 3 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีผลในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำได้เป็นที่น่าพอใจ โดยควรให้จุลินทรีย์ดังกล่าวอย่างต่อเนื่องในระหว่างการเลี้ยง

วัชริยา (2549) พบว่า การใช้ *Bacillus subtilis* ซึ่งแยกได้จากลำไส้กุ้งกุลาดำเป็นโปรไบโอติก โดยการผสมอาหารที่ระดับความเข้มข้น 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันต่าง ๆ ของกุ้งกุลาดำ ได้แก่ กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase การผลิต superoxide anion ความว่องไวในการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้งกุลาดำ และความสามารถในการกำจัดเชื้อโรคจากระบบไหลเวียนได้ อย่างไรก็ตาม เมื่อใช้ *Bacillus* ชนิดต่าง ๆ ในรูปของเชื้อผสม ได้แก่ เชื้อผสมของ *B. pumilus* + *B. sphaericus* เชื้อผสมของ *B. pumilus* + *B. subtilis* เชื้อผสมของ *B. sphaericus* + *B. subtilis* และเชื้อผสมของ *B. pumilus* + *B. sphaericus* + *B. subtilis* สามารถเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase ความว่องไวในการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือด และความสามารถในการกำจัดเชื้อโรคจากระบบไหลเวียนได้เช่นเดียวกัน นอกเหนือจากคุณสมบัติในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแล้ว เชื้อ *Bacillus* ทั้ง 3 ชนิด ยังสามารถลดปริมาณของแบคทีเรียก่อโรค *Vibrio* spp. ในลำไส้กุ้งกุลาดำได้ และจากการศึกษาการแข่งขันในการใช้สารอาหารระหว่างเชื้อ *Bacillus* และเชื้อ *V. harveyi* โดยวิธี broth co-culture assay โดยเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลองทั้งเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสม พบว่า *Bacillus* ทั้ง 3 ชนิด สามารถลดปริมาณเชื้อ *V. harveyi* ได้

Gullian *et al*. (2004) คัดเลือกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกโดยแยกจากลำไส้และ hepatopancreas ของกุ้งจากธรรมชาติ ได้ 3 ชนิด คือ *Vibrio* P62, *Vibrio* P63 และ *Bacillus* P64 ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Vibrio harveyi* (S2) ได้ นำมาผสมอาหารให้กุ้งขาว *Penaeus vannamei* กินพบว่ากุ้งขาวกลุ่มที่กินอาหารผสมโปรไบโอติกทั้ง 3 ชนิดมีน้ำหนักตัวสูงกว่ากลุ่ม

ควบคุมและ *Bacillus* P64 มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกที่ดีและสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวได้สูงกว่ากลุ่มอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

Li *et al*. (2007) ศึกษาการเจริญได้ของเชื้อ *Bacillus licheniformis* ในระบบทางเดินอาหารของกุ้งขาว และผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน พบว่า *B. licheniformis* สามารถเจริญได้อย่างต่อเนื่องในลำไส้ของกุ้งขาว และลดจำนวน *Vibrio* ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ส่วนผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน พบว่ากุ้งขาวที่เลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อ *B. licheniformis* มีปริมาณเม็ดเลือดรวม ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase และปริมาณ superoxide สูงกว่ากุ้งขาวในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

Balcázar *et al*. (2007) แยกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกจากทางเดินอาหารของกุ้งขาวได้ 4 ชนิด คือ *Vibrio alginolyticus* UTM 102, *Bacillus subtilis* UTM 126, *Roseobacter gallaeciensis* SLV03 และ *Pseudomonas aestumarina* SLV22 ทำการทดลองใน *in vitro* พบว่ามีความสามารถในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *Vibrio parahaemolyticus* PS-017 และเมื่อนำมาผสมอาหารให้กุ้งกินพบว่า กุ้งที่กินอาหารผสมโปรไบโอติกทั้ง 4 ชนิดมีอัตราเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อดีกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และกุ้งที่กินอาหารผสมโปรไบโอติกมีความต้านทานต่อเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ได้ดี

Tseng *et al.* (2009) ใช้ *Bacillus subtilis* E20 ที่แยกได้จากถั่วเหลืองหมัก มาใช้เป็นโปรไบโอติก เพื่อศึกษาการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ความทนโรคของกุ้งขาวแวนนาไม โดยให้อาหารผสมโปรไบโอติกที่ระดับความเข้มข้นเชื้อ คือ 10^6, 10^7 และ 10^8 CFU ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม พบว่ากุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกระดับดังกล่าว มีอัตรารอดเพิ่มขึ้น 13.3, 16.7 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หลังจากเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วยเชื้อ *Vibrio alginolyticus* และกุ้งในกลุ่มทดลองที่ได้รับโปรไบโอติกความเข้มข้นสูง พบว่ามีระดับภูมิคุ้มกันที่ดีขึ้นทั้งกิจกรรม phagocytosis กิจกรรม phenoloxidase และประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อ *Vibrio alginolyticus* (clearance efficiency) แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

Li and Tan (2009) ทดลองใช้ *Bacillus* OJ (*B. megeterium*) เป็นโปรไบโอติกร่วมกับ isomaltooligosaccharides เพื่อประเมินผลประชากรแบคทีเรียในลำไส้ ผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน และความต้านทานโรคของกุ้งขาวแวนนาไม โดยการให้ผสมอาหาร พบว่ากุ้งในกลุ่มทดลองที่ให้อาหาร

ผสมโปรไบโอติกความเข้มข้นสูงมีระดับภูมิคุ้มกันสูงขึ้น มีอัตรารอดสูงเมื่อได้รับเชื้อไวรัส WSSV และมีปริมาณ *Vibrio* ในลำไส้น้อยกว่ากลุ่มทดลองอื่น ๆ

แบคทีเรียที่พบในกุ้ง

เศรษฐเกียรติ และคณะ (2533) ทำการศึกษาเชื้อแบคทีเรียในอวัยวะภายในของพ่อแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ 119 ตัว โดยทำการตรวจหาเชื้อจาก hepatopancreas และ hemolymph พบเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มแกรมลบเท่านั้น และแยกพิสูจน์เชื้อโดยใช้ชุดทดสอบ API 20 E พบว่าส่วนใหญ่อยู่ในสกุล *Vibrio* โดยพบ *V. alginolyticus* มากที่สุดรองลงมา ได้แก่ *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* และ *V. vulnificus* ตามลำดับ

ลิลา และคณะ (2540) ศึกษาชนิดและปริมาณแบคทีเรียในตับและตับอ่อน ลำไส้ และเลือดของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) พบแบคทีเรียหลายชนิด ได้แก่ *Pseudomonas* spp., *Vibrio alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. damsela*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* และ *Vibrio* spp.

***Bacillus* spp.**

เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นแท่งยาว จัดอยู่ในครอบครัว Bacillaceae สามารถสร้างเอนโดสปอร์ได้ เจริญเติบโตโดยอาศัยออกซิเจน สามารถพบได้ทั่วไปในน้ำ ดิน และอากาศ จากคุณสมบัติที่สามารถสร้างสปอร์ได้ ทำให้สามารถเก็บรักษาในรูปของสปอร์ สะดวกต่อการเก็บรักษาเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการเลี้ยงกุ้งต่อไป

แบคทีเรียในกลุ่มที่สามารถสร้างสปอร์ได้จะมีอยู่ 6 สกุล (Todar, 2005) ได้แก่ *Bacillus, Sporolactobacillus, Clostridium, Desulfotomaculum, Sporosarcina* และ *Thermoactinomycetes* แต่การใช้แบคทีเรียที่สามารถสร้างสปอร์ได้เพื่อเป็นโปรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งในปัจจุบันนี้มีรายงานในสกุล *Bacillus* เช่น *Bacillus* sp. (Phianphak *et al.,* 1997), *Bacillus* สายพันธุ์ S11 (Rengpipat *et al.,* 1998a; Rengpipat *et al.,* 1998b; Rengpipat *et al.,* 2000) *Bacillus mycoides* (วรรณิภา, 2539) *B. subtilis* (นิตยา และคณะ, 2549; วัชริยา, 2549) *B. licheniformis* (นิตยา และคณะ, 2549; วัชริยา, 2549; Li *et al*., 2007) *Bacillus* P64 (Gullian *et al.*, 2004) *B. pumilus* และ *B. sphaericus* (วัชริยา, 2549)

Vibrio harveyi

เชื้อแบคทีเรียชนิดนี้สามารถพบได้ทั่วไปในน้ำเค็ม (Baumann *et al.*,1971) ขนาดกว้าง 0.5-0.8 ไมครอน ยาว 1.4-2.6 ไมครอน (Inglis *et al*., 1993) ไม่สร้างสปอร์ สามารถเจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไปที่มีการเติมเกลือ 1.5-3.5 เปอร์เซ็นต์ (ชลอ, 2528) ใช้อาหารเฉพาะ (selective media) คือ Thiosulfate Citrate Bile salts Sucrose (TCBS) agar เมื่อเจริญ จะให้โคโลนีสีเขียวหรือเหลือง ขนาดปานกลางถึงขนาดใหญ่ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความสามารถในการใช้น้ำตาลซูโครสของแต่ละสายพันธุ์ (Cowan, 1975) เคลื่อนไหวโดยใช้ monotrichous หรือ multitrichous flagella เมื่ออยู่ในอาหารเหลว แต่เมื่อเจริญในอาหารแข็งจะสร้าง lateral flagella จำนวนมาก (Buchanan *et al*., 1974)

แบคทีเรียชนิดนี้สามารถเรืองแสงได้ โดยในสภาวะที่มีออกซิเจน เชื้อ *V. harveyi* สามารถให้แสงสีเขียวแกมเหลืองออกมา เป็นปฏิกิริยาทางเคมีที่เกิดจากเอนไซม์ luciferase ไปเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของสารรีดิวซ์ flavin mononucleotide ($FMNH_2$) และ long chain aldehyde โดยโมเลกุลของออกซิเจน ทำให้เห็นการเรืองแสงได้ในที่มืด (Strehler, 1953) ดังสมการ

$$FMNH_2 + O_2 + RCHO \rightarrow FMN + H_2O + RCOOH + light$$

ประสิทธิภาพของแบคทีเรียสกุล *Bacillus* spp. ในการควบคุมเชื้อ *Vibrio* spp.

ในการศึกษาเกี่ยวกับการใช้ *Bacillus* เพื่อลดปริมาณเชื้อก่อโรค มีรายงานการทดลอง *in vitro* โดย Vaseeharan and Ramasamy (2003) ซึ่งพบว่าปริมาณ *Bacillus subtilis* BT23 ที่เพิ่มขึ้นจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อ *V. harveyi* และ Ravi *et al.* (2007) แยกเชื้อแบคทีเรียจากน้ำทะเล ตะกอนดิน และทางเดินอาหารของปลาทะเล พบว่า *Bacillus cereus* สามารถยับยั้งเชื้อ *Vibrio* sp. ได้

ในการศึกษาระดับ *in vivo* มีรายงานว่า *B. subtilis* (นิตยา และคณะ, 2549) และ *B. licheniformis* (นิตยา และคณะ, 2549; Li *et al*., 2007) สามารถลดปริมาณเชื้อ *Vibrio* sp. ในลำไส้ของกุ้งขาวได้ ($P<0.05$)

วัชริยา (2549) รายงานไว้ว่า เชื้อ *B. pumilus* และ *B. sphaericus* สามารถลดปริมาณของแบคทีเรียก่อโรค *Vibrio* spp. ในลำไส้กุ้งกุลาดำได้ และจากการศึกษาการแข่งขันในการใช้

สารอาหารระหว่างเชื้อ *Bacillus* และเชื้อ *V. harveyi* โดยวิธี broth co-culture assay โดยเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลองทั้งเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสม ปริมาณ เชื้อเริ่มต้น 10^3 CFU/ml นับปริมาณเชื้อที่ระยะเวลา 0, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง พบว่า *B. pumilus, B. sphaericus* และ *B. subtilis* สามารถลดปริมาณเชื้อ *V. harveyi* ได้ 47.90, 48.41 และ 46.47 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

Purivirojkul and Areechon (2007) ทดลองเลี้ยงเชื้อ *V. harveyi* AQVH ร่วมกับเชื้อ *Bacillus* โดยวิธี broth co-culture assay ในน้ำทะเลเทียม (ความเค็ม 20 ppt) พบว่าเชื้อ *Bacillus* WL01 และ *Bacillus* W1106 สามารถลดปริมาณเชื้อ *V. harveyi* AQVH ได้ 22.75 และ 20.23 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. กุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*, Boone) น้ำหนักประมาณ 12-16 กรัม จากฟาร์มเอกชน
2. อาหารกุ้งสำเร็จรูป
3. น้ำมันปลาหมึก
4. ดินขาว (Clay)
5. ถังไฟเบอร์กลาส ขนาดความจุ 1 ลูกบาศก์เมตร
6. ตู้กระจก ขนาดความจุ 150 ลิตร
7. บ่อซีเมนต์ ขนาดความจุ 1.5 ลูกบาศก์เมตร
8. เครื่องชั่ง
9. เครื่องให้อากาศพร้อมอุปกรณ์
10. Salino-Reflectometer
11. กระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร และ 3 มิลลิลิตร
12. เข็มฉีดยาขนาด 26G x 1.0 นิ้ว
13. Refrigerated Centrifuge
14. Microcentrifuge tube
15. Tri-Sodium Citrate Dihydrate
16. อาหารเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือด
    - 16.1 อาหารเลี้ยงเซลล์ Medium-199
    - 16.2 KCl
    - 16.3 $MgCl_2.6H_2O$
    - 16.4 $MgSO_4.7H_2O$
    - 16.5 $NaH_2PO_4.2H_2O$
    - 16.6 HCl
    - 16.7 NaOH
    - 16.8 L-glutamin
    - 16.9 $CaCl_2.H_2O$
    - 16.10 NaCl

16.11 $NaHCO_3$

16.12 Hepes

16.13 น้ำกลั่น

17. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการแยกเชื้อจากลำไส้และวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียในลำไส้

17.1 Homogenizer

17.2 อุปกรณ์ผ่าตัด

17.3 ตะเกียงแอลกอฮอล์

17.4 1.5% NaCl ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

17.5 Water Bath Shaker ชนิดควบคุมอุณหภูมิ

17.6 เครื่องปั่นเหวี่ยง

17.7 Vortex mixer

17.8 Microtube

17.9 จานเพาะเชื้อ

17.10 ไมโครปิเปต พร้อม Tip

17.11 แท่งแก้วสามเหลี่ยม

17.12 อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar (NA)

17.13 อาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose agar (TCBS)

17.14 หม้อนึ่งความดันไอ

17.15 ตู้บ่มเชื้อ

18. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการจำแนกชนิดของเชื้อโดยวิธีทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี

18.1 จานเพาะเชื้อ

18.2 Slide

18.3 ชุดสีย้อมแกรม

18.4 กล้องจุลทรรศน์

18.5 สารเคมีวิเคราะห์ทางชีวเคมี

18.6 อาหารเลี้ยงเชื้อ NA

18.7 ตู้บ่มเชื้อ

19. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการจำแนกชนิดของเชื้อโดยวิธีทางอณูชีวโมเลกุล

19.1 Plasmid DNA Extraction Kit (BioExcellence)

19.2 เอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzymes) *Eco* RI

19.3 Agarose

19.4 Amphicillin sodium salt

19.5 Ethidium bromide; EtBr

19.6 HiYield® Gel/PCR DNA Gragments Extraction Kit

19.7 GeneRulerTM 100 bp DNA Ladder Plus 0.05 mg

19.8 Glyceral

19.9 Isopropyl-β-D-thiogalactoside; IPTG

19.10 5-bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-galactopyranoside; X-gal

19.11 $MgCl_2$

19.12 Oligonucleotide M13 primer

19.13 Sterile distilled water; dH_2O

19.14 *Taq* DNA polymerase

19.15 10X *Taq* buffer with $(NH_4)_2SO_4$

19.16 100 mM dNTP

19.17 SOC medium (Super optimal culture medium)

19.18 Luria-Bertani (LB) broth/agar

19.19 Loading dye

19.20 Microtube, PCR tube, Test tube

19.21 Thermal cycler machine

19.22 ไม้จิ้มฟัน

19.23 เชื้อ *Escherichia coli* สายพันธุ์ JM109

19.24 เครื่องกำเนิดแสงUV

19.25 โปรแกรมคอมพิวเตอร์ BLASTN, Genetyx version 7.0 และ VecScreen

20. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* spp. ในการควบคุมเชื้อ *Vibrio harveyi*

20.1 *V. harveyi* (AQVH03)

20.2 จานเพาะเชื้อ

20.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ NA, Nutrient Broth (NB)

20.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS

20.5 NaCl

20.6 หลอดทดลอง

20.7 ไมโครปิเปต พร้อม Tip

20.8 ตู้บ่มเชื้อ

20.9 หม้อนึ่งความดันไอ

20.10 Vortex mixer

20.11 เครื่องปั่นเหวี่ยง

20.12 แท่งแก้วสามเหลี่ยม

20.13 Water Bath Shaker ชนิดควบคุมอุณหภูมิ

20.14 ตะเกียงแอลกอฮอล์

20.15 น้ำเค็ม 20 ppt ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

21. อุปกรณ์และสารเคมีในการวิเคราะห์ Total Haemocytes Count

21.1 Haemacytometer

21.2 กล้องจุลทรรศน์

21.3 Hand Counter

22. อุปกรณ์และสารเคมีในการวิเคราะห์กิจกรรม Phenoloxidase

22.1 เครื่องวัดการดูดกลืนคลื่นแสง Spectrophotometer

22.2 เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ

22.3 สารละลาย cacodylate buffer pH 7.4

22.4 L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA)

22.5 Trypsin

23. อุปกรณ์และสารเคมีในการวิเคราะห์กิจกรรม Phagocytosis

23.1 ยีสต์

23.2 Nacl

23.3 $MgCl_2.6H_2O$

23.4 $MgSO_4.7H_2O$

23.5 $CaCl_2.H_2O$

23.6 KCl

23.7 Glucose

23.8 Hepes

23.9 กระดาษกรอง 0.22 ไมโครเมตร

23.10 ชุดสีย้อม Wright and Giemsa

24. อุปกรณ์ในการทดสอบกิจกรรมของน้ำเลือดในการกำจัดเชื้อแบคทีเรีย (Bactericidal Activity)

24.1 *V. harveyi* (AQVH03)

24.2 Vortex mixer

24.3 Water Bath Shaker ชนิดควบคุมอุณหภูมิ

24.4 ตะเกียงแอลกอฮอล์

24.5 จานเพาะเชื้อ

24.6 หลอดทดลอง

24.7 ไมโครปิเปต พร้อม Tip

24.8 หม้อนึ่งความดันไอ

24.9 แท่งแก้วสามเหลี่ยม

24.10 เข็มเขี่ยเชื้อ

24.11 ตู้บ่มเชื้อ

24.12 อาหารเลี้ยงเชื้อ NB, TCBS

24.13 1.5% NaCl และ 2.6% NaCl ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

25. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์โปรตีน

25.1 Na_2CO_3

25.2 0.1 M NaOH

25.3 $CuSO_4$

25.4 Dipotassium tatrate

25.5 Folin

25.6 Albumin

วิธีการ

การทดลองที่ 1 ศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียสกุล *Bacillus* spp. ที่แยกได้จากลำไส้ของกุ้งขาวแวนนาไม ในการควบคุมเชื้อ *Vibrio harveyi*

1. การแยกเชื้อ *Bacillus* จากลำไส้ของกุ้งขาวแวนนาไม

เก็บตัวอย่างลำไส้กุ้งขาวแวนนาไมจากฟาร์มเลี้ยงกุ้งของเกษตรกรหลาย ๆ ฟาร์ม ในพื้นที่การเลี้ยงต่าง ๆ กัน ผ่าเอาลำไส้ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ บดลำไส้ให้ละเอียดด้วย Homogenizer เจือจางด้วยน้ำเกลือ 1.5% (w/v) นำสารละลายที่ได้ไปทำ heat shock ใน water bath ที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที และทำ cold shock โดยแช่ในน้ำเย็นทันที ประมาณ 1 นาทีหรือจนหลอดทดลองเย็น (Purivirojkul *et al.,* 2005) เพื่อทำให้สารละลายมีเพียงสปอร์ของแบคทีเรียเท่านั้น ซึ่งเป็นคุณสมบัติหนึ่งของเชื้อ *Bacillus* spp. ที่สามารถสร้างสปอร์ได้ เพื่อให้สปอร์ของเชื้อแบคทีเรียเจริญเป็นเซลล์ปกติ นำสารละลายมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar (NA) + 1.5% NaCl (w/v) ด้วยวิธี spread plate method บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง แยกโคโลนีเดี่ยวที่ได้ ที่มีลักษณะแตกต่างกัน นำไป streak plate บน Nutrient Agar (NA) + 1.5% NaCl (w/v) และบ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง จากนั้นแยกเชื้อให้บริสุทธิ์เป็น single colony และ นำเชื้อที่ได้ไปการทดสอบคุณสมบัติต่าง ๆ เพื่อจำแนกชนิดต่อไป

2. การจำแนกชนิดของเชื้อ *Bacillus* ที่แยกได้จากลำไส้ของกุ้งขาว

2.1 จำแนกชนิดของเชื้อ *Bacillus* spp. โดยศึกษาทางสัณฐานวิทยา และชีวเคมี โดยนำเชื้อที่แยกได้จากข้อ 1 มาทำการทดสอบคุณสมบัติต่าง ๆ ดังนี้

- การติดสีแกรมและรูปร่างของเซลล์
- การเคลื่อนที่
- ทดสอบความต้องการออกซิเจน
- ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส
- การเจริญที่ความเค็ม 0 - 60 ppt

- การทดสอบทางชีวเคมีบางชนิด ได้แก่ catalase test, oxidase test, Voges-Proskauer test (VP) การใช้น้ำตาล glucose (D-glucose) arabinose (L-arabinose) xylose (D-xylose) mannitol (D-mannitol) lactose (D-lactose), Egg yolk reaction, ปฏิกิริยา hydrolysis ของแป้ง และปฏิกิริยาการเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์

นำผลทั้งหมดมาทำการจำแนกชนิดของเชื้อโดยอ้างอิงตาม Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Holt *et al*., 1979) แล้วนำเชื้อ *Bacillus* spp. ที่แยกและจำแนกชนิดได้ไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

2.2 จำแนกชนิดของเชื้อ *Bacillus* spp. ด้วยวิธีทางด้านอณูชีวโมเลกุล โดยการศึกษาลำดับเบสในบางส่วนของยีน 16S rRNA (ดัดแปลงจากวิธีการของ Yamada *et al*., 2000 และ Goto *et al.*, 2000) เพื่อยืนยันผลการทดสอบชนิดของเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ที่แยกและจำแนกชนิดได้จากการศึกษาทางสัณฐานวิทยา และชีวเคมี เพื่อนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกในการผสมอาหารให้กุ้งขาวแวนนาไมกินในการทดลองที่ 2 และ 3

2.2.1 สกัด DNA จากเซลล์ของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. โดยวิธีการนำเชื้อ *Bacillus* sp. ที่เจริญแล้ว 18-24 ชั่วโมงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth (NB) + 1.5% NaCl (w/v) 0.5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 g นาน 15 นาที เพื่อแยกอาหารเลี้ยงเชื้อออก ให้ได้เฉพาะเซลล์แบคทีเรีย นำมาละลายตะกอนของเชื้อด้วย TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0 ใน 1 mM EDTA) 0.1 มิลลิลิตร แล้วนำมาต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที (Millar *et al*., 2000) จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 g นาน 15 นาที โดยส่วนใสที่ได้เป็น DNA ที่นำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.2.2 เพิ่มจำนวนชิ้นส่วน DNA เป้าหมาย ด้วยปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ Primer 20F: 5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' และ 1500R: 5'-GTTACCTTGTTACGACTT-3' (Accession number V00348) (อ้างอิงจาก Kawasaki *et al*., 1993) เตรียม master mix ดังนี้

10X *Taq* Buffer	1.50	ไมโครลิตร
10 µM Forward Primer	1.00	ไมโครลิตร
10 µM Reverse Primer	1.00	ไมโครลิตร

2.5 mM dNTP	1.50	ไมโครลิตร
Taq DNA Polymerase	0.10	ไมโครลิตร
$MgCl_2$	0.45	ไมโครลิตร
Distilled water	9.45	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	15.00	ไมโครลิตร

ใส่ master mix ทั้งหมดในหลอด PCR และเติม DNA ที่ได้จากข้อ 2.2.1 ปริมาณ 3 ไมโครลิตร จากนั้นจึงนำไปใส่ในเครื่อง Thermal cycler machine เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมาย โดยกำหนดให้สภาวะในการทำงานเป็นดังนี้คือ ช่วงแรก ใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที ช่วงที่สองใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 50 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที จำนวน 25 รอบ และช่วงที่สาม 72 องศาเซลเซียส 3 นาที ตรวจสอบผลความจำเพาะต่อ primer ของ DNA ของ *Bacillus* sp. ที่ได้ โดยใช้วิธีการ Agarose gel electrophoresis ที่ความเข้มข้น 1% ของ Agarose gel ในบัฟเฟอร์ 1X TBE ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ ตรวจสอบแถบ DNA จากการย้อมใน Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และถ่ายภาพภายใต้แสง UV

2.2.3 สกัด DNA จาก PCR products (DNA purification) โดยใช้ชุดสำเร็จรูป HiYield® Gel/PCR DNA Gragments Extraction Kit และตรวจสอบผลของ Purified Product ที่ได้ โดยใช้วิธีการ Agarose gel electrophoresis ที่ความเข้มข้น 1% ของ Agarose gel ในบัฟเฟอร์ 1X TBE ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ ตรวจสอบแถบ DNA จากการย้อมใน Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และถ่ายภาพภายใต้แสง UV

2.2.4 เชื่อมต่อ DNA ของยีนเข้ากับ pGEM-T Easy vector (Ligation) เพื่อสร้าง Plasmid DNA สายผสม ทำตามวิธีการของบริษัท Promega (USA)

2.2.5 ถ่ายโอน DNA ลูกผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน (Transformation) และตรวจสอบผลการโคลน (รายละเอียดในภาคผนวก)

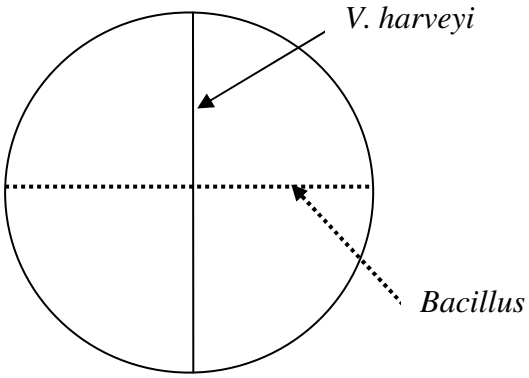
2.2.6 สกัด Plasmid DNA โดยใช้ชุดสกัด Plasmid DNA ของบริษัท BioExcellence

2.2.7 ตัด Plasmid DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (รายละเอียดในภาคผนวก)

2.2.8 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และวิเคราะห์ข้อมูล โดยนำ plasmid ส่งตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้าน 5' และ 3' โดยบริษัท Macrogen, Inc. (Korea) แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Vector และ Adaptor โดยใช้โปรแกรม Genetyx version 7.0 จากนั้นนำเอาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบ (Blast) กับลำดับของนิวคลีโอ-ไทด์ของยีนที่ได้มีการบันทึกไว้แล้วใน Genbank database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) โดยใช้โปรแกรม BlastN (http://www.ncbi.nih.gov/blast/BlastN) ซึ่งมีข้อกำหนดให้มีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์มากกว่า 100 คู่เบส และมีค่าความน่าจะเป็นของการเกิด Random matching (*E*-value) น้อยกว่า 10^{-4}

3. ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* spp. ที่แยกได้จากลำไส้ของกุ้งขาวในการยับยั้งเชื้อ *V. harveyi* โดยวิธี cross streak (ดัดแปลงจาก Lemos *et al*., 1985)

นำเชื้อ *Bacillus* แต่ละชนิดที่แยกได้จากลำไส้ของกุ้งขาว และ *V. harveyi* (AQVH03) จาก stock เชื้อของห้องปฏิบัติการสุขภาพสัตว์น้ำ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ทำการเพิ่มความรุนแรงของเชื้อแล้ว มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar (NA) + 1.5% NaCl (w/v) บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อ *V. harveyi* (AQVH03) เขี่ยเป็นรอยแรก โดยขีดยาวลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar (NA) + 1.5% NaCl (w/v) โดยใช้ loop ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ และ เขี่ยเชื้อ *Bacillus* ขีดยาวพาดขวางเชื้อ *V. harveyi* (ภาพที่ 1) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนแปลงทุก ๆ 24 ชั่วโมง สังเกตลักษณะการเจริญของเชื้อ *Bacillus* และเชื้อ *V. harveyi* จาก รอยที่พาดขวาง สังเกตว่าเชื้อ *Bacillus* มีการยับยั้งหรือเข้าครอบครองพื้นที่เชื้อ *V. harveyi* หรือไม่



ภาพที่ 1 การเขี่ยเชื้อเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* โดยวิธี cross streak

4. ทดสอบความสามารถในการเจริญร่วมกันของเชื้อ *Bacillus* และเชื้อ *V. harveyi* (co-culture assay) ในน้ำเค็ม (ดัดแปลงจาก Purivirojkul and Areechon, 2007)

นำเชื้อ *Bacillus* แต่ละชนิดที่แยกได้จากลำไส้ของกุ้งขาว และ *V. harveyi* (AQVH03) จาก stock เชื้อของห้องปฏิบัติการสุขภาพสัตว์น้ำ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ทำการเพิ่มความรุนแรงของเชื้อแล้ว มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth (NB) เติม NaCl 1.5% (w/v) เขย่าที่ความเร็ว 110 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ทำการเจือจางเชื้อแต่ละชนิดให้มีปริมาณเชื้อประมาณ 10^6 CFU/ml นำเชื้อแต่ละชนิดปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง ซึ่งมีน้ำเค็มปลอดเชื้อ ความเค็ม 20 ppt ปริมาตร 9 มิลลิลิตร (เชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^5 CFU/ml) โดยแบ่งกลุ่มทดลองตามจำนวนเชื้อ *Bacillus* ที่แยกได้ ยกตัวอย่างเช่น มี *Bacillus* ที่แยกได้จำนวน 7 เชื้อ ชุดการทดลองจะเป็น 15 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ ดังนี้

ชุดทดลองที่ 1 *V. harveyi* (AQVH03)

ชุดทดลองที่ 2 *Bacillus* ชนิดที่ 1 เพียงชนิดเดียว

ชุดทดลองที่ 3 *Bacillus* ชนิดที่ 2 เพียงชนิดเดียว

ชุดทดลองที่ 4 *Bacillus* ชนิดที่ 3 เพียงชนิดเดียว

ชุดทดลองที่ 5 *Bacillus* ชนิดที่ 4 เพียงชนิดเดียว

ชุดทดลองที่ 6 *Bacillus* ชนิดที่ 5 เพียงชนิดเดียว

ชุดทดลองที่ 7 *Bacillus* ชนิดที่ 6 เพียงชนิดเดียว

ชุดทดลองที่ 8 *Bacillus* ชนิดที่ 7 เพียงชนิดเดียว

ชุดทดลองที่ 9 *V. harveyi* (AQVH03) ร่วมกับ *Bacillus* ชนิดที่ 1

ชุดทดลองที่ 10 *V. harveyi* (AQVH03) ร่วมกับ *Bacillus* ชนิดที่ 2

ชุดทดลองที่ 11 *V. harveyi* (AQVH03) ร่วมกับ *Bacillus* ชนิดที่ 3

ชุดทดลองที่ 12 *V. harveyi* (AQVH03) ร่วมกับ *Bacillus* ชนิดที่ 4

ชุดทดลองที่ 13 *V. harveyi* (AQVH03) ร่วมกับ *Bacillus* ชนิดที่ 5

ชุดทดลองที่ 14 *V. harveyi* (AQVH03) ร่วมกับ *Bacillus* ชนิดที่ 6

ชุดทดลองที่ 15 *V. harveyi* (AQVH03) ร่วมกับ *Bacillus* ชนิดที่ 7

โดยชุดการทดลองที่ 9-15 เป็นการเลี้ยงเชื้อเพื่อศึกษาผลของการเจริญร่วมกันของเชื้อ *Bacillus* และเชื้อ *V. harveyi* (Co-culture)

นำสารละลายในแต่ละชุดการทดลองมานับจำนวนเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยชุดการทดลองที่ 1 จะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulfate Citrate Bile salts Sucrose (TCBS) agar ชุดการทดลองที่ 2 ถึง 8 เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar (NA) ผสม NaCl 1.5% (w/v) และนับปริมาณเชื้อทั้งหมดของชุดการทดลองที่ 9 ถึง 15 บนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิด ด้วยวิธี spread plate ที่ระยะเวลา 0, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง โดยปริมาณเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS จะเป็น

ปริมาณของเชื้อ *V. harveyi* ส่วนปริมาณของ *Bacillus* แต่ละชนิดจะคำนวณจากปริมาณเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA หักออกด้วยปริมาณเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS

บันทึกข้อมูล และแสดงผลโดยเปรียบเทียบปริมาณเชื้อ *V. harveyi* AQVH03 ที่เลี้ยงร่วมกับ *Bacillus* แต่ละชนิด กับปริมาณเชื้อ *V. harveyi* AQVH03 ที่เลี้ยงเดี่ยวเมื่อสิ้นสุดการทดลอง 120 ชั่วโมง

การทดลองที่ 2 การศึกษาชนิดและระดับความเข้มข้นของโปรไบโอติกที่เหมาะสมในการผสมอาหารเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม

1. การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด CRD (Complete Randomized Design) แบ่งชุดการทดลองตามชนิดของ *Bacillus* spp. ที่เลือกใช้ซึ่งพิจารณาจากผลของการทดลองที่ 1 ในแต่ละชุดการทดลองมี 3 ซ้ำ ชุดการทดลองที่ 1 คือ กุ้งขาวแวนนาไมเลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปปกติ ชุดการทดลองที่ 2 เป็นต้นไป คือ กุ้งขาวแวนนาไมเลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปผสม *Bacillus* spp. ชนิดต่าง ๆ และที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน

2. การเตรียมสัตว์ทดลอง

นำกุ้งขาวแวนนาไมน้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 12-16 กรัม มาเลี้ยงในถังไฟเบอร์กลาสขนาดความจุ 1 ลูกบาศก์เมตร เพื่อปรับสภาพก่อนเริ่มการทดลอง เลี้ยงในน้ำระดับความเค็ม 20 ppt ด้วยอาหารสำเร็จรูปปกติ โดยให้อาหาร 4 ครั้งต่อวัน เวลาประมาณ 7.00 น. 11.00 น. 15.00 น. และ 20.00 น. ให้อากาศอย่างเพียงพอ เปลี่ยนถ่ายน้ำและดูดตะกอนทุก ๆ 2 วัน เป็นเวลา 1 สัปดาห์ นำกุ้งขาวแวนนาไมใส่ในบ่อซีเมนต์ขนาดความจุน้ำประมาณ 1.5 ลูกบาศก์เมตร เติมน้ำความเค็ม 20 ppt ใส่กุ้งทดลองบ่อละ 15 ตัว และให้อากาศอย่างเพียงพอตลอดการทดลอง เปลี่ยนถ่ายน้ำ และดูดตะกอนทุก ๆ 2 วัน เลี้ยงกุ้งทดลองให้มีความคุ้นเคยกับสภาพทดลองนาน 1 สัปดาห์ก่อนเริ่มการทดลอง

3. การเตรียมอาหารกุ้งผสมแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ที่แยกได้

เลี้ยงแบคทีเรียสกุล *Bacillus* แต่ละชนิดในอาหาร Nutrient Broth (NB) + 1.5% NaCl (w/v) เป็นเวลา 48 ชั่วโมงขึ้นไป จนเชื้อมีการสร้างสปอร์ในปริมาณที่มากพอ (ประมาณ 10^8 - 10^{10} CFUต่อกรัม) โดยจะทำการสุ่มตรวจการสร้างสปอร์ของเชื้อด้วยวิธีการย้อมสปอร์ เมื่อได้เชื้อที่มีการสร้างสปอร์มากพอแล้ว นำสารละลาย NaCl 0.85 เปอร์เซ็นต์ ละลายเชื้อแบคทีเรีย แล้วนำสารละลายเชื้อแบคทีเรียที่ได้ไปเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งส่วนใส และนำตะกอนที่ได้ไปผสมกับผง clay ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อและบดละเอียดแล้ว ในอัตราส่วนแบคทีเรีย 1 ส่วน : ผง clay 1 ส่วน ทำให้แห้งโดยอบแห้งที่อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส และนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่ได้ โดยมีจำนวน *Bacillus* sp. ประมาณ 10^7 CFUต่อกรัม นำโปรไบโอติกที่เตรียมไว้มาผสมกับอาหารเม็ดสำเร็จรูปตามชนิดและระดับความเข้มข้นในแต่ละชุดการทดลอง แล้วใช้น้ำมันปลาหมึกเคลือบ ผึ่งให้แห้งเก็บรักษาอาหารที่เตรียมได้ไว้ในที่แห้งและเย็น

4. อาหารและการให้อาหาร

ชั่งน้ำหนักกุ้งก่อนเริ่มการทดลอง

ใช้อาหารสำเร็จรูปไม่ผสมโปรไบโอติกในกลุ่มควบคุม และให้อาหารสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติกตามชนิดและระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 ให้อาหารสำเร็จรูปไม่ผสมโปรไบโอติก (control)

ชุดการทดลองที่ 2 ให้อาหารสำเร็จรูปที่ผสมเชื้อแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ชนิดที่ 1 ปริมาณ 3 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 3 ให้อาหารสำเร็จรูปที่ผสมเชื้อแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ชนิดที่ 1 ปริมาณ 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 4 ให้อาหารสำเร็จรูปที่ผสมเชื้อแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ชนิดที่ 2 ปริมาณ 3 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 5 ให้อาหารสำเร็จรูปที่ผสมเชื้อแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ชนิดที่ 2 ปริมาณ 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 6 ให้อาหารสำเร็จรูปที่ผสมเชื้อแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ชนิดที่ 1+2 ปริมาณ 3 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 7 ให้อาหารสำเร็จรูปที่ผสมเชื้อแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ชนิดที่ 1+2 ปริมาณ 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ให้อาหารทดลอง 4 ครั้งต่อวัน ในเวลาประมาณ 7.00 น. 11.00 น. 15.00 น. และ 20.00 น. ในอัตรา 5 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวกุ้งต่อวัน

เมื่อให้อาหารทดลองครบ 1 เดือน ประเมินอัตราการเจริญเติบโต โดยการชั่งน้ำหนัก

5. การศึกษาระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม

ทำการสุ่มกุ้งในแต่ละชุดการทดลองชุดการทดลองละ 10 ตัว ทุก ๆ 10 วัน เป็นเวลา 30 วัน โดยเจาะเลือดบริเวณ Ventral Sinus ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรด้วยเข็มฉีดยา ซึ่งภายในบรรจุสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (anticoagulant) ในอัตราส่วน 1:2 นำเลือดที่ได้ไปวิเคราะห์ ปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมด กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase กิจกรรมของเม็ดเลือดในการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม (Phagocytic activity) กิจกรรมในการทำลายเชื้อแบคทีเรียของน้ำเลือด (Bactericidal activity) ดังนี้

5.1 การศึกษาปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมด (Total Hemocytes Count)

นำตัวอย่างเลือดกุ้งจากการเก็บตัวอย่างข้างต้นมานับจำนวนเม็ดเลือดทั้งหมด โดยใช้ Hemacytometer และคำนวณปริมาณเม็ดเลือดเป็นจำนวนเซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิลิตร

5.2 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase (phenoloxidase activity)

5.2.1 การเก็บตัวอย่างเลือดและเตรียม Hemocyte Lysate Supernatant (HLS)

เก็บตัวอย่างเลือดจากกุ้งแต่ละตัว โดยเจาะเลือดจากบริเวณ Ventral Sinus ประมาณ 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับ K-199 pH 7.4 ที่เติม L-cysteine 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารป้องกันเลือดแข็งตัว จนได้ปริมาณครบ 1 มิลลิลิตร หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใสไปวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมในการทำลายเชื้อแบคทีเรียของน้ำเลือดตาม วิธีข้อ 5.4 ส่วนตะกอนที่ได้นำมาล้างใน K-199 และละลายในสารละลาย cacodylate buffer pH 7.4 แล้วนำสารละลายเซลล์เม็ดเลือดมา 0.2 มิลลิลิตร เพื่อนำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเม็ดเลือดในการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม ตามวิธีข้อ 5.3 ส่วนที่เหลือนำมาหมุนเหวี่ยงให้เซลล์เม็ดเลือดแตกและตกตะกอนที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส แยกส่วนใส ซึ่งเป็น Hemocyte Lysate Supernatant (HLS) เก็บไว้ใช้ในต่อไป

5.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase ตามวิธีการของกิจการ และคณะ (2543ค)

นำ HLS 200 ไมโครลิตร ผสมรวมกับสารละลายทริปซิน (0.1 เปอร์เซ็นต์ ทริปซินใน cacodylate buffer) 200 ไมโครลิตร ทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาประมาณ 2 นาที เติมสารละลาย L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA, 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) 200 ไมโครลิตร ปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ทุก ๆ 2 นาที โดยเปรียบเทียบกับสารละลายควบคุม (blank) ซึ่งใช้ทริปซิน ผสมกับ L-DOPA และ cacodylate buffer แทน HLS ทำการวัดค่า OD จนปฏิกิริยาเกิดอย่างสมบูรณ์ วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนใน HLS โดยวิธีของ Lowry *et al.* (1951) ตามวิธีข้อ 5.2.3 นำค่าที่ได้มาคำนวณหน่วย (unit) ของเอนไซม์ phenoloxidase โดยกำหนดค่าดังนี้

1 หน่วยของ phenoloxidase = $\triangle$ OD_{490}/นาที/มิลลิกรัม โปรตีน

5.2.3 การวิเคราะห์โปรตีนใน HLS ตามวิธีของ Lowry *et al.* (1951)

นำ HLS มา 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 0.9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำมา 0.1 มิลลิลิตร เติม Reagent c (รายละเอียดในการเตรียมสารอยู่ในภาคผนวก) 1 มิลลิลิตร เขย่าแล้วทิ้งไว้ 10 นาที หลังจากนั้นเติม Reagent d (รายละเอียดในการเตรียมสารอยู่ในภาคผนวก) 0.1 มิลลิลิตร เขย่าแล้วทิ้งไว้ 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เทียบกับสารละลายมาตรฐานของ albumin โดย blank จะใช้สารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 0.9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำมา 0.1 มิลลิลิตร เติม Reagent c และ Reagent d ตามปริมาตร ที่กำหนดไว้ข้างต้น

5.3 การศึกษากิจกรรมของเม็ดเลือดในการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytic activity) ตามวิธีดัดแปลงจากรายงานของ Itami *et al*. (1994)

นำสารละลายเซลล์จากข้อ 5.2.1 จำนวน 0.2 มิลลิลิตร มาเลี้ยงบน cover slip โดย spread ให้ทั่ว ทิ้งไว้ 30 นาที แล้วล้างด้วย Shrimp Saline 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้นหยดสารละลาย Heat-Killed Yeast ที่มีจำนวนเซลล์ประมาณ 5.0×10^8 2 มิลลิลิตร ลงไป ทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย Shrimp Saline 5 ครั้ง หยดน้ำยา fixative 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที ทิ้งไว้ให้แห้ง 20-60 นาที แล้วย้อมสีด้วย Wright and Giemsa stain 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ 5 นาทีแล้วล้างด้วยน้ำกลั่น ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งข้ามคืน แล้ว mount ด้วย Eukitt หรือน้ำยาอื่น

ทำการนับจำนวนเม็ดเลือดกุ้งประมาณ 200 เซลล์ต่อตัวอย่างกุ้ง 1 ตัว โดยเป็นจำนวนเม็ดเลือดกุ้งที่จับกินยีสต์ และนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาค่า Percent Phagocytosis ดังรายละเอียดในภาคผนวก

5.4 การศึกษากิจกรรมของน้ำเลือดกุ้งในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย (Bactericidal activity)

นำซีรั่มจากข้อ 5.2.1 มาเจือจางด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 2.6 เปอร์เซ็นต์ ให้ระดับเจือจางที่ 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 และ 1:128 โดยปรับปริมาตรการเจือจางให้ได้หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* (AQVH03) มาเลี้ยงในอาหารเหลว Nutrient Broth (NB) + โซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ในหลอดทดลองปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยเลี้ยงเชื้อในwater bath shaker ควบคุมอุณหภูมิที่ 32 องศาเซลเซียส (เขย่าที่ความเร็ว 110 รอบต่อนาที) เป็นระยะเวลา

24 ชั่วโมง นำเชื้อ *V. harveyi* มาปั่นล้างด้วย โซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที 3 ครั้ง นำเชื้อที่ได้มาละลายในโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ นำไป วัดค่าดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร ให้ได้ค่าประมาณ 0.1 - 0.15 (มีปริมาณเชื้อประมาณ 10^7 CFU/ml) จากนั้นนำเชื้อที่เตรียมได้มาเติมลงในซีรั่มแต่ละความเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 3 ชั่วโมง แล้วนำส่วนผสมในแต่ละหลอดมานับจำนวนเชื้อแบคทีเรีย โดยวิธี spread plate ใน TCBS agar บันทึกค่าของการเจือจางซีรั่มที่สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียลงได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (เทียบกับ control ที่มีเฉพาะเชื้อ *V. harveyi*) ในระยะเวลา 3 ชั่วโมง

6. การศึกษาปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในลำไส้

เก็บตัวอย่างลำไส้กุ้งในแต่ละชุดการทดลองเมื่อสิ้นสุดการทดลอง เมื่อครบระยะเวลาการให้อาหารผสมโปรไบโอติกเป็นเวลา 1 เดือน และหลังจากหยุดให้อาหารผสมโปรไบโอติกไปแล้วที่ระยะเวลา 20 วัน โดยสุ่มกุ้งจากแต่ละชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 10 ตัว มาแยกลำไส้ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ เพื่อนำไปวิเคราะห์หาจำนวนเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. และ *Bacillus* spp. ทั้งหมดในลำไส้ เพื่อประเมินการดำรงอยู่ของโปรไบโอติกในลำไส้กุ้ง

6.1 จำนวนเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ทั้งหมดในลำไส้

ผ่ากุ้งแล้วนำลำไส้ของกุ้งแต่ละตัวมาชั่งน้ำหนัก นำมาบดให้ละเอียดด้วย Homogenizer แล้วเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรประมาณ 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายมา 0.1 มิลลิลิตร เพื่อนับปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp.โดยวิธี spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar

6.2 จำนวนเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ทั้งหมดในลำไส้

นำสารละลายที่เหลือจากข้อ 6.1 มา 0.1 มิลลิลิตร เพื่อนับปริมาณเชื้อ *Bacillus* spp. โดยวิธี spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar (NA) + 1.5% NaCl (w/v) โดยพิจารณาจากลักษณะของโคโลนีซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของ *Bacillus* spp. และย้อมแกรมดูลักษณะของตัวเซลล์แบคทีเรียซึ่งจะเป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปแท่งยาว

7. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ความแตกต่างของชุดการทดลองของข้อมูล น้ำหนักตัว, Total Hemocytes Count, Phenoloxidase Activity, Percent Phagocytosis, จำนวนเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* sp. และ *Bacillus* sp. ทั้งหมดในลำไส้ โดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) (อนันต์ชัย, 2542; บุญอ้อม, 2550)

การทดลองที่ 3 การศึกษาระยะเวลาการให้โปรไบโอติกที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม

1. การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด CRD (Complete Randomized Design) แบ่งชุดการทดลองเป็น 3 ชุดการทดลองแต่ละชุดการทดลองมี 3 ซ้ำ โดยในแต่ละชุดการทดลองให้อาหารอาหารสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติกในระยะเวลาที่ต่างกัน

2. การเตรียมสัตว์ทดลอง

นำกุ้งขาวแวนนาไมน้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 12-16 กรัม มาเลี้ยงในถังไฟเบอร์กลาสขนาดความจุ 1 ลูกบาศก์เมตร เพื่อปรับสภาพก่อนเริ่มการทดลอง เลี้ยงในน้ำระดับความเค็ม 20 ppt ด้วยอาหารสำเร็จรูปปกติ โดยให้อาหาร 4 ครั้งต่อวัน เวลาประมาณ 7.00 น. 11.00 น. 15.00 น. และ 20.00 น. ให้อากาศอย่างเพียงพอ เปลี่ยนถ่ายน้ำและดูดตะกอนทุก ๆ 2 วัน เป็นเวลา 1 สัปดาห์ นำกุ้งขาวแวนนาไมใส่ในบ่อซีเมนต์ขนาด 1.5 ลูกบาศก์เมตร ใส่กุ้งทดลองบ่อละ 15 ตัว และให้อากาศอย่างเพียงพอตลอดการทดลอง เปลี่ยนถ่ายน้ำและดูดตะกอนทุก ๆ 2 วัน เลี้ยงกุ้งทดลองให้มีความคุ้นเคยกับสภาพทดลองนาน 1 สัปดาห์ก่อนเริ่มการทดลอง

3. อาหารและการให้อาหาร

ชั่งน้ำหนักกุ้งก่อนเริ่มการทดลอง

ใช้อาหารสำเร็จรูปไม่ผสมโปรไบโอติกในกลุ่มควบคุม และให้อาหารสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติก โดยเลือกชนิดและระดับความเข้มข้นที่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้จากการทดลองที่ 2 และให้อาหารนี้ในระยะเวลาการให้ที่แตกต่างกัน ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 ให้อาหารสำเร็จรูปไม่ผสมโปรไบโอติก (control) ทุกวัน

ชุดการทดลองที่ 2 ให้อาหารสำเร็จรูปที่ผสมโปรไบโอติกทุกวัน

ชุดการทดลองที่ 3 ให้อาหารสำเร็จรูปที่ผสมโปรไบโอติกวันเว้นวัน

การเตรียมอาหารทดลองผสมโปรไบโอติกตามชนิดและความเข้มข้นที่ได้จากการทดลองที่ 2 เคลือบด้วยน้ำมันปลาหมึก แล้วผึ่งให้แห้ง ส่วนอาหารในชุดควบคุมจะเคลือบด้วยน้ำมันปลาหมึกเท่านั้นให้อาหารทดลอง 4 ครั้งต่อวัน ในเวลาประมาณ 7.00 น. 11.00 น. 15.00 น. และ 20.00 น. ในอัตรา 5 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวกุ้งต่อวัน ให้อาหารทดลองเป็นเวลา 1 เดือน ทำการชั่งน้ำหนักกุ้งทุกชุดการทดลอง และเลี้ยงกุ้งทุกชุดการทดลองต่ออีก 20 วัน ด้วยอาหารปกติที่ไม่ผสมโปรไบโอติก

4. การศึกษาระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม

ระหว่างการให้อาหารทดลองเป็นเวลา 1 เดือน ทำการสุ่มกุ้งในแต่ละชุดการทดลองทุก ๆ 10 วัน ชุดการทดลองละ 10 ตัว เจาะเลือดบริเวณ Ventral Sinus ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรด้วยเข็มฉีดยา ซึ่งภายในบรรจุสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (anticoagulant) ในอัตราส่วน 1:2 นำเลือดที่ได้ไปวิเคราะห์ ปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมด กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase กิจกรรมของเม็ดเลือดในการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม และกิจกรรมในการทำลายเชื้อแบคทีเรียของน้ำเลือดตามขั้นตอนในการทดลองที่ 2 เมื่อครบ 1 เดือนแล้วจะให้อาหารปกติที่ไม่ผสมโปรไบโอติกในทุกชุดการทดลอง และตรวจระดับภูมิคุ้มกันทุก ๆ 10 วัน จนกระทั่งภูมิคุ้มกันลดลง

5. การศึกษาปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในลำไส้

หลังจากให้อาหารทดลองเป็นเวลา 1 เดือน นำกุ้งจากการสุ่มกุ้งชุดการทดลองละ 10 ตัว นำมาผ่าหลังเพื่อเก็บลำไส้กุ้งไปวิเคราะห์หาจำนวนเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. และ *Bacillus* spp. ตามขั้นตอนของการทดลองที่ 2 จากนั้นให้อาหารปกติที่ไม่ผสมโปรไบโอติกเหมือนกันทุกชุดการทดลองอีกเป็นเวลา 20 วัน แล้ววิเคราะห์หาจำนวนเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. และ *Bacillus* spp. ทั้งหมดในลำไส้เพื่อประเมินการดำรงอยู่ของโปรไบโอติกในลำไส้กุ้งอีกครั้ง

6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ความแตกต่างของชุดการทดลองของข้อมูล น้ำหนักตัว, Total Hemocytes Count, Phenoloxidase Activity, Percent Phagocytosis, Phagocytic Index จำนวนเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* sp. และ *Bacillus* sp. ทั้งหมดในลำไส้ โดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยวิธี Duncan’s New Multiple Range Test (DMRT) (อนันต์ชัย, 2542; บุญอ้อม, 2550)

สถานที่และระยะเวลาทำการวิจัย

สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการสุขภาพสัตว์น้ำ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

ระยะเวลาทำการวิจัย

เริ่มทำการทดลอง เดือนตุลาคม 2551 และ สิ้นสุดการทดลองในเดือนพฤษภาคม 2552

ผลและวิจารณ์

ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 ศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียสกุล *Bacillus* spp. ที่แยกได้จากลำไส้ของกุ้งขาวแวนนาไม ในการควบคุมเชื้อ *Vibrio harveyi*

1. ผลการแยกและจำแนกชนิดของเชื้อ *Bacillus* ที่แยกได้จากลำไส้ของกุ้งขาวแวนนาไม

1.1 การจำแนกชนิดของเชื้อ *Bacillus* ด้วยวิธีทางสัณฐานวิทยา และศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อที่แยกจากลำไส้ของกุ้งขาวแวนนาไม พบเชื้อสกุล *Bacillus* จำนวน 5 ชนิด จากลำไส้ของกุ้งขาว จากแหล่งเลี้ยงที่เลี้ยงด้วยความเค็มน้ำแตกต่างกัน คือ จากตัวอย่างกุ้งขาวที่เก็บตัวอย่างจากจังหวัดนครปฐม ซึ่งเลี้ยงด้วยความเค็มต่ำ (ความเค็ม 4-7 ppt) พบเชื้อ *Bacillus* 2 ชนิด ได้แก่ *Bacillus licheniformis* (กำหนดรหัสเชื้อให้เป็น BLF) และ *B. cereus* (กำหนดรหัสเชื้อให้เป็น BCEF)

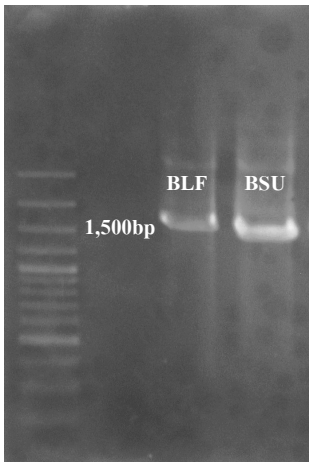
จากตัวอย่างกุ้งขาวที่เก็บตัวอย่างจากจังหวัดฉะเชิงเทรา ซึ่งเลี้ยงด้วยความเค็มปกติ (ความเค็ม 15 ppt) พบเชื้อ *Bacillus* 5 ชนิด ได้แก่ *B. licheniformis* (กำหนดรหัสเชื้อให้เป็น BLS) *B. cereus* (กำหนดรหัสเชื้อให้เป็น BCES) *B. subtilis* (กำหนดรหัสเชื้อให้เป็น BSU) *B. coagulans* (กำหนดรหัสเชื้อให้เป็น BCO) และ *B. sphaericus* (กำหนดรหัสเชื้อให้เป็น BSP) โดยแสดงผลการทดสอบเพื่อจำแนกชนิดของเชื้อและคุณลักษณะอื่น ๆ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบเชื้อ *Bacillus* sp. ที่แยกได้จากลำไส้ของกุ้งขาวแวนนาไม โดยศึกษาทางสัณฐานวิทยาและวิธีทางชีวเคมี

คุณลักษณะการทดสอบ	**BLF**	**BLS**	**BCEF**	**BCES**	**BCO**	**BSU**	**BSP**
การย้อมแกรม	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก
รูปร่าง	แท่งยาว	แท่งยาว	แท่งยาว	แท่งยาว	แท่งยาว	แท่งยาว	แท่งยาว
การสร้างเอนไซม์ Catalase	+	+	+	+	+	+	+
การสร้างเอนไซม์ Oxidase	+	+	+	+	+	+	+
การทดสอบด้วยอาหาร Triple Sugar Ion agar	K/A	K/A	K/A	K/K	K/A	K/A	K/K
การเคลื่อนที่	+	+	+	+	+	+	+
การเจริญได้ที่อุณหภูมิ 42 ^{o}C	+	+	+	+	+	+	+
การใช้น้ำตาล							
D-glucose	+	+	+	+	+	+	-
L-arabinose	+	+	-	-	+	-	-
D-xylose	+	+	-	-	+	+^{w}	-
D-mannitol	+	+	-	-	+	+	-
ปฏิกิริยาเปลี่ยนไนเตรทไปเป็นไนไตรท์	+	+	+	+	+	+	-
Egg yolk reaction	-	-	+	+	-	nd	-
การเจริญในสภาพไร้ออกซิเจน	+	+	+	+	+	-	-
ปฏิกิริยา hydrolysis ของแป้ง	+	+	+	+	+	+	-
Production of Alkaline reaction in VP broth	+	+	+	+	-	+	-
การเจริญที่ความเค็ม 0 - 60 ppt	+	+	+	+	+	+	+

หมายเหตุ + = ปฏิกิริยาให้ผลบวก, - = ปฏิกิริยาให้ผลลบ, w = ให้ผลการทดสอบไม่ชัดเจน, nd = วัดผลการทดสอบไม่ได้, K/K = Alkaline/Alkaline, K/A = Alkaline/Acid

1.2 ผลการจำแนกชนิดของเชื้อ *Bacillus* ด้วยวิธีทางอณูชีวโมเลกุลของ *Bacillus* ที่ทราบชนิดจากการจากศึกษาทางสัณฐานวิทยาและการทดสอบทางชีวเคมีแล้ว คือ *B. licheniformis* (BLF) และ *B. subtilis* (BSU) นั้น พบว่าเชื้อ *Bacillus* ทั้งสองชนิดมีขนาดของ PCR product ของยีน 16S rRNA ประมาณ 1,500 bp (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 PCR product ของ BLF และ BSU เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค Gel electophoresis ปรากฏแถบ PCR product บนเจลมีขนาดประมาณ 1,500 bp

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับของนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ได้มีการบันทึกไว้ใน Genbank database โดยใช้โปรแกรม BlastN พบว่ามีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์มากกว่า 100 คู่เบส และมีค่าความน่าจะเป็นของการเกิด Random matching (*E*-value) น้อยกว่า 10^{-4} ดังนี้

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16s rRNA ของ BLF มีความคล้ายคลึงกับ ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ *B. licheniformis* strain AnBa7 มากที่สุดโดยมีค่า score ของความคล้ายคลึง และ *E*-value สูงสุด 1,273 และ 0.0 ตามลำดับ (ภาพที่ 3)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AY887129.1	Bacillus licheniformis strain AnBa7 16S ribosomal RNA gene, partial	1273	1273	100%	0.0	98%
DQ351930.2	Bacillus licheniformis strain K10 16S ribosomal RNA gene, partial se	1262	1262	100%	0.0	98%
FJ957830.1	Uncultured Bacillus sp. clone JPL-4 O15 16S ribosomal RNA gene, p	1256	1256	100%	0.0	98%
FJ957815.1	Uncultured Bacillus sp. clone JPL-4 K05 16S ribosomal RNA gene, p	1256	1256	100%	0.0	98%
FJ957789.1	Uncultured Bacillus sp. clone JPL-4 C15 16S ribosomal RNA gene, p	1256	1256	100%	0.0	98%

ภาพที่ 3 เปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16s rRNA ของ BLF กับแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ในฐานข้อมูลด้วย BlastN programs

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16s rRNA ของ BSU มีความคล้ายคลึงกับ ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ *B. subtilis* strain GZUB25, GZUB3, ZJ06 และ Akira3 มากที่สุดโดยมีค่า score ของความคล้ายคลึง และ *E*-value สูงสุด 1,232 และ 0.0 ตามลำดับ (ภาพที่ 4)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
FJ434661.1	Bacillus subtilis strain GZUB25 16S ribosomal RNA gene, partial seq	1232	1232	78%	0.0	98%
FJ434644.1	Bacillus subtilis strain GZUB3 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	1232	1232	78%	0.0	98%
EU266071.1	Bacillus subtilis strain ZJ06 16S ribosomal RNA gene, partial sequen	1232	1232	78%	0.0	98%
AY530750.1	Bacillus subtilis strain Akira3 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	1232	1232	78%	0.0	98%

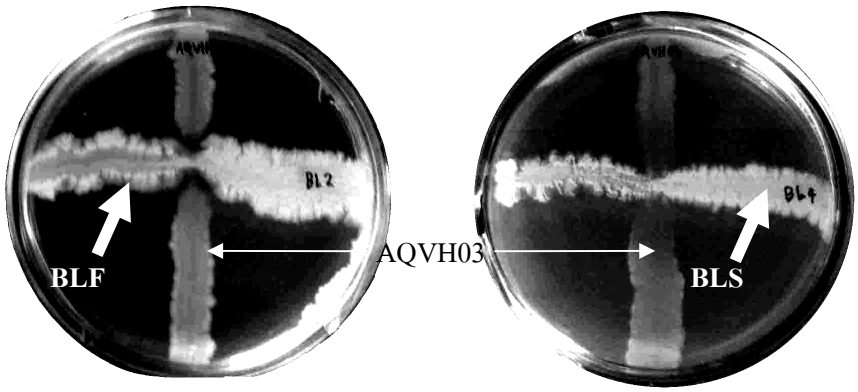
ภาพที่ 4 เปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16s rRNA ของ BSU กับแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ในฐานข้อมูลด้วย BlastN programs

2. ผลการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* spp. ในการควบคุมเชื้อ *Vibrio harveyi*

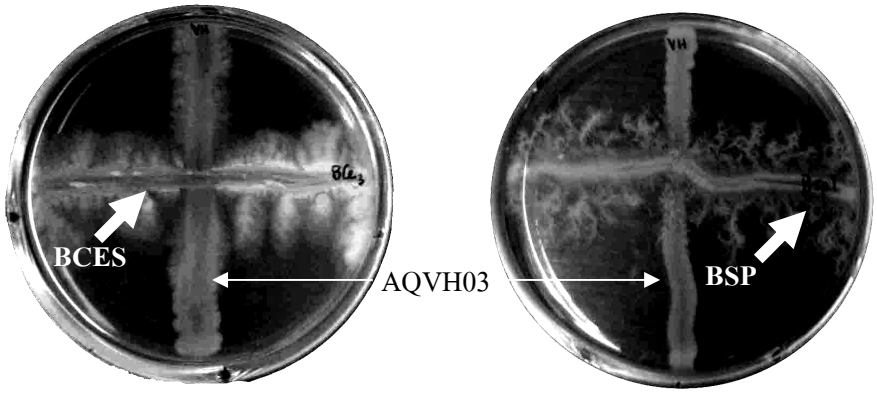
2.1 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* spp. ในการยับยั้งเชื้อ *Vibrio harveyi* โดยวิธี cross streak

จากผลการทดลองที่ 1 นำเชื้อ *Bacillus* sp. ที่แยกได้ทั้ง 7 เชื้อ มาทำการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* spp. ในการยับยั้งเชื้อ *Vibrio harveyi* โดยวิธี cross streak หลังจากบ่มเชื้อเป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบว่า *Bacillus* BLF และ *Bacillus* BLS สามารถยับยั้ง (inhibition) เชื้อ *Vibrio harveyi* ได้ โดยทำให้เกิดพื้นที่ยับยั้ง (clear zone) บริเวณรอยที่พาดขวาง ดังภาพที่ 5 เชื้อ *Bacillus* BCES และ *Bacillus* BSP แสดงการครอบครองพื้นที่ (colonization) เชื้อ *V. harveyi*

ดังภาพที่ 6 ส่วนเชื้อที่ไม่แสดงการยับยั้ง *V. harveyi* คือเชื้อ *Bacillus* BCEF, *Bacillus* BCO และ *Bacillus* BSU



ภาพที่ 5 การยับยั้งเชื้อ *Vibrio harveyi* (inhibition) ของเชื้อ *Bacillus licheniformis* BLF และ *Bacillus licheniformis* BLS โดยวิธี cross streak



ภาพที่ 6 การเข้าครอบครองพื้นที่เชื้อ *Vibrio harveyi* (colonization) ของเชื้อ *Bacillus cereus* BCES และ *Bacillus sphaericus* BSP โดยวิธี cross streak

2.2 ความสามารถในการเจริญร่วมกันของเชื้อ *Bacillus* spp. และเชื้อ *Vibrio harveyi* (Co-culture assay) ในน้ำเค็ม

Bacillus ที่แยกจากผลการทดลองที่ 1 มีได้จำนวน 7 เชื้อ แบ่งเป็น 15 ชุดการทดลอง ดังนี้

ชุดทดลองที่ 1 เลี้ยงเชื้อ *V. harveyi* (AQVH03) เพียงชนิดเดียว

ชุดทดลองที่ 2 เลี้ยงเชื้อ *B. licheniformis* (BLF) เพียงชนิดเดียว

ชุดทดลองที่ 3 เลี้ยงเชื้อ *B. licheniformis* (BLS) เพียงชนิดเดียว

ชุดทดลองที่ 4 เลี้ยงเชื้อ *B. cereus* (BCEF) เพียงชนิดเดียว

ชุดทดลองที่ 5 เลี้ยงเชื้อ *B. cereus* (BCES) เพียงชนิดเดียว

ชุดทดลองที่ 6 เลี้ยงเชื้อ *B. coagulans* (BCO) เพียงชนิดเดียว

ชุดทดลองที่ 7 เลี้ยงเชื้อ *B. sphaericus* (BSP) เพียงชนิดเดียว

ชุดทดลองที่ 8 เลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* (BSU) เพียงชนิดเดียว

ชุดทดลองที่ 9 เลี้ยงเชื้อ *V. harveyi* (AQVH03) ร่วมกับเชื้อ *B. licheniformis* (BLF)

ชุดทดลองที่ 10 เลี้ยงเชื้อ *V. harveyi* (AQVH03) ร่วมกับเชื้อ *B. licheniformis* (BLS)

ชุดทดลองที่ 11 เลี้ยงเชื้อ *V. harveyi* (AQVH03) ร่วมกับเชื้อ *B. cereus* (BCEF)

ชุดทดลองที่ 12 เลี้ยงเชื้อ *V. harveyi* (AQVH03) ร่วมกับเชื้อ *B. cereus* (BCES)

ชุดทดลองที่ 13 เลี้ยงเชื้อ *V. harveyi* (AQVH03) ร่วมกับเชื้อ *B. coagulans* (BCO)

ชุดทดลองที่ 14 เลี้ยงเชื้อ *V. harveyi* (AQVH03) ร่วมกับเชื้อ *B. sphaericus* (BSP)

ชุดทดลองที่ 15 เลี้ยงเชื้อ *V. harveyi* (AQVH03) ร่วมกับเชื้อ *B. subtilis* (BSU)

ผลการเจริญของเชื้อ *V. harveyi* AQVH03 ที่เลี้ยงร่วมกับ *Bacillus* spp. ทุกชนิด พบว่า *V. harveyi* AQVH03 มีการเพิ่มจำนวนเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง และลดลงที่ 48 ชั่วโมง ยกเว้น *V. harveyi* AQVH03 ที่เลี้ยงร่วมกับเชื้อ *Bacillus sphaericus* BSP จะเพิ่มจำนวนสูงสุดที่ 48 ชั่วโมง และลดลงที่ 72 ชั่วโมง (ภาพที่ 7-13)

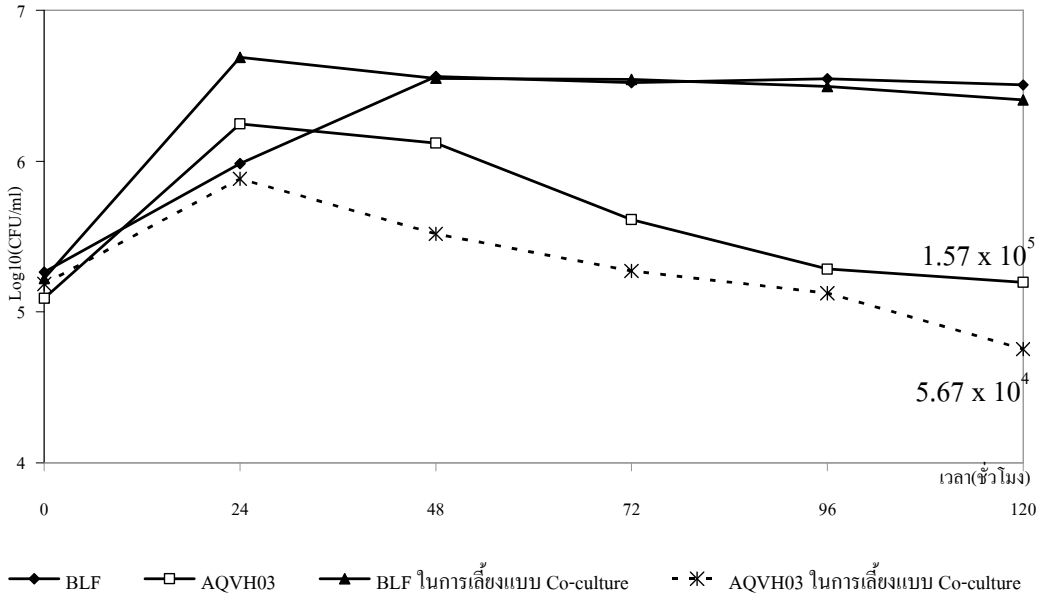
เมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 120 ชั่วโมง ทำการประเมินประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* sp. ในการควบคุมเชื้อ *V. harveyi* โดยพิจารณาจากการลดลง (คิดเป็นร้อยละ) ของเชื้อ *V. harveyi* ที่เลี้ยงร่วมกับ *Bacillus* spp. ชนิดต่าง ๆ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดลองที่มี *V. harveyi* เพียงอย่างเดียว จากปริมาณเชื้อ *V. harveyi* ที่ $1.57 \pm 0.34 \times 10^5$ CFU/ml พบว่า *Bacillus sphaericus* (BSP), *B. licheniformis* (BLF), *B. subtilis* (BSU), *B. cereus* (BCES), *B. cereus* (BCEF), *B. licheniformis* (BLS) และ *B. coagulans* (BCO) สามารถลดปริมาณเชื้อ *V. harveyi* ได้ร้อยละ 78.12, 67.86, 58.59, 51.04, 49.74, 33.76 และ 14.71 ตามลำดับ ซึ่งมีแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ปริมาณเชื้อ *V. harveyi* AQVH03 ที่เลี้ยงร่วมกับเชื้อ *Bacillus* sp. ชนิดต่าง ๆ

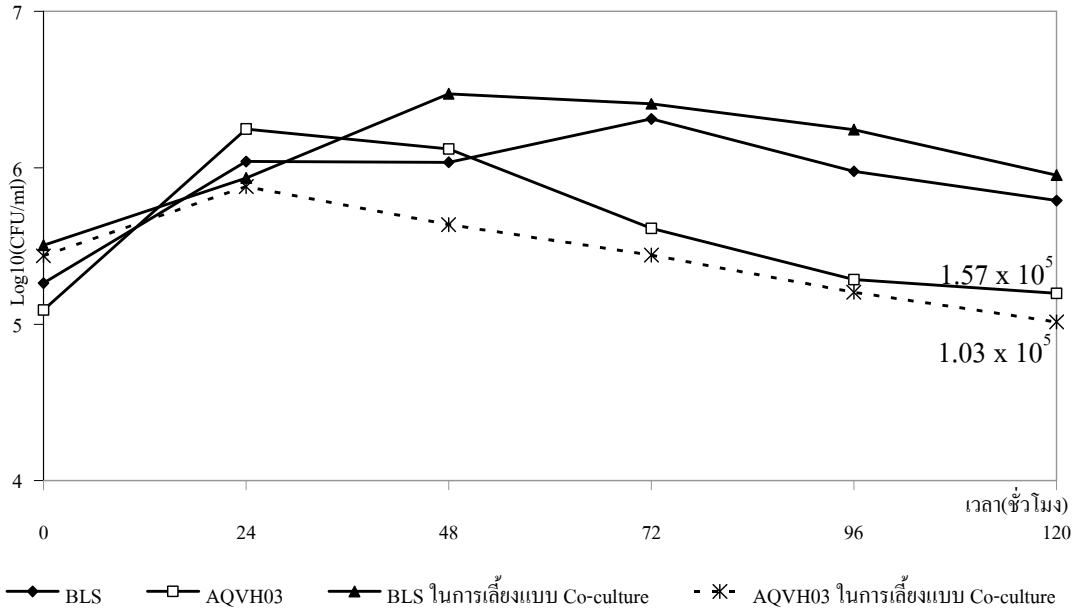
ชุดการทดลอง	รหัสเชื้อ	เชื้อ *V. harveyi* ในชุดการทดลองที่เลี้ยงแบบ Co-culture	
		ปริมาณ (CFU/ml)	ลดลงคิดเป็นร้อยละ
Vibrio harveyi	AQVH03	$1.57 \pm 0.34 \times 10^5$	-
Bacillus sphaericus	BSP	$3.67 \pm 2.31 \times 10^4$	78.12 ^{c}
Bacillus licheniformis	BLF	$5.67 \pm 5.06 \times 10^4$	67.86 ^{bc}
Bacillus subtilis	BSU	$6.67 \pm 6.02 \times 10^4$	58.59 ^{bc}
Bacillus cereus	BCES	$8.00 \pm 3.60 \times 10^4$	51.04 ^{abc}
Bacillus cereus	BCEF	$7.96 \pm 5.33 \times 10^4$	49.74 ^{abc}
Bacillus licheniformis	BLS	$1.03 \pm 0.93 \times 10^5$	33.76 ^{ab}
Bacillus coagulans	BCO	$1.50 \pm 1.03 \times 10^5$	14.71 ^{a}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรที่ต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

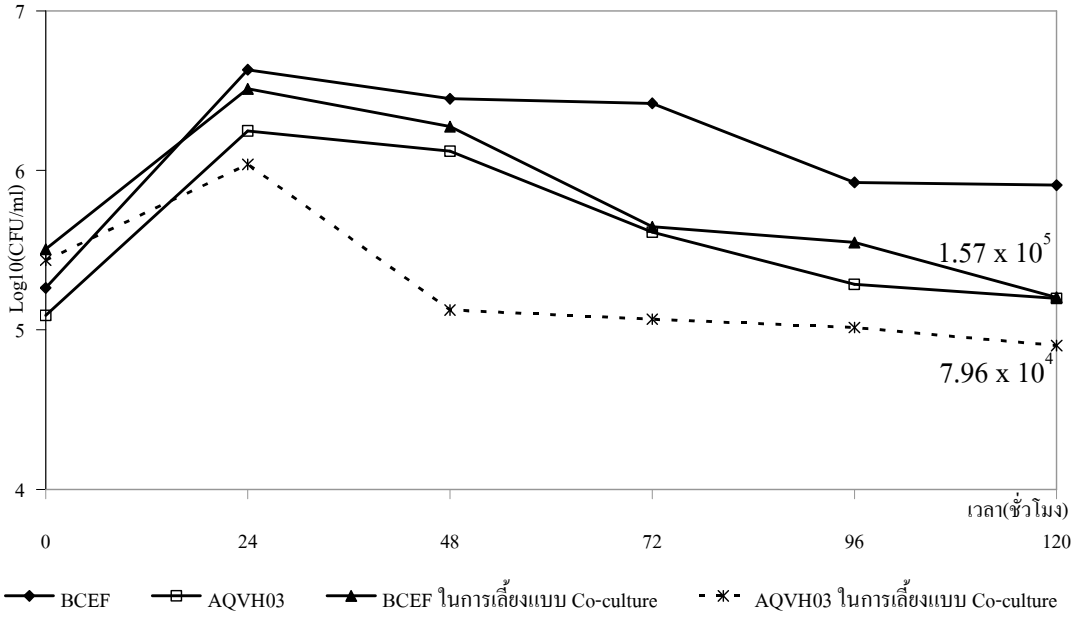
เชื้อ *Bacillus* spp. ทุกชนิดที่เลี้ยงเดี่ยว ๆ พบว่ามีการเจริญค่อนข้างคงที่ตลอดการทดลอง 120 ชั่วโมง และพบว่า *Bacillus* spp. ในกลุ่มที่เลี้ยงร่วมกับ *V. harveyi* AQVH03 มีการเจริญอย่างต่อเนื่องคล้าย ๆ กับ *Bacillus* ที่เลี้ยงเดี่ยว แต่มีจำนวนน้อยกว่า (ภาพที่ 7-13)



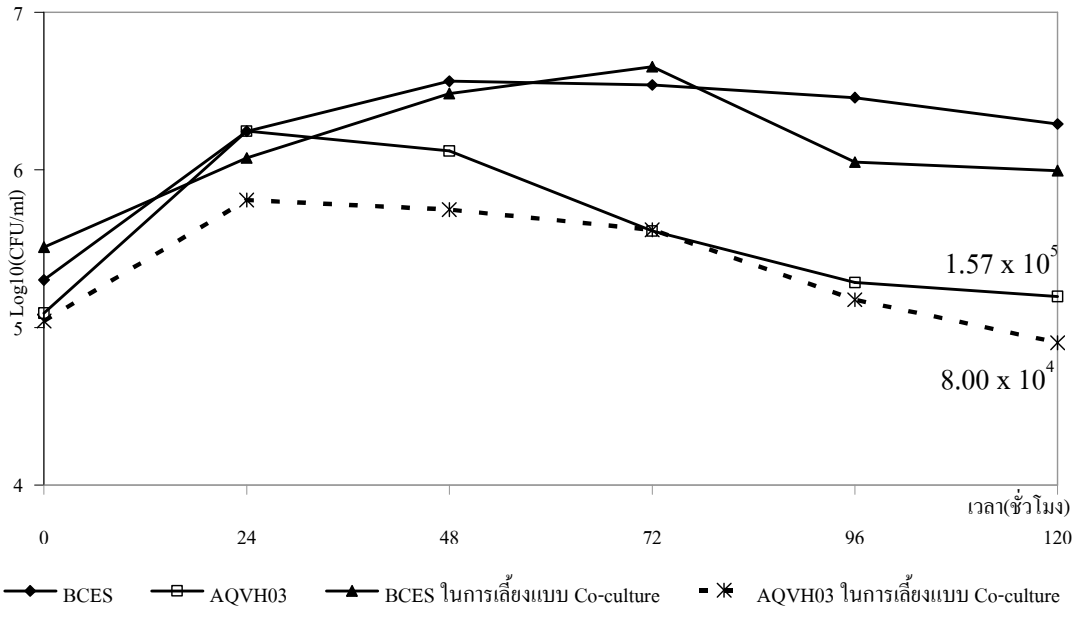
ภาพที่ 7 การเจริญของเชื้อ *Bacillus licheniformis* BLF และเชื้อ *Vibrio harveyi* AQVH03 ที่เลี้ยงเดี่ยว และเลี้ยงร่วมกันในน้ำทะเลความเค็ม 20 ppt



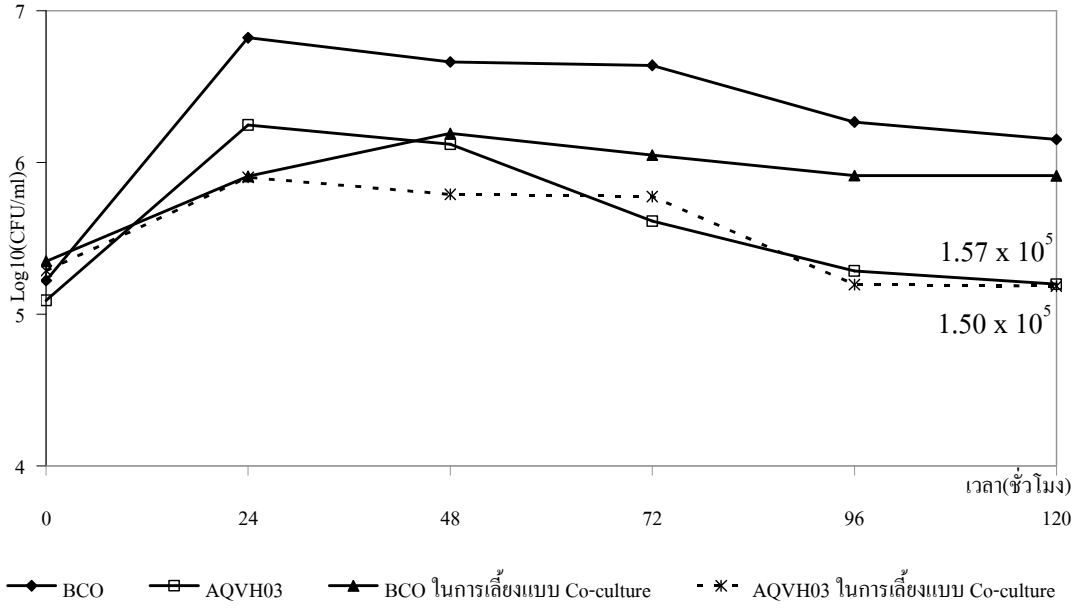
ภาพที่ 8 การเจริญของเชื้อ *Bacillus licheniformis* BLS และเชื้อ *Vibrio harveyi* AQVH03 ที่เลี้ยงเดี่ยว และเลี้ยงร่วมกันน้ำทะเลความเค็ม 20 ppt



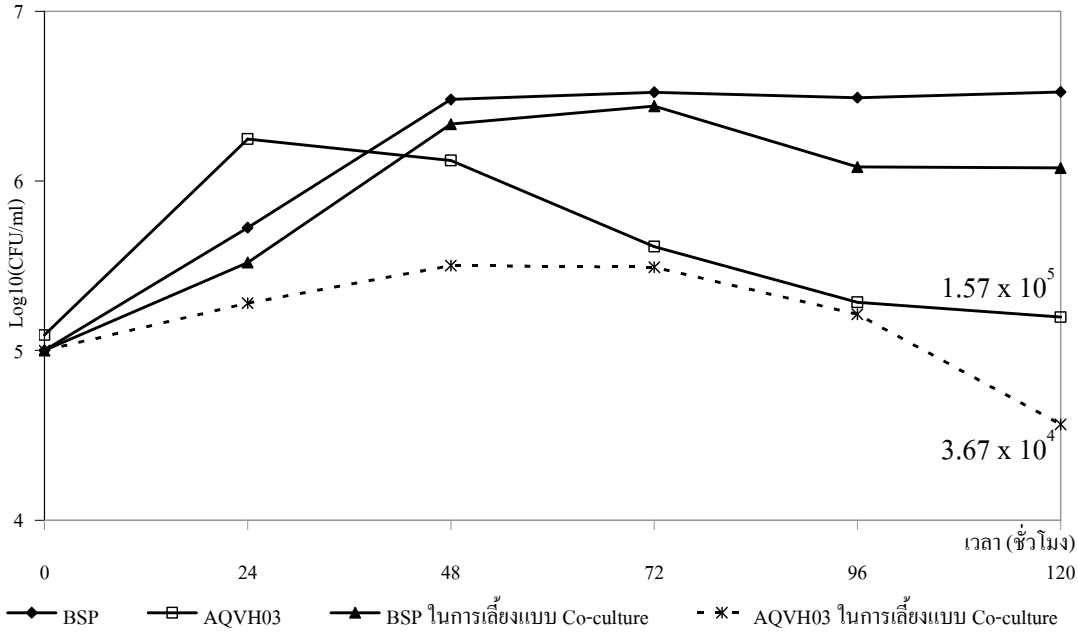
ภาพที่ 9 การเจริญของเชื้อ *Bacillus cereus* BCEF และเชื้อ *Vibrio harveyi* AQVH03 ที่เลี้ยงเดี่ยว และเลี้ยงร่วมกันน้ำทะเลความเค็ม 20 ppt



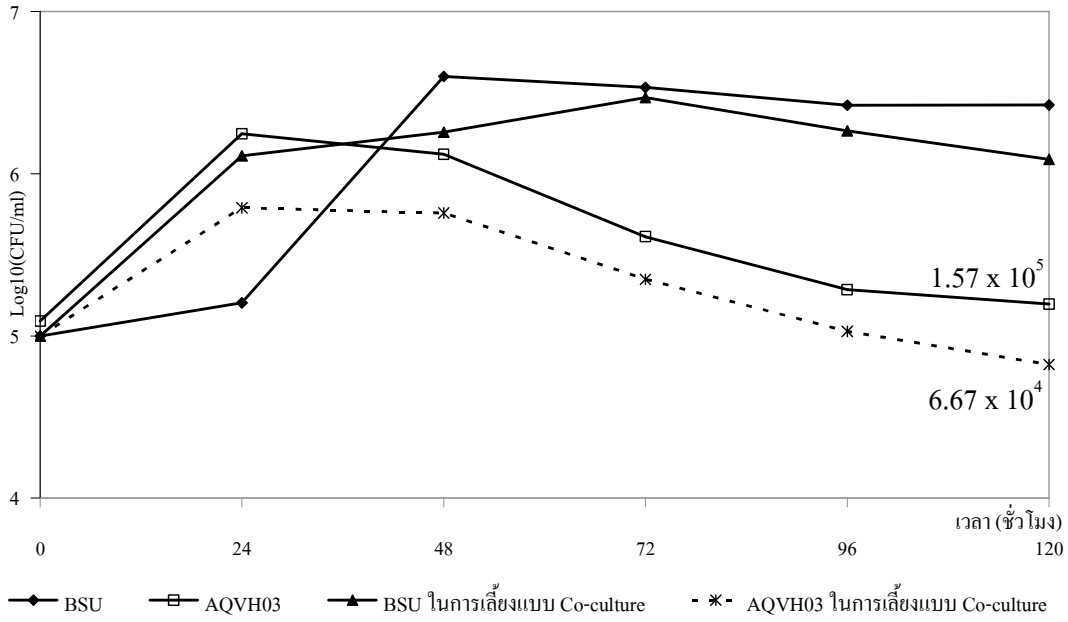
ภาพที่ 10 การเจริญของเชื้อ *Bacillus cereus* BCES และเชื้อ *Vibrio harveyi* AQVH03 ที่เลี้ยงเดี่ยว และเลี้ยงร่วมกันน้ำทะเลความเค็ม 20 ppt



ภาพที่ 11 การเจริญของเชื้อ *Bacillus coagulans* BCO และเชื้อ *Vibrio harveyi* AQVH03 ที่เลี้ยงเดี่ยว และเลี้ยงร่วมกันน้ำทะเลความเค็ม 20 ppt



ภาพที่ 12 การเจริญของเชื้อ *Bacillus sphaericus* BSP และเชื้อ *Vibrio harveyi* AQVH03 ที่เลี้ยงเดี่ยว และเลี้ยงร่วมกันน้ำทะเลความเค็ม 20 ppt



ภาพที่ 13 การเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* BSU และเชื้อ *Vibrio harveyi* AQVH03 ที่เลี้ยงเดี่ยว และเลี้ยงร่วมกันน้ำทะเลความเค็ม 20 ppt

การทดลองที่ 2 การศึกษาชนิดและระดับความเข้มข้นของโปรไบโอติกที่เหมาะสมในการผสมอาหารเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม

พิจารณาจากผลการทดลองที่ 1 และจากการตรวจเอกสาร การทดลองนี้จึงเลือกใช้ *Bacillus licheniformis* (BLF) และ *B. subtilis* เป็นโปรไบโอติก เพื่อนำมาศึกษาชนิดและระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมในการผสมอาหารเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม

ในการศึกษาชนิดและระดับความเข้มข้นของโปรไบโอติกที่เหมาะสมในการผสมอาหารเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม กำหนดให้มี 6 ชุดการทดลอง ได้แก่

ชุดการทดลองที่ 1 ให้อาหารสำเร็จรูปไม่ผสมโปรไบโอติก เป็นชุดควบคุม (ให้สัญลักษณ์เป็น C)

ชุดการทดลองที่ 2 ให้อาหารสำเร็จรูปที่ผสมเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* ปริมาณ 3 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม (ให้สัญลักษณ์เป็น T1)

ชุดการทดลองที่ 3 ให้อาหารสำเร็จรูปที่ผสมเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* ปริมาณ 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม (ให้สัญลักษณ์เป็น T2)

ชุดการทดลองที่ 4 ให้อาหารสำเร็จรูปที่ผสมเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ปริมาณ 3 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม (ให้สัญลักษณ์เป็น T3)

ชุดการทดลองที่ 5 ให้อาหารสำเร็จรูปที่ผสมเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ปริมาณ 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม (ให้สัญลักษณ์เป็น T4)

ชุดการทดลองที่ 6 ให้อาหารสำเร็จรูปที่ผสมเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* + *Bacillus subtilis* ปริมาณ 3 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม (ให้สัญลักษณ์เป็น T5)

ชุดการทดลองที่ 7 ให้อาหารสำเร็จรูปที่ผสมเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* + *Bacillus subtilis* ปริมาณ 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม (ให้สัญลักษณ์เป็น T6)

หลังจากให้อาหารผสมโปรไบโอติกในแต่ละชุดการทดลอง เป็นระยะเวลา 30 วัน ทำการชั่งน้ำหนัก และเลี้ยงด้วยอาหารที่ไม่ผสมโปรไบโอติกในทุกกลุ่มการทดลองต่อเนื่องอีก 20 วัน เมื่อครบทุก ๆ 10 วัน นำเลือดกุ้งมาตรวจวัดระดับภูมิคุ้มกันต่าง ๆ ได้แก่ ปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมด กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase กิจกรรมของน้ำเลือดกุ้งในการทำลายแบคทีเรีย กิจกรรมของเม็ดเลือดในการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม ได้ผลดังนี้

1. น้ำหนัก

น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาวที่ทำการสุ่มชั่งน้ำหนักหลังจากให้อาหารผสมโปรไบโอติกในแต่ละชุดการทดลอง เป็นระยะเวลา 30 วัน ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาวหลังจากให้อาหารโปรไบโอติก เป็นระยะเวลา 30 วัน

ชนิดและความเข้มข้นของโปรไบโอติก	น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาว (กรัม)	
	เริ่มทดลอง	ระยะเวลา 30 วัน
ให้อาหารไม่ผสมโปรไบโอติก (ชุดควบคุม)	21.00 ± 1.00 [a]	23.33 ± 1.52 [a]
ให้อาหารผสม *B. licheniformis* 3 กรัมต่ออาหาร 1 กก.	21.80 ± 1.80 [a]	23.67 ± 2.63 [a]
ให้อาหารผสม *B. licheniformis* 5 กรัมต่ออาหาร 1 กก.	22.63 ± 0.23 [a]	23.95 ± 3.52 [a]
ให้อาหารผสม *B. subtilis* 3 กรัมต่ออาหาร 1 กก.	22.50 ± 2.16 [a]	26.69 ± 0.44 [a]
ให้อาหารผสม *B. subtilis* 5 กรัมต่ออาหาร 1 กก.	23.42 ± 0.80 [a]	25.97 ± 0.86 [a]
ให้อาหารผสม *B. licheniformis* + *B. subtilis* 3 กรัมต่ออาหาร 1 กก.	21.78 ±0.19 [a]	24.03 ±2.51 [a]
ให้อาหารผสม *B. licheniformis* + *B. subtilis* 5 กรัมต่ออาหาร 1 กก.	21.08 ±2.33 [a]	24.31 ±2.36 [a]

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรที่ต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

2. ระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม

ภายหลังจากการเลี้ยงกุ้งด้วยอาหารที่ผสมโปรไบโอติกที่ชนิดและระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ตามที่ระบุไว้ตามชุดการทดลองข้างต้น และทำการเก็บเลือดของกุ้งขาวมาเพื่อวิเคราะห์และประเมินระดับภูมิคุ้มกันต่าง ๆ ทุก 10 วัน ตลอดช่วงที่ให้อาหารผสมโปรไบโอติกในระยะเวลา 30 วัน และเก็บเลือดหลังจากหยุดให้อาหารโปรไบโอติกต่อเนื่องอีก 20 วัน โดยทำการเก็บเลือดของกุ้งขาวมาเพื่อวิเคราะห์และประเมินระดับภูมิคุ้มกันต่าง ๆ ทุก 10 วัน รวมเป็นระยะเวลาทั้งสิ้น 50 วัน เก็บเลือดจำนวน 5 ครั้ง ได้ผลการทดลองดังนี้

2.1 ปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมด (Total Hemocytes Count)

เมื่อพิจารณาทั้งชนิดและระดับความเข้มข้นของโปรไบโอติก พบว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกในชุดการทดลองที่ให้อาหารผสม *B. licheniformis* ปริมาณ 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีปริมาณเม็ดเลือดรวมเฉลี่ยสูงสุดคือ 13.62±7.84 x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 20 วัน ซึ่งแตกต่างจากชุดควบคุมและชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และ 22.33±2.16 x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 30 วัน ซึ่งแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยค่าปริมาณเม็ดเลือดรวมเฉลี่ยเริ่มมีความแตกต่างหลังจากให้อาหารผสมโปรไบโอติกเป็นระยะเวลา 20 วัน และไม่มีความแตกต่างในทุกชุดการทดลองเมื่อหยุดให้อาหารผสมโปรไบโอติก ที่ระยะเวลา 40 วัน และ 50 วัน ($P>0.05$) และพบว่าตลอดการทดลอง 50 วัน ชุดควบคุมมีปริมาณเม็ดเลือดรวมเฉลี่ยต่ำสุด (ตารางที่ 4 และภาพที่ 14)

ตารางที่ 4 ปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมด (Total Hemocytes Count) ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก ในแต่ละชุดการทดลอง

ชุดการทดลอง	ปริมาณเม็ดเลือดรวม (x 10^6 เซลล์/มิลลิลิตร)				
	วันที่ 10	วันที่ 20	วันที่ 30	วันที่ 40	วันที่ 50
C	7.61±2.95 ^{a}	5.98±2.90 ^{a}	9.69±4.19 ^{a}	9.00±2.60 ^{a}	8.47±4.17 ^{a}
T1	12.99±3.78 ^{a}	10.58±4.81 ^{bcd}	15.22±5.88 ^{ab}	14.02±3.69 ^{a}	9.67±3.94 ^{a}
T2	12.38±4.16 ^{a}	13.62±7.84 ^{d}	22.33±2.16 ^{b}	17.23±2.04 ^{a}	13.23±3.94 ^{a}
T3	8.78±3.21 ^{a}	9.37±3.81 ^{abcd}	15.62±6.41 ^{ab}	14.64±3.74 ^{a}	13.24±4.44 ^{a}
T4	9.42±4.22 ^{a}	7.41±3.77 ^{ab}	19.38±6.18 ^{ab}	11.84±3.91 ^{a}	10.45±4.30 ^{a}
T5	9.07±4.70 ^{a}	8.06±2.69 ^{abc}	14.82±4.36 ^{ab}	12.04±4.15 ^{a}	12.07±3.56 ^{a}
T6	8.97±4.17 ^{a}	11.98±3.15 ^{cd}	17.32±7.49 ^{ab}	13.44±7.49 ^{a}	13.12±3.46 ^{a}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรที่ต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันทางสถิติ อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

C = ให้อาหารไม่ผสมโปรไบโอติก เป็นชุดควบคุม

T1 = ให้อาหารผสมเชื้อแบคทีเรีย *B. licheniformis* ปริมาณ 3 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

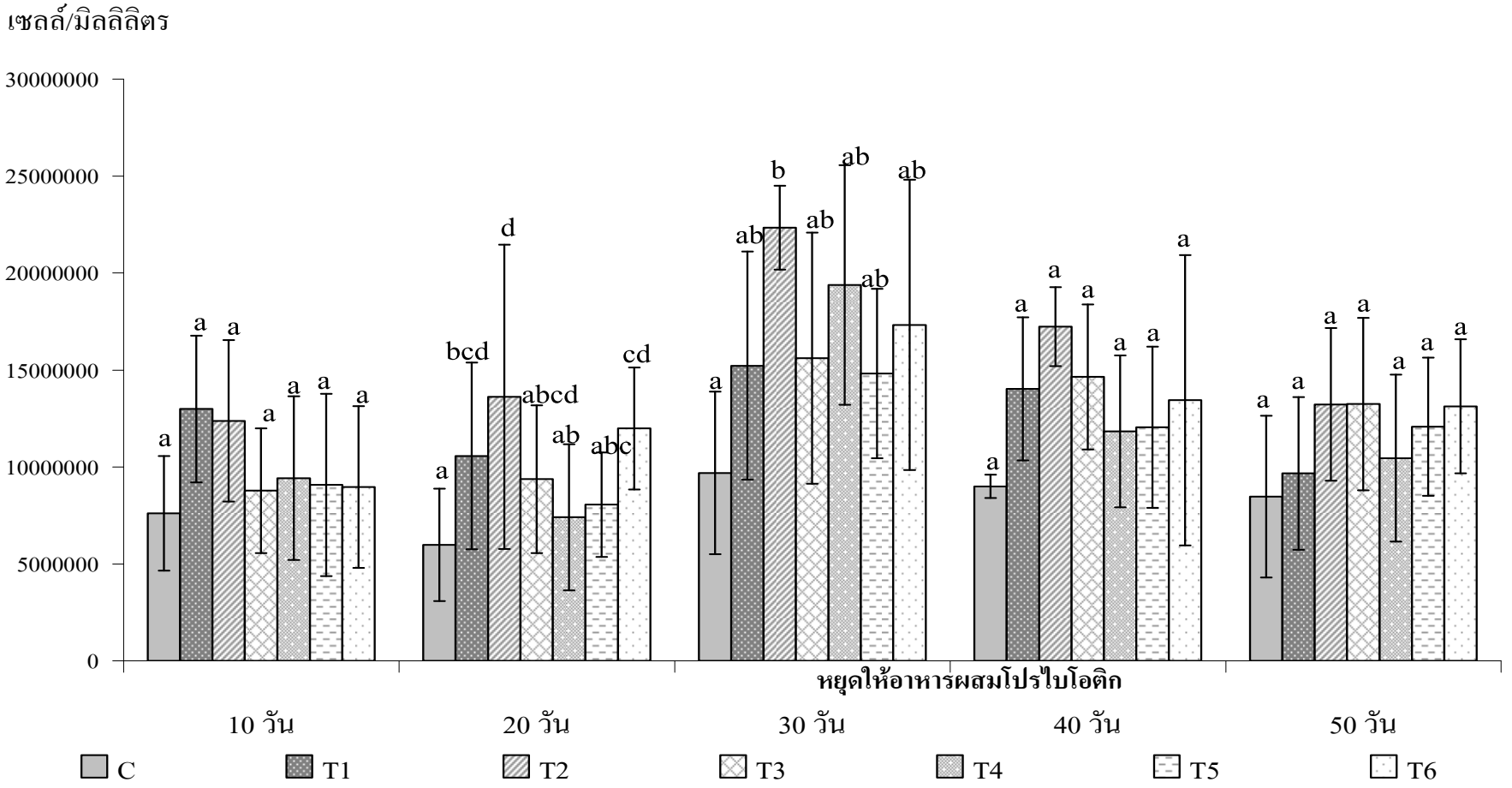
T2 = ให้อาหารผสมเชื้อแบคทีเรีย *B. licheniformis* ปริมาณ 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

T3 = ให้อาหารผสมเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ปริมาณ 3 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

T4 = ให้อาหารผสมเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ปริมาณ 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

T5 = ให้อาหารผสมเชื้อแบคทีเรีย *B. licheniformis* + *B. subtilis* ปริมาณ 3 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

T6 = ให้อาหารผสมเชื้อแบคทีเรีย *B. licheniformis* + *B. subtilis* ปริมาณ 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม



ภาพที่ 14 ปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมด (Total Hemocytes Count) ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก ในแต่ละชุดการทดลอง ที่ระยะเวลาทุก ๆ 10 วัน

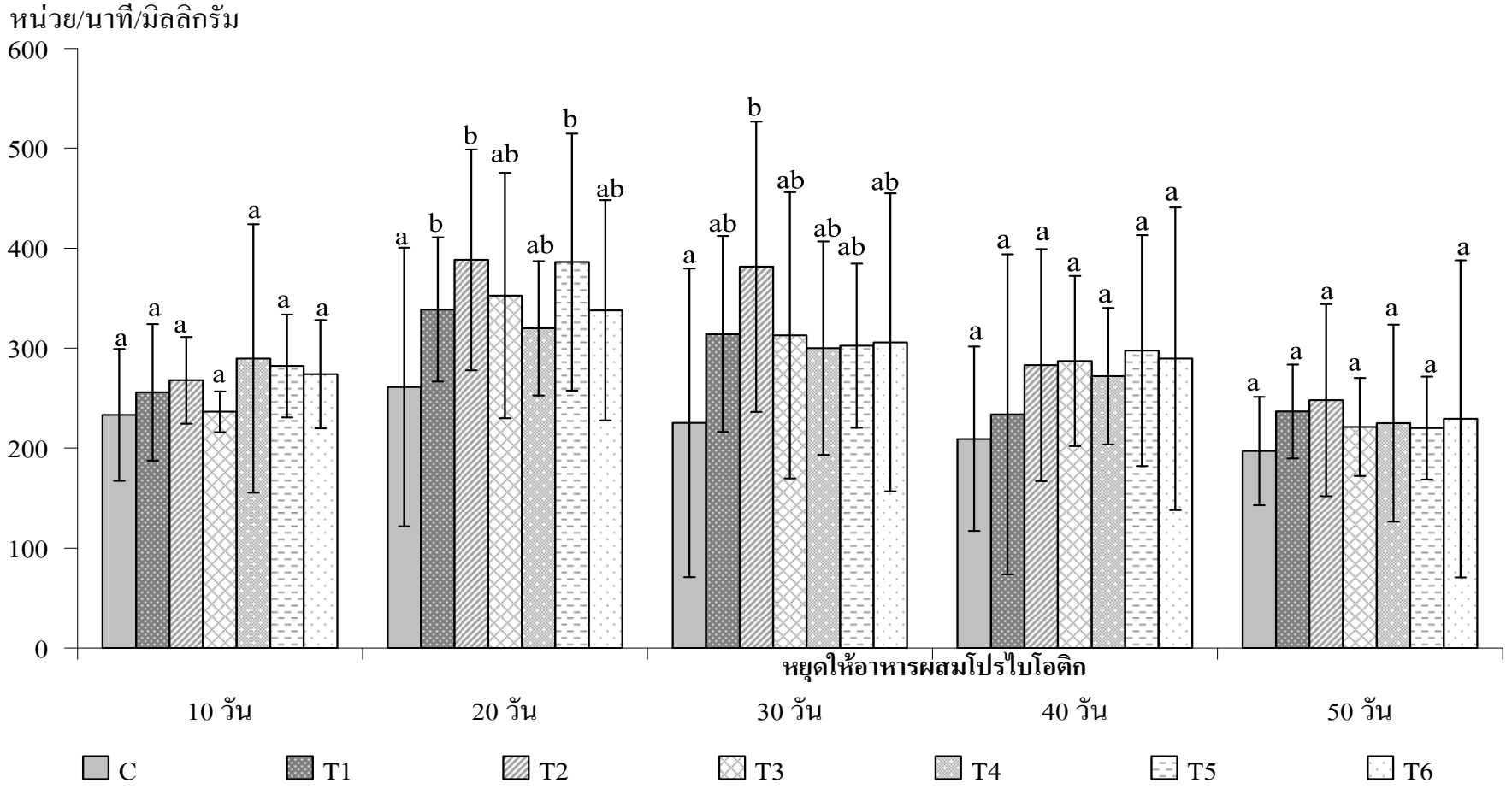
2.2 กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase

พบว่าที่ระยะเวลา 10 วัน 40 วัน และ 50 วัน กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase ในทุกชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ส่วนที่ระยะเวลา 20 วัน พบว่ามี 3 ชุดการทดลองที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase สูงแตกต่างจากชุดควบคุมและชุดการทดลองอื่น คือชุดการทดลองที่เลี้ยงกุ้งด้วยอาหารผสม *B. licheniformis* 3 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ชุดการทดลองที่เลี้ยงกุ้งด้วยอาหารผสม *B. licheniformis* 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม และชุดการทดลองที่เลี้ยงกุ้งด้วยอาหารผสม *B. licheniformis* + *B. subtilis* 3 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase เท่ากับ 338.67±72.12, 388.54±110.52 และ 386.26±128.62 หน่วย/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ และที่ระยะเวลา 30 วัน ชุดการทดลองที่เลี้ยงกุ้งด้วยอาหารผสม *B. licheniformis* 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase สูงสุดเท่ากับ 381.53±145.26 หน่วย/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase ในชุดการทดลองอื่น ไม่มีความแตกต่างทางสถิติจากชุดควบคุม ($P>0.05$) อย่างไรก็ตาม กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase ในทุกชุดการทดลองที่ผสม *Bacillus* มีค่าลดลงและไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากชุดควบคุม ($P>0.05$) เมื่อหยุดให้อาหารผสมโปรไบโอติก ดังแสดงในตารางที่ 5 และภาพที่ 15

ตารางที่ 5 กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก ในแต่ละชุดการทดลอง

ชนิดและความเข้มข้นของโปรไบโอติก	ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase (หน่วย/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน)				
	วันที่ 10	วันที่ 20	วันที่ 30	วันที่ 40	วันที่ 50
ให้อาหารไม่ผสมโปรไบโอติก (ชุดควบคุม)	233.20±65.83^{a}	261.21±139.36^{a}	225.25±154.27^{a}	209.29±92.27^{a}	197.08±54.13^{a}
ให้อาหารผสม *B. licheniformis* 3 กรัมต่ออาหาร 1 กก.	255.84±68.27^{a}	338.67±72.12^{b}	314.14±98.04^{ab}	233.71±160.14^{a}	236.61±47.00^{a}
ให้อาหารผสม *B. licheniformis* 5 กรัมต่ออาหาร 1 กก.	267.89±43.43^{a}	388.54±110.52^{b}	381.53±145.26^{b}	283.07±116.25^{a}	248.06±96.19^{a}
ให้อาหารผสม *B. subtilis* 3 กรัมต่ออาหาร 1 กก.	236.33±20.36^{a}	252.67±122.76^{ab}	312.95±143.16^{ab}	287.19±85.04^{a}	221.23±48.98^{a}
ให้อาหารผสม *B. subtilis* 5 กรัมต่ออาหาร 1 กก.	289.76±134.32^{a}	319.98±67.26^{ab}	299.96±106.78^{ab}	272.11±68.36^{a}	224.97±98.61^{a}
ให้อาหารผสม *B. licheniformis* + *B. subtilis* 3 กรัมต่ออาหาร 1 กก.	282.10±51.48^{a}	386.26±128.62^{b}	302.54±82.26^{ab}	297.57±115.62^{a}	220.08±51.48^{a}
ให้อาหารผสม *B. licheniformis* + *B. subtilis* 5 กรัมต่ออาหาร 1 กก.	273.96±54.22^{a}	337.86±110.21^{ab}	305.88±149.18^{ab}	289.50±151.75^{a}	229.23±158.69^{a}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรที่ต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)



ภาพที่ 15 กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก ในแต่ละชุดการทดลอง ที่ระยะเวลาทุก ๆ 10 วัน

2.3 กิจกรรมของเม็ดเลือดในการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม (Phagocytic Activity)

กิจกรรมของเม็ดเลือดในการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม พิจารณาจากค่า Percent Phagocytosis ในกุ้งทดลองที่ให้อาหารผสมโปรไบโอติก พบว่าที่ระยะเวลาต่าง ๆ ค่า Percent Phagocytosis เฉลี่ยของแต่ละชุดการทดลองมีค่าแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) หลังจากกุ้งได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกเป็นระยะเวลา 10 วัน ในชุดการทดลองที่ T1-T3 มีค่า Percent Phagocytosis เฉลี่ยแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ที่ระยะเวลา 20 วัน พบว่าชุดการทดลองที่ T3 และ T6 มีค่า Percent Phagocytosis เฉลี่ยแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และที่ระยะเวลา 30 วัน ชุดการทดลองที่ T2, T4, T5 และ T6 มีค่า Percent Phagocytosis เฉลี่ยแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และภายหลังจากหยุดให้อาหารผสมโปรไบโอติกพบว่า ที่ระยะเวลา 40 วันชุดการทดลองที่ T2, T5 และ T6 มีค่า Percent Phagocytosis เฉลี่ยแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และที่ระยะเวลา 50 วัน ค่า Percent Phagocytosis ของทุกชุดการทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติก ยังคงสูงกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากชุดควบคุม ($P<0.05$) ตลอดการทดลองพบว่า ชุดควบคุมมีค่ากิจกรรมของเม็ดเลือดในการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ให้อาหารผสมโปรไบโอติก (ตารางที่ 6 และภาพที่ 16)

ตารางที่ 6 Percent phagocytosis ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก ในแต่ละชุดการทดลอง

ชุดการทดลอง	Percent phagocytosis (Percent)				
	วันที่ 10	วันที่ 20	วันที่ 30	วันที่ 40	วันที่ 50
C	10.96±1.54 [a]	14.13±4.26 [a]	11.57±2.30 [a]	14.45±3.79 [a]	13.86±1.69 [a]
T1	17.32±3.19 [b]	18.19±7.89 [a]	18.15±6.87 [ab]	16.28±4.86 [ab]	25.25±4.08 [bc]
T2	16.29±1.85 [b]	21.73±3.44 [ab]	19.67±2.75 [b]	25.28±4.27 [bc]	23.22±3.45 [b]
T3	16.65±3.08 [b]	24.81±5.86 [b]	18.34±1.55 [ab]	18.39±3.53 [ab]	23.58±1.27 [bc]
T4	14.02±4.78 [ab]	25.11±8.24 [ab]	25.65±8.88 [bc]	21.16±4.62 [ab]	27.29±5.56 [bc]
T5	11.53±3.47 [a]	22.68±9.23 [a]	26.16±7.11 [bc]	36.04±11.08 [c]	30.66±10.70 [bc]
T6	13.86±3.53 [ab]	32.87±13.7 [b]	29.57±4.40 [c]	34.58±10.23 [c]	32.08±7.20 [c]

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรที่ต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

C = ให้อาหารไม่ผสมโปรไบโอติก เป็นชุดควบคุม

T1 = ให้อาหารผสมเชื้อแบคทีเรีย *B. licheniformis* ปริมาณ 3 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

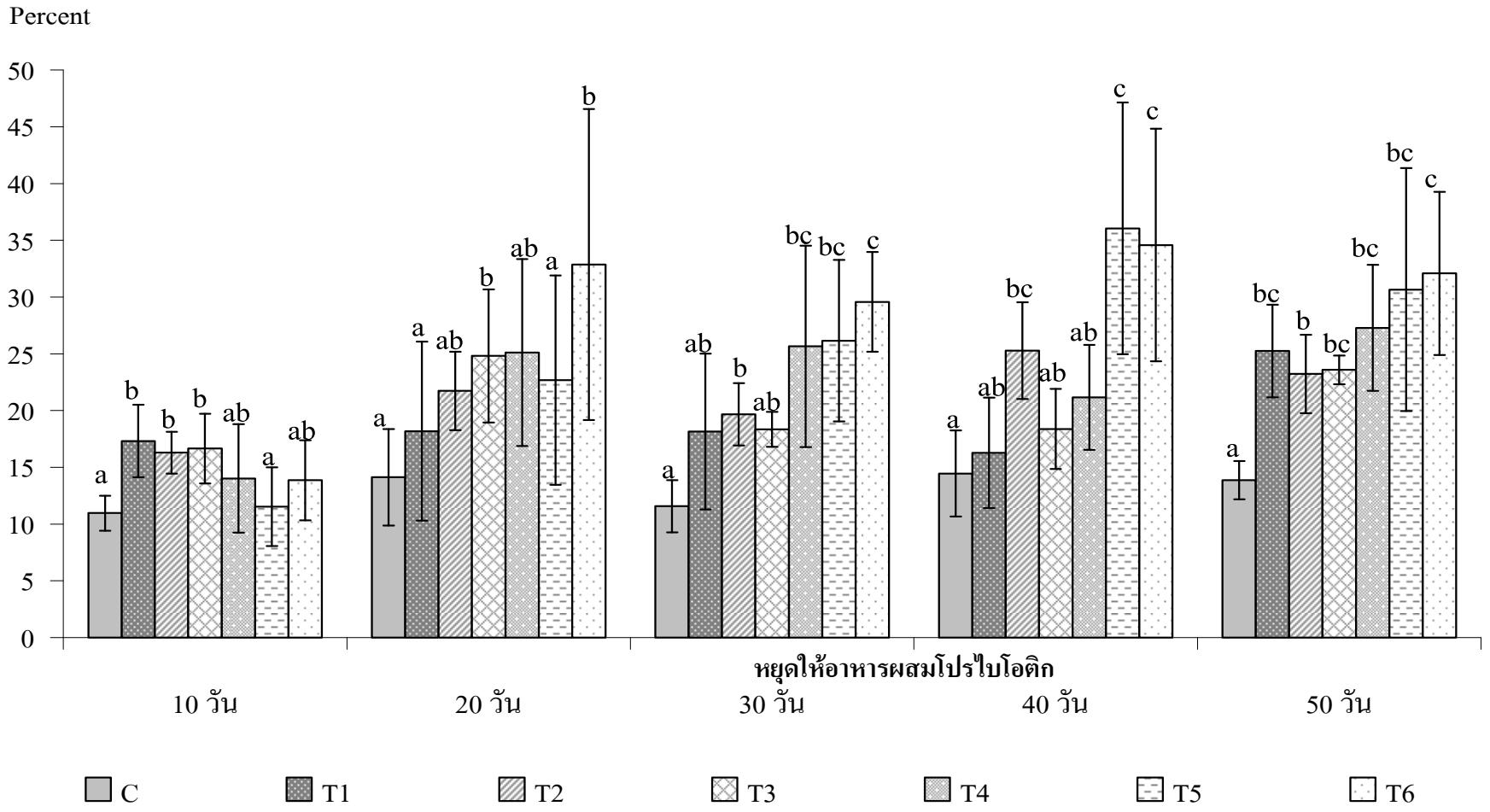
T2 = ให้อาหารผสมเชื้อแบคทีเรีย *B. licheniformis* ปริมาณ 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

T3 = ให้อาหารผสมเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ปริมาณ 3 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

T4 = ให้อาหารผสมเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ปริมาณ 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

T5 = ให้อาหารผสมเชื้อแบคทีเรีย *B. licheniformis* + *B. subtilis* ปริมาณ 3 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

T6 = ให้อาหารผสมเชื้อแบคทีเรีย *B. licheniformis* + *B. subtilis* ปริมาณ 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม



ภาพที่ 16 Percent phagocytosis ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก ในแต่ละชุดการทดลอง ที่ระยะเวลาทุก ๆ 10 วัน

2.4 กิจกรรมของน้ำเลือดกุ้งในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย (Bactericidal activity)

เมื่อทำการดูดเลือดจากกุ้งในแต่ละชุดการทดลองมาแยกซีรั่มและ เจือจางซีรั่มโดยใช้โซเดียมคลอไรด์ 2.6 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วนต่าง ๆ ได้แก่ 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 และ 1:128 โดยให้มีปริมาณซีรั่ม 0.5 มิลลิลิตร และใส่เชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ในซีรั่มที่เจือจางไว้หลอดละ 0.1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการนับเชื้อ *V. harveyi* บนอาหาร TCBS เพื่อหาปริมาณของซีรั่มที่ต่ำสุดที่สามารถทำให้เชื้อ *V. harveyi* ลดลงได้ 50 เปอร์เซ็นต์ โดยเทียบกับควบคุมซึ่งใช้น้ำเกลือ 2.6 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 0.5 มิลลิลิตร แทนการใช้ซีรั่ม พบว่าที่ระยะเวลา 10 วัน ชุดการทดลองที่ให้อาหารผสม *B. licheniformis* 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีค่า Bactericidal activity ที่ 1:16 แตกต่างจากชุดควบคุมและชุดการทดลองอื่นซึ่งมีค่า 1:8 ส่วนที่ระยะเวลา 20 วัน ชุดควบคุมมีค่า Bactericidal activity 1:32 และในทุกชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกมีค่า Bactericidal activity 1:128 ต่างจากชุดควบคุม ยกเว้นชุดการทดลองที่ให้อาหารผสม *B. subtilis* 3 และ 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ซึ่งมีค่าอยู่ที่ 1:64 และที่ระยะเวลา 30 วัน ชุดการทดลองที่ให้อาหารผสมโปรไบโอติกทุกชุดการทดลองมีค่า Bactericidal activity ที่ 1:128 ในขณะที่ชุดควบคุมมีค่า 1:16 นอกจากนี้ หลังจากหยุดให้อาหารผสมโปรไบโอติก ที่ระยะเวลา 40 วัน ชุดการทดลองที่ให้อาหารผสมโปรไบโอติกทุกชุดการทดลองมีค่า Bactericidal activity 1:64 ในขณะที่ชุดควบคุมมีค่า 1:16 เมื่อหยุดให้อาหารผสมโปรไบโอติกแล้ว 20 วัน (ที่ระยะเวลา 50 วัน) ค่า Bactericidal activity ในทุกชุดการทดลองที่เคยได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกยังคงมีค่าสูงกว่าชุดควบคุม และชุดการทดลองที่ T2 และ T5 มีค่าสูงสุดอยู่ที่ 1:64 (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 กิจกรรมของน้ำเลือดในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย (Bactericidal activity) ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก ในแต่ละชุดการทดลอง

ชนิดและความเข้มข้นของโปรไบโอติก	Bactericidal activity				
	วันที่ 10	วันที่ 20	วันที่ 30	วันที่ 40	วันที่ 50
ให้อาหารไม่ผสมโปรไบโอติก (ชุดควบคุม)	1:8	1:32	1:16	1:16	1:16
ให้อาหารผสม *B. licheniformis* 3 กรัมต่ออาหาร 1 กก.	1:8	1:128	1:128	1:64	1:16
ให้อาหารผสม *B. licheniformis* 5 กรัมต่ออาหาร 1 กก.	1:16	1:128	1:128	1:64	1:64
ให้อาหารผสม *B. subtilis* 3 กรัมต่ออาหาร 1 กก.	1:8	1:64	1:128	1:64	1:32
ให้อาหารผสม *B. subtilis* 5 กรัมต่ออาหาร 1 กก.	1:8	1:64	1:128	1:64	1:32
ให้อาหารผสม *B. licheniformis* + *B. subtilis* 3 กรัมต่ออาหาร 1 กก.	1:8	1:128	1:128	1:64	1:64
ให้อาหารผสม *B. licheniformis* + *B. subtilis* 5 กรัมต่ออาหาร 1 กก.	1:8	1:128	1:128	1:64	1:32

3. การศึกษาปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในลำไส้

3.1 ปริมาณเชื้อ *Bacillus* spp. ทั้งหมดในลำไส้ (Total *Bacillus* count)

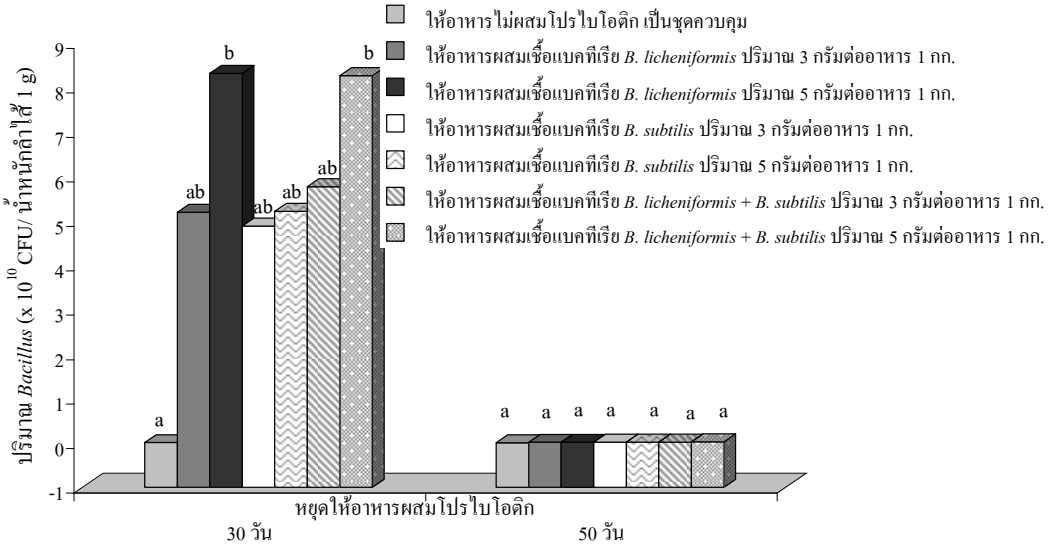
เมื่อนำลำไส้กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติกที่ชนิด และระดับความเข้มข้นต่าง ๆ มาบดเพื่อนับจำนวนเชื้อ *Bacillus* spp. ด้วยวิธี spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA โดยพิจารณาจากลักษณะของโคโลนีซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของ *Bacillus* spp. และย้อมแกรมดูลักษณะของตัวเซลล์แบคทีเรียซึ่งจะเป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปแท่งยาว พบว่าหลังจากที่กุ้งได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกเป็นระยะเวลา 30 วัน กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม เชื้อ *B. licheniformis* ปริมาณ 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม และกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมเชื้อ *B. licheniformis* + *B. subtilis* ปริมาณ 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีจำนวนเชื้อ *Bacillus* spp. ทั้งหมดในลำไส้เฉลี่ยสูงสุดคือ $8.31 \pm 3.84 \times 10^{10}$ CFU ต่อน้ำหนักลำไส้ 1 กรัม และ $8.32 \pm 5.44 \times 10^{10}$ CFU ต่อน้ำหนักลำไส้ 1 กรัม ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างชุดควบคุมและชุดการทดลองอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

($P<0.05$) และหลังจากหยุดให้อาหารผสมโปรไบโอติกเป็นระยะเวลา 20 วัน (ที่ระยะเวลา 50 วันที่ทำการเก็บตัวอย่าง) พบว่าจำนวนเชื้อ *Bacillus* spp. ทั้งหมดในลำไส้ของกุ้งในทุกชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) (ตารางที่ 8 และภาพที่ 17)

ตารางที่ 8 ปริมาณเชื้อ *Bacillus* spp. ทั้งหมดในลำไส้กุ้งขาวแวนนาไม หลังจากให้อาหารผสมโปรไบโอติก ที่ชนิดและระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 30 วัน และหลังจากหยุดให้อาหารผสมโปรไบโอติกเป็นระยะเวลา 20 วัน

ชนิดและความเข้มข้นของโปรไบโอติก	ปริมาณ *Bacillus* spp. ทั้งหมดในลำไส้ของกุ้งขาว (CFU ต่อน้ำหนักลำไส้ 1 กรัม)	
	หลังจากให้อาหารผสมโปรไบโอติกที่ระยะเวลา 30 วัน	หลังจากหยุดให้อาหารผสมโปรไบโอติก 20 วัน
ให้อาหารไม่ผสมโปรไบโอติก (ชุดควบคุม)	$8.64 \pm 2.17 \times 10^{6}$ a	$2.02 \pm 0.44 \times 10^{6}$ a
ให้อาหารผสม *B. licheniformis* 3 กรัมต่ออาหาร 1 กก.	$5.20 \pm 4.54 \times 10^{10}$ ab	$9.11 \pm 6.44 \times 10^{7}$ a
ให้อาหารผสม *B. licheniformis* 5 กรัมต่ออาหาร 1 กก.	$8.31 \pm 3.84 \times 10^{10}$ b	$1.13 \pm 0.50 \times 10^{8}$ a
ให้อาหารผสม *B. subtilis* 3 กรัมต่ออาหาร 1 กก.	$4.90 \pm 2.66 \times 10^{10}$ ab	$1.20 \pm 1.04 \times 10^{8}$ a
ให้อาหารผสม *B. subtilis* 5 กรัมต่ออาหาร 1 กก.	$5.21 \pm 4.04 \times 10^{10}$ ab	$1.20 \pm 1.09 \times 10^{8}$ a
ให้อาหารผสม *B. licheniformis* + *B. subtilis* 3 กรัมต่ออาหาร 1 กก.	$5.82 \pm 4.65 \times 10^{10}$ ab	$1.31 \pm 0.85 \times 10^{8}$ a
ให้อาหารผสม *B. licheniformis* + *B. subtilis* 5 กรัมต่ออาหาร 1 กก.	$8.32 \pm 5.44 \times 10^{10}$ b	$2.21 \pm 1.96 \times 10^{8}$ a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรที่ต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)



ภาพที่ 17 ปริมาณเชื้อ *Bacillus* spp. ทั้งหมดในลำไส้กุ้งขาวแวนนาไม หลังจากให้อาหารผสมโปรไบโอติก ที่ชนิดและระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 30 วัน และหลังจากหยุดให้อาหารผสมโปรไบโอติกเป็นระยะเวลา 20 วัน

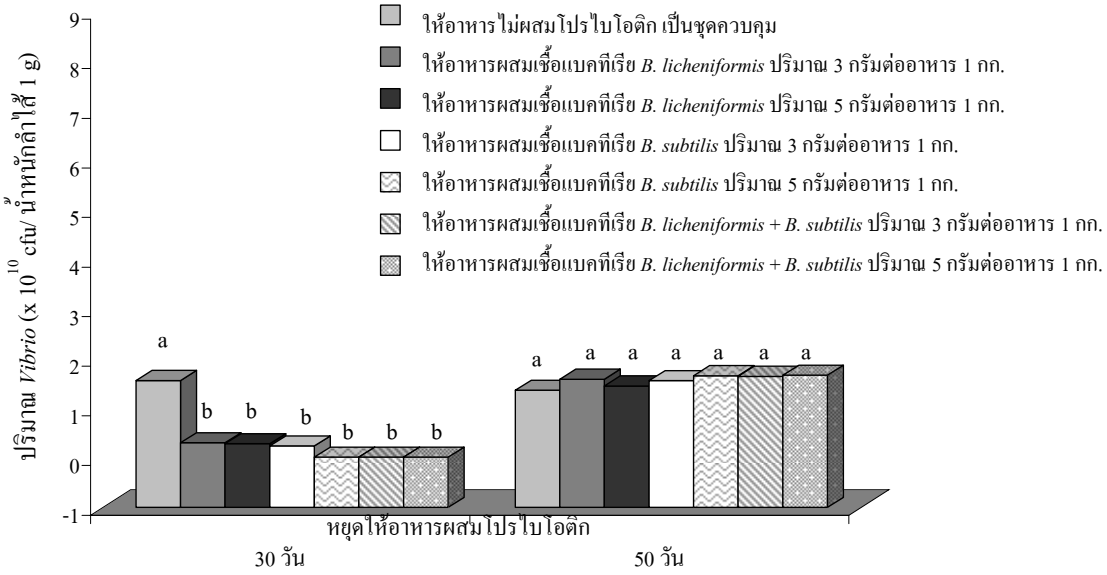
3.2 ปริมาณเชื้อ *Vibrio* spp. ทั้งหมดในลำไส้ (Total *Vibrio* count)

เมื่อนำลำไส้กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติกที่ชนิด และระดับความเข้มข้นต่าง ๆ มาบดเพื่อนับจำนวนเชื้อ *Vibrio* spp. ด้วยวิธี spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar หลังจากที่กุ้งได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกเป็นระยะเวลา 30 วันพบว่า กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติกทุกชุดการทดลอง มีปริมาณเชื้อ *Vibrio* spp. เฉลี่ยน้อยกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และหลังจากหยุดให้อาหารผสมโปรไบโอติกเป็นระยะเวลา 20 วัน (ที่ระยะเวลา 50 วันที่ทำการเก็บตัวอย่าง) พบว่าจำนวนเชื้อ *Vibrio* spp. ทั้งหมดในลำไส้ของกุ้งที่ให้อาหารผสมโปรไบโอติกในทุกชุดการทดลองไม่แตกต่างจากชุดควบคุม ($P>0.05$) (ตารางที่ 9 และภาพที่ 18)

ตารางที่ 9 ปริมาณเชื้อ *Vibrio* spp. ทั้งหมดในลำไส้กุ้งขาวแวนนาไม หลังจากให้อาหารผสมโปรไบโอติก ที่ชนิดและระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 30 วัน และหลังจากหยุดให้อาหารผสมโปรไบโอติกเป็นระยะเวลา 20 วัน

ชนิดและความเข้มข้นของโปรไบโอติก	ปริมาณ *Vibrio* spp. ทั้งหมดในลำไส้ของกุ้งขาว (CFU ต่อน้ำหนักลำไส้ 1 กรัม)	
	หลังจากให้อาหารผสมโปรไบโอติกที่ระยะเวลา 30 วัน	หลังจากหยุดให้อาหารผสมโปรไบโอติก 20 วัน
ให้อาหารไม่ผสมโปรไบโอติก (ชุดควบคุม)	$1.56 \pm 1.27 \times 10^{10}$ [a]	$1.36 \pm 1.11 \times 10^{10}$ [a]
ให้อาหารผสม *B. licheniformis* 3 กรัมต่ออาหาร 1 กก.	$3.08 \pm 2.14 \times 10^{9}$ [b]	$1.58 \pm 0.80 \times 10^{10}$ [a]
ให้อาหารผสม *B. licheniformis* 5 กรัมต่ออาหาร 1 กก.	$2.88 \pm 1.84 \times 10^{9}$ [b]	$1.44 \pm 0.71 \times 10^{10}$ [a]
ให้อาหารผสม *B. subtilis* 3 กรัมต่ออาหาร 1 กก.	$2.42 \pm 1.56 \times 10^{9}$ [b]	$1.55 \pm 1.04 \times 10^{10}$ [a]
ให้อาหารผสม *B. subtilis* 5 กรัมต่ออาหาร 1 กก.	$1.82 \pm 1.04 \times 10^{8}$ [b]	$1.65 \pm 1.09 \times 10^{10}$ [a]
ให้อาหารผสม *B. licheniformis* + *B. subtilis* 3 กรัมต่ออาหาร 1 กก.	$1.69 \pm 1.08 \times 10^{8}$ [b]	$1.64 \pm 0.85 \times 10^{10}$ [a]
ให้อาหารผสม *B. licheniformis* + *B. subtilis* 5 กรัมต่ออาหาร 1 กก.	$1.62 \pm 1.09 \times 10^{8}$ [b]	$1.66 \pm 1.06 \times 10^{10}$ [a]

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรที่ต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)



ภาพที่ 18 ปริมาณเชื้อ *Vibrio* spp. ทั้งหมดในลำไส้กุ้งขาวแวนนาไม หลังจากให้อาหารผสมโปรไบโอติก ที่ชนิดและระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 30 วัน และหลังจากหยุดให้อาหารผสมโปรไบโอติกเป็นระยะเวลา 20 วัน

การทดลองที่ 3 การศึกษาระยะเวลาการให้โปรไบโอติกที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม

พิจารณาจากผลการทดลองที่ 2 การทดลองนี้จึงเลือกใช้ อาหารผสมเชื้อแบคทีเรีย *B. licheniformis* ปริมาณ 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม โดยให้วันเว้นวัน และทุกวัน เพื่อศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสม และประเมินการดำรงอยู่ของแบคทีเรียในลำไส้

หลังจากให้อาหารผสมโปรไบโอติกในแต่ละชุดการทดลอง เป็นระยะเวลา 30 วัน ทำการชั่งน้ำหนัก และเลี้ยงด้วยอาหารที่ไม่ผสมโปรไบโอติกในทุกกลุ่มการทดลองต่อเนื่องอีก 20 วัน เมื่อครบทุก ๆ 10 วัน นำเลือดกุ้งมาตรวจวัดระดับภูมิคุ้มกันต่าง ๆ ได้แก่ ปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมด กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส กิจกรรมของน้ำเลือดกุ้งในการทำลายแบคทีเรีย กิจกรรมของเม็ดเลือดในการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือด ได้ผลดังนี้

1. น้ำหนัก

น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาวที่ทำการสุ่มชั่งน้ำหนักหลังจากให้อาหารผสมโปรไบโอติกในแต่ละชุดการทดลอง เป็นระยะเวลา 30 วัน ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาว หลังจากให้อาหารโปรไบโอติก เป็นระยะเวลา 30 วัน

ชุดการทดลอง	น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาว (กรัม)	
	เริ่มทดลอง	ระยะเวลา 30 วัน
กลุ่มควบคุม	21.06 ± 1.55^{a}	25.65 ± 4.10^{a}
ให้อาหารผสมโปรไบโอติก ทุกวัน	20.73 ± 2.18^{a}	25.21 ± 3.90^{a}
ให้อาหารผสมโปรไบโอติก วันเว้นวัน	20.91 ± 1.58^{a}	24.93 ± 3.70^{a}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรที่ต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

2. ระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม

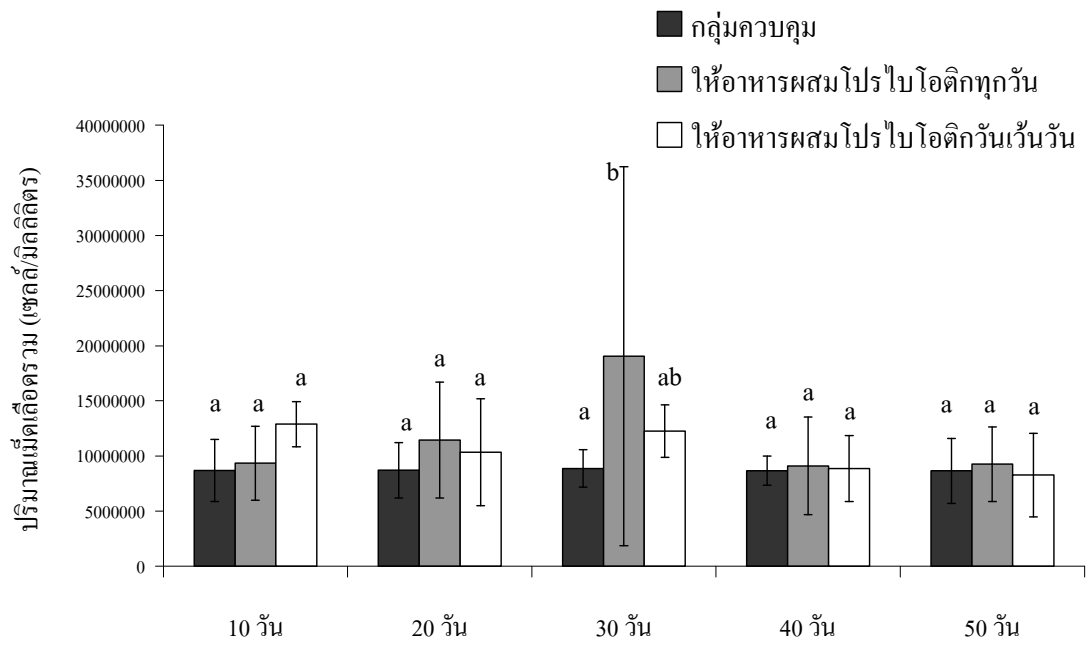
2.1 ปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมด (Total Hemocytes Count)

ในช่วง 20 วันแรกของการศึกษา ไม่พบความแตกต่างทางสถิติระหว่างปริมาณเม็ดเลือดรวมของทุกชุดการทดลอง ($P>0.05$) ส่วนที่ 30 วันพบว่า ชุดการทดลองที่ให้อาหารผสมโปรไบโอติก คือ *B. licheniformis* ปริมาณ 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมทุกวัน มีค่าเฉลี่ยของปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมดสูงสุดอยู่ที่ $19.05 \pm 17.19 \times 10^{6}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แต่ไม่แตกต่างจากชุดการทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติกวันเว้นวัน ($P>0.05$) และหลังจากหยุดให้อาหารผสมโปรไบโอติก ปริมาณเม็ดเลือดรวมในทุกชุดการทดลองทั้งที่ให้อาหารผสมโปรไบโอติก และชุดควบคุมไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 11 และภาพที่ 19

ตารางที่ 11 ปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมด (Total Hemocytes Count) ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกทุกวัน และวันเว้นวัน ที่ระยะเวลาทุก ๆ 10 วัน

ชุดการทดลอง	ปริมาณเม็ดเลือดรวม (x 10^6 เซลล์/มิลลิลิตร)				
	วันที่ 10	วันที่ 20	วันที่ 30	วันที่ 40	วันที่ 50
กลุ่มควบคุม	8.68 ± 2.81^{a}	8.70 ± 2.51^{a}	8.86 ± 1.69^{a}	8.66 ± 1.30^{a}	8.64 ± 2.94^{a}
ให้อาหารผสมโปรไบโอติกทุกวัน	9.34 ± 3.35^{a}	11.44 ± 5.26^{a}	19.05 ± 17.19^{b}	9.10 ± 4.44^{a}	9.25 ± 3.38^{a}
ให้อาหารผสมโปรไบโอติกวันเว้นวัน	12.88 ± 2.05^{a}	10.35 ± 4.84^{a}	12.25 ± 2.38^{ab}	8.86 ± 2.99^{a}	8.27 ± 3.79^{a}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรที่ต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)



ภาพที่ 19 ปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมด (Total Hemocytes Count) ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกทุกวัน และวันเว้นวัน ที่ระยะเวลาทุก ๆ 10 วัน

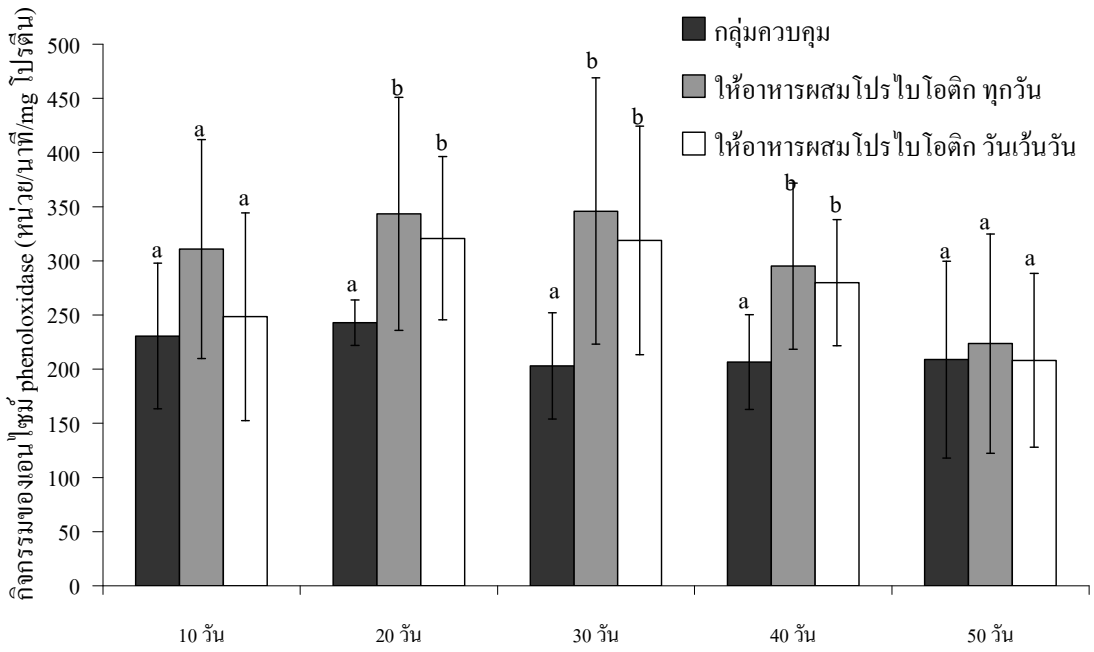
2.2 กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase

กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase ที่ระยะเวลา 10 วันไม่มีความแตกต่างในทุกชุดการทดลอง ส่วนที่ระยะเวลา 20 วัน และ 30 วัน พบว่าชุดการทดลองที่ให้อาหารผสมโปรไบโอติก ทั้งที่ให้ทุกวัน และวันเว้นวัน มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase เฉลี่ยสูงกว่าชุดควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และหลังจากหยุดให้อาหารผสมโปรไบโอติกที่ระยะเวลา 40 วัน ในชุดการทดลองที่ให้อาหารผสมโปรไบโอติกยังคงมีกิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase เฉลี่ยสูงกว่าชุดควบคุม และลดลงที่ระยะเวลา 50 วัน และไม่มีความแตกต่างทางสถิติในทุกชุดการทดลอง (ตารางที่ 12 และภาพที่ 20)

ตารางที่ 12 กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก ทุกวัน และวันเว้นวัน ที่ระยะเวลาทุก ๆ 10 วัน

ชุดการทดลอง	ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase (หน่วย/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน)				
	วันที่ 10	วันที่ 20	วันที่ 30	วันที่ 40	วันที่ 50
กลุ่มควบคุม	230.62±67.30 [a]	242.74±20.17 [a]	203.01±52.21 [a]	202.54±41.41 [a]	208.79±55.57 [a]
ให้อาหารผสมโปรไบโอติก ทุกวัน	301.84±101.14 [a]	343.36±102.11 [b]	345.97±119.49 [b]	292.07±72.66 [b]	223.62±96.53 [a]
ให้อาหารผสมโปรไบโอติก วันเว้นวัน	248.41±95.88 [a]	320.80±79.22 [b]	318.85±101.42 [b]	279.90±55.57 [b]	208.79±91.35 [a]

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรที่ต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)



ภาพที่ 20 ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก ทุกวัน และวันเว้นวัน ที่ระยะเวลาทุก ๆ 10 วัน

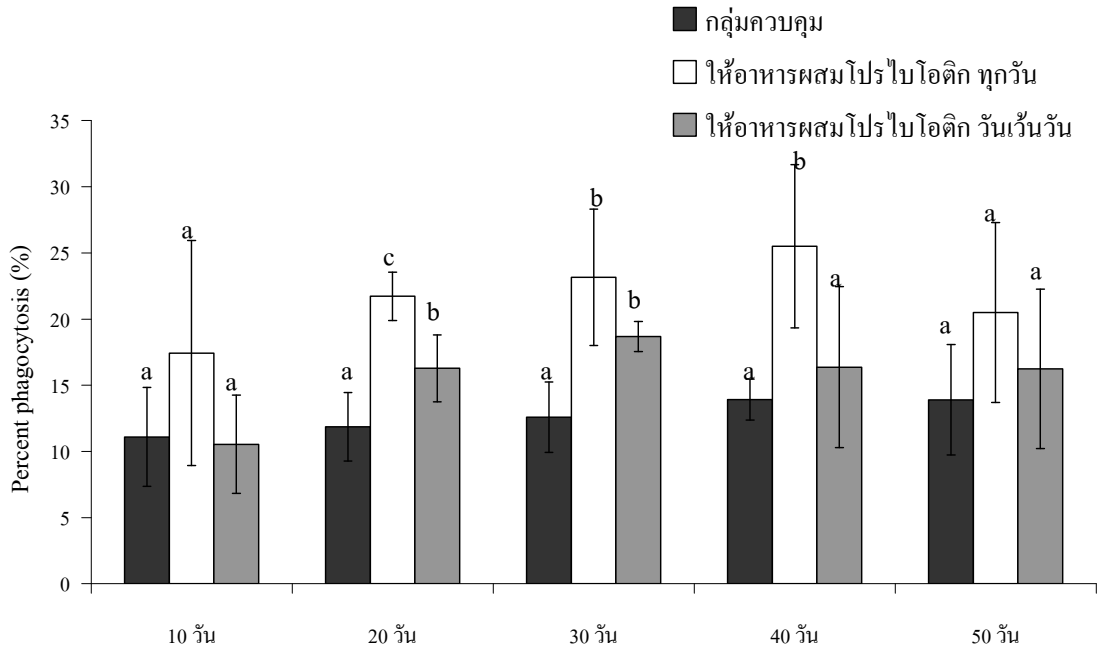
2.3 กิจกรรมของเม็ดเลือดในการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม (Phagocytic Activity)

กิจกรรมของเม็ดเลือดในการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม พิจารณาจากค่า Percent Phagocytosis พบว่าที่ระยะเวลา 10 วัน ค่า Percent Phagocytosis เฉลี่ยของทุกชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) และเริ่มแตกต่างกันที่ระยะเวลา 20 วัน โดยชุดการทดลองที่ให้อาหารผสมโปรไอติกทุกวันมีค่า Percent Phagocytosis สูงสุดที่ 21.72±1.82 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างจากชุดควบคุมและชุดที่ให้อาหารผสมโปรไบโอติกวันเว้นวัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และที่ระยะเวลา 30 วัน ค่า Percent Phagocytosis เฉลี่ยของชุดการทดลองที่ให้อาหารผสมโปรไบโอติกทุกวัน มีค่าสูงสุดที่ 23.15±5.15 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แต่ไม่แตกต่างทางสถิติจากชุดที่ให้อาหารผสมโปรไบโอติกวันเว้นวัน ($P>0.05$) ภายหลังจากหยุดให้อาหารผสมโปรไบโอติกที่ระยะเวลา 40 วันชุดการทดลองที่ให้อาหารผสมโปรไบโอติกทุกวันยังคงมีค่า Percent Phagocytosis สูงกว่าชุดควบคุมและชุดการทดลองที่ให้อาหารผสมโปรไบโอติกวันเว้นวัน ($P<0.05$) แต่ที่ระยะเวลา 50 วัน ค่า Percent Phagocytosis ในทุกชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) (ตารางที่ 13 และภาพที่ 21)

ตารางที่ 13 Percent phagocytosis ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก ทุกวัน และวันเว้นวัน ที่ระยะเวลาทุก ๆ 10 วัน

ชุดการทดลอง	Percent phagocytosis (Percent)				
	วันที่ 10	วันที่ 20	วันที่ 30	วันที่ 40	วันที่ 50
กลุ่มควบคุม	11.10±3.73 [a]	11.85±2.59 [a]	12.59±2.66 [a]	13.92±1.54 [a]	13.89±4.16 [a]
ให้อาหารผสมโปรไบโอติก ทุกวัน	17.43±8.50 [a]	21.72±1.82 [c]	23.15±5.15 [b]	25.50±6.17 [b]	20.50±6.81 [a]
ให้อาหารผสมโปรไบโอติก วันเว้นวัน	10.53±3.71 [a]	16.28±2.53 [b]	18.68±1.14 [b]	16.36±6.09 [a]	16.23±6.03 [a]

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรที่ต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)



ภาพที่ 21 Percent phagocytosis ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก ทุกวัน และวันเว้นวัน ที่ระยะเวลาทุก ๆ 10 วัน

2.4 กิจกรรมของน้ำเลือดกุ้งในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย (Bactericidal activity)

ในช่วง 30 วันแรกของการทดลอง พบว่า ชุดการทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติกมีค่า Bactericidal activity สูงกว่าชุดควบคุม โดยชุดการทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติกทุกวัน มีค่ากิจกรรมนี้สูงกว่าชุดการทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติกวันเว้นวัน และจะลดลงเมื่อหยุดให้อาหารผสมโปรไบโอติก โดยมีค่าเท่ากันทุกชุดการทดลองในวันที่ 50 และที่ระยะเวลา 20 วัน และ 30 วัน ชุดการทดลองที่เลี้ยงกุ้งด้วยอาหารผสมโปรไบโอติกทุกวัน มีค่า Bactericidal activity (ค่าเจือจางของซีรั่มมากที่สุดที่ทำให้เชื้อแบคทีเรียลดลง 50 เปอร์เซ็นต์) อยู่ที่ 1:128 ซึ่งแตกต่างจากชุดควบคุม และลดลงหลังจากหยุดให้อาหารผสมโปรไบโอติก ดังแสดงในตารางที่ 14

ตารางที่ 14 กิจกรรมของน้ำเลือดในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย (Bactericidal activity) ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก ทุกวัน และวันเว้นวัน ที่ระยะเวลาทุก ๆ 10 วัน

ชุดการทดลอง	Bactericidal activity				
	วันที่ 10	วันที่ 20	วันที่ 30	วันที่ 40	วันที่ 50
กลุ่มควบคุม	1:8	1:32	1:16	1:16	1:16
ให้อาหารผสมโปรไบโอติก ทุกวัน	1:16	1:128	1:128	1:64	1:16
ให้อาหารผสมโปรไบโอติก วันเว้นวัน	1:16	1:64	1:64	1:32	1:16

3. การศึกษาปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในลำไส้

3.1 ปริมาณเชื้อ *Bacillus* spp. ทั้งหมดในลำไส้ (Total *Bacillus* count)

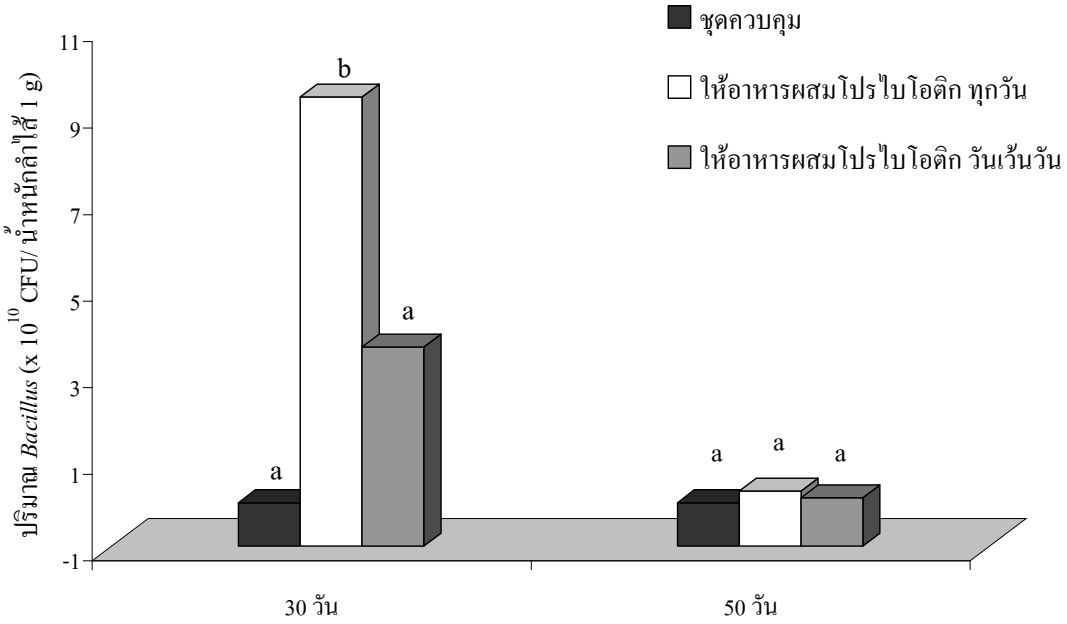
เมื่อนำลำไส้กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติกทุกวัน และวันเว้นวัน มาบดเพื่อนับจำนวนเชื้อ *Bacillus* spp. ด้วยวิธี spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA โดยพิจารณาจากลักษณะของโคโลนีซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของ *Bacillus* spp. และย้อมแกรมดูลักษณะของตัวเซลล์แบคทีเรียซึ่งจะเป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปแท่งยาว พบว่าหลังจากที่กุ้งได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกเป็นระยะเวลา 30 วัน กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติกทุกวัน มีจำนวนเชื้อ *Bacillus* spp. ทั้งหมดในลำไส้เฉลี่ยสูงสุดคือ $9.38 \pm 5.00 \times 10^{10}$ CFU ต่อน้ำหนักลำไส้ 1 กรัม ซึ่ง

แตกต่างชุดควบคุม และชุดการทดลองที่ให้อาหารผสมโปรไบโอติกวันเว้นวัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และหลังจากหยุดให้อาหารผสมโปรไบโอติกเป็นระยะเวลา 20 วัน (ที่ระยะเวลา 50 วันที่ทำการเก็บตัวอย่าง) พบว่าจำนวนเชื้อ *Bacillus* spp. ทั้งหมดในลำไส้ของกุ้งในทุกชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) (ตารางที่ 15 และภาพที่ 22)

ตารางที่ 15 ปริมาณเชื้อ *Bacillus* spp. ทั้งหมดในลำไส้กุ้งขาวแวนนาไม หลังจากให้อาหารผสมโปรไบโอติก วันเว้นวัน และทุกวัน เป็นระยะเวลา 30 วัน และหลังจากหยุดให้อาหารผสมโปรไบโอติกเป็นระยะเวลา 20 วัน

ชุดการทดลอง	ปริมาณ *Bacillus* spp. ทั้งหมดในลำไส้ของกุ้งขาว (CFU ต่อน้ำหนักลำไส้ 1 กรัม)	
	หลังจากให้อาหารผสมโปรไบโอติกที่ระยะเวลา 30 วัน	หลังจากหยุดให้อาหารผสมโปรไบโอติก 20 วัน
กลุ่มควบคุม	$8.68 \pm 2.20 \times 10^{6\ a}$	$1.37 \pm 1.12 \times 10^{6\ a}$
ให้อาหารผสมโปรไบโอติกทุกวัน	$9.38 \pm 5.00 \times 10^{10\ b}$	$2.72 \pm 2.45 \times 10^{9\ a}$
ให้อาหารผสมโปรไบโอติกวันเว้นวัน	$3.60 \pm 3.52 \times 10^{10\ a}$	$1.19 \pm 0.98 \times 10^{9\ a}$

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรที่ต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)



ภาพที่ 22 ปริมาณเชื้อ *Bacillus* spp. ทั้งหมดในลำไส้กุ้งขาวแวนนาไม หลังจากให้อาหารผสมโปรไบโอติกทุกวัน และวันเว้นวัน ที่ระยะเวลา 30 วัน และ 50 วัน

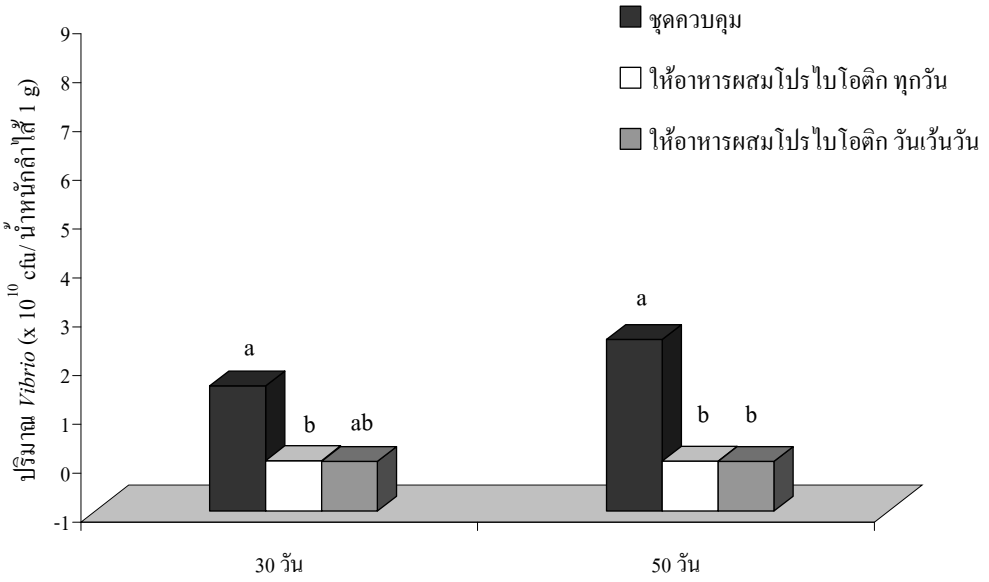
3.2 ปริมาณเชื้อ *Vibrio* spp. ทั้งหมดในลำไส้ (Total *Vibrio* count)

เมื่อนำลำไส้กุ้งในทุกชุดการทดลองมาบดเพื่อนับจำนวนเชื้อ *Vibrio* spp. ด้วยวิธี spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar หลังจากที่กุ้งได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกเป็นระยะเวลา 30 วันพบว่า กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติกทุกวัน มีจำนวนเชื้อ *Vibrio* spp. ในลำไส้เฉลี่ย น้อยกว่าชุดการทดลองที่ให้อาหารผสมโปรไบโอติก วันเว้นวัน และชุดควบคุม และแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และหลังจากหยุดให้อาหารผสมโปรไบโอติกเป็นระยะเวลา 20 วัน (ที่ระยะเวลา 50 วันที่ทำการเก็บตัวอย่าง) พบว่าจำนวนเชื้อ *Vibrio* spp. ทั้งหมดในลำไส้ของกุ้งในชุดการทดลองที่ให้อาหารผสมโปรไบโอติกทุกวัน และวันเว้นวัน มีจำนวนเชื้อ *Vibrio* spp. เฉลี่ยน้อยกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 16 และภาพที่ 23)

ตารางที่ 16 ปริมาณเชื้อ *Vibrio* spp. ทั้งหมดในลำไส้ของกุ้งขาวแวนนาไม หลังจากให้อาหารผสมโปรไบโอติก วันเว้นวัน และทุกวัน เป็นระยะเวลา 30 วัน และหลังจากหยุดให้อาหารผสมโปรไบโอติกเป็นระยะเวลา 20 วัน

ชุดการทดลอง	ปริมาณ *Vibrio* spp. ทั้งหมดในลำไส้ของกุ้งขาว (CFU ต่อน้ำหนักลำไส้ 1 กรัม)	
	หลังจากให้อาหารผสมโปรไบโอติกที่ระยะเวลา 30 วัน	หลังจากหยุดให้อาหารผสมโปรไบโอติก 20 วัน
กลุ่มควบคุม	$1.56 \pm 0.25 \times 10^{10\ a}$	$2.51 \pm 1.57 \times 10^{10\ a}$
ให้อาหารผสมโปรไบโอติกทุกวัน	$1.62 \pm 1.08 \times 10^{8\ b}$	$1.71 \pm 0.95 \times 10^{8\ b}$
ให้อาหารผสมโปรไบโอติกวันเว้นวัน	$3.36 \pm 2.24 \times 10^{8\ ab}$	$2.24 \pm 1.14 \times 10^{8\ b}$

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรที่ต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)



ภาพที่ 23 ปริมาณเชื้อ *Vibrio* spp. ทั้งหมดในลำไส้ของกุ้งขาวแวนนาไม หลังจากให้อาหารผสมโปรไบโอติกทุกวัน และวันเว้นวัน ที่ระยะเวลา 30 วัน และ 50 วัน

วิจารณ์ผลการศึกษา

การแยกและจำแนกชนิดของเชื้อ *Bacillus* spp. จากลำไส้ของกุ้งขาวแวนนาไม โดยใช้วิธีคัดเลือกเบื้องต้นจากคุณสมบัติในการสร้างสปอร์ จากการ shock ด้วยความร้อนและความเย็น และนำมาศึกษาคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยา และคุณสมบัติทางชีวเคมี จำแนกชนิดของเชื้อ *Bacillus* spp. ได้จากแหล่งเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงด้วยระดับความเค็มแตกต่างกัน คือ จากตัวอย่างกุ้งขาวที่เก็บตัวอย่างจากจังหวัดนครปฐม ซึ่งเลี้ยงด้วยความเค็มต่ำ (ความเค็ม 4-7 ppt) พบเชื้อ *Bacillus* 2 ชนิด ได้แก่ *Bacillus licheniformis* และ *B. cereus* ตัวอย่างกุ้งขาวที่เก็บตัวอย่างจากจังหวัดฉะเชิงเทรา ซึ่งเลี้ยงด้วยความเค็มปกติ (ความเค็ม 15 ppt) พบเชื้อ *Bacillus* 5 ชนิด ได้แก่ *B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. coagulans* และ *B. sphaericus* พบว่ามี *Bacillus* 2 ชนิด ที่พบจากแหล่งเลี้ยงทั้ง 2 แหล่ง ที่ความเค็มปกติ และความเค็มต่ำ คือ *B. licheniformis* และ *B. cereus* การเลือกใช้ *Bacillus* เป็นโปรไบโอติกหากเลือกใช้ *Bacillus* ชนิดที่สามารถดำรงชีวิตได้ในช่วงความเค็มกว้างก็จะสามารถใช้ประโยชน์ได้กับการเลี้ยงที่มีความเค็มแตกต่างกัน ผลการแยกเชื้อในการทดลองครั้งนี้ให้ผลสอดคล้องกับ การแยกเชื้อจากลำไส้ของกุ้งขาวแวนนาไม และกุ้งชนิดอื่น ซึ่งมีรายงานการพบเชื้อ *B. megaterium* (Li and Tan, 2009) จากลำไส้ของกุ้งขาวแวนนาไม และ พบเชื้อ *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. sphaericus* และ *B. pumilus* จากลำไส้ของกุ้งกุลาดำ (นิตยา และคณะ, 2549; วัชริยา, 2549; Rengpipat *et al.*, 2000; Balcázer *et al.*, 2007) โดย *Bacillus* spp. ที่แยกได้จากลำไส้กุ้งนี้ อาจเป็นแบคทีเรียที่กุ้งได้รับจากการกิน อาหาร น้ำ หรือดินในบ่อเลี้ยงเข้าไป เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp. สามารถพบได้ทั่วไปในดิน หรือในน้ำทะเล จากการศึกษาของ ศุภชัย และ ลิลา (2540) พบว่าในดินก้นบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำในเขตจังหวัดจันทบุรีมีแบคทีเรียหลายชนิด ได้แก่ *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp., *Salmonella* spp., *V. harveyi, V. parahaemolyticus , V. alginolyticus, V. vulnificus, V. anguilarum, V. damsela* และ *V. cholerae* รวมทั้งพบ *Bacillus* spp. ด้วย แต่ไม่ได้รายงานว่าเป็นชนิดใด เช่นเดียวกับการทดลองของ Li *et al.* (2007) ได้ทำการแยกเชื้อ *B. licheniformis* ได้จาก น้ำ และ ดินตะกอนในบ่อเลี้ยงกุ้ง นอกจากนี้ในบางการทดลองมีการแยกเชื้อ *Bacillus* spp. จาก hepatopancreas ของกุ้งขาว (Gullian *et al.*, 2004) ถั่วเหลืองหมัก (Tseng *et al.*, 2009) และ เศษเนื้อมะม่วง (Patel *et al.*, 2009) มาใช้เป็นโปรไบโอติกเช่นกัน

การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียสกุล *Bacillus* spp. ที่แยกได้จากลำไส้ของกุ้งขาวแวนนาไม ในการควบคุมเชื้อ *Vibrio harveyi*

จากการแยกและจำแนกชนิดของเชื้อ *Bacillus* spp. เพื่อนำมาศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อโดยวิธี cross streak พบว่าเชื้อ *Bacillus* ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *V. harveyi* ได้ คือ *B. licheniformis* BLF และ *B. licheniformis* BLS ส่วน *B. cereus* BCES และ *Bacillus sphaericus* BSP สามารถเข้าครอบครองพื้นที่เชื้อ *V. harveyi* และ เชื้อ *B. cereus* BCEF, *B. coagulans* BCO และ *B. subtilis* BSU ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *V. harveyi* ได้ ทั้งนี้ในการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* ต่อเชื้อ *V. harveyi* นี้ ให้ผลยับยั้งและเข้าครอบครองชัดเจนที่ 96 ชั่วโมง ซึ่งแสดงผลการเปลี่ยนแปลงช้าเมื่อเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus* spp. ต่อเชื้อ *Streptococcus agalactiae* และ *Aeromonas hydrophila* ที่ให้ผลยับยั้งและครอบครองชัดเจนที่ 48 ชั่วโมง (วัชริยา และนนทวิทย์, 2550) อย่างไรก็ตามการที่ *B. licheniformis* BLF และ *B. licheniformis* BLS สามารถยับยั้งเชื้อ *V. harveyi* และ *B. cereus* BCES และ *Bacillus sphaericus* BSP สามารถเข้าครอบครองพื้นที่เชื้อ *V. harveyi* ได้นั้นส่วนหนึ่งอาจมีผลมาจากกิจกรรมของกรดอินทรีย์ สารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และ สารปฏิชีวนะที่ *Bacillus* สร้างขึ้น (Williams and Vickers, 1986) หรือมีการผลิตเอนไซม์เพื่อย่อยหรือยับยั้งเชื้ออื่น (Bruno and Montville, 1993; Ochoa-Solano and Olmos-Soto, 2006) Katz and Demain (1977) รายงานไว้ว่า *B. licheniformis* สามารถสร้างสารปฏิชีวนะ Bacitracin, Proticin และ Licheniformin ได้

การยับยั้งเชื้อก่อโรคเมื่อเลี้ยง *Bacillus* ชนิดต่าง ๆ ที่แยกได้จากลำไส้ของกุ้งกุลาดำ ร่วมกับเชื้อก่อโรคในน้ำเลี้ยงมีรายงานว่า *Bacillus* spp. สามารถลดปริมาณเชื้อ *Vibrio harveyi* และมีชีวิตอยู่ในน้ำได้นาน (วัชริยา และนนทวิทย์, 2550) สอดคล้องกับผลการทดลองนี้ที่พบว่า *Bacillus sphaericus* BSP, *B. licheniformis* BLF, *B. subtilis* BSU, *B. cereus* BCES, *B. cereus* BCEF, *B. licheniformis* BLS, และ *B. coagulans* BCO สามารถลดปริมาณเชื้อ *V. harveyi* คิดเป็นร้อยละ 78.12, 67.86, 58.59, 51.04, 49.74, 33.76 และ 14.71 ตามลำดับ โดยผลการทดลองมีความสอดคล้องกับการทดลองด้วยวิธี cross streak ซึ่ง *B. licheniformis* BLF แสดงกิจกรรมการยับยั้งที่ดี ส่วน *B. sphaericus* BSP แสดงกิจกรรมการครอบครอง การศึกษานี้พบว่า *Bacillus* ที่เลี้ยงเดี่ยวสามารถเจริญและมีชีวิตอยู่ได้ตลอดการทดลอง 120 ชั่วโมง ส่วน *Bacillus* ที่เลี้ยงร่วมกับ *V. harveyi* พบว่ามีปริมาณลดลงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับที่เลี้ยงเดี่ยว

จากการทดลองพบว่า เชื้อ *Bacillus* sp. มีความสามารถในการลดปริมาณเชื้อก่อโรคได้ในสภาพ *in vitro* จากการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. ร่วมกับเชื้อ *V. harveyi* ด้วยวิธี co-culture assay โดยเชื้อ *Bacillus* sp. สามารถลดปริมาณเชื้อ *V. harveyi* ได้ ซึ่งเทียบจากปริมาณเชื้อ *V. harveyi* ที่เลี้ยงเดี่ยว เมื่อสิ้นสุดการทดลอง 120 ชั่วโมง สอดคล้องกับรายงานของ Vaseeharan and Ramasamy (2003) ซึ่งพบว่าปริมาณ *Bacillus subtilis* BT23 ที่เพิ่มขึ้นจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อ *V. harveyi* และ Ravi *et al*. (2007) แยกเชื้อแบคทีเรียจากน้ำทะเล ตะกอนดิน และทางเดินอาหารของปลาทะเล พบว่า *Bacillus cereus* สามารถยับยั้งเชื้อ *Vibrio* sp. ได้ ในสภาพ *in vitro*

การทดลองโดย วิธี cross streak และ co-culture นั้นพบว่า *B. licheniformis* ให้ผลการยับยั้งเชื้อ *V. harveyi* ได้ดีในทั้ง 2 วิธี ในขณะที่ *B. sphaericus* และ *B. subtilis* ให้ผลการยับยั้งเชื้อ *V. harveyi* ได้ดีในการทดสอบโดยวิธี co-culture เพียงอย่างเดียว ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในสภาพของการทดสอบที่ต่างกัน *Bacillus* แต่ละชนิด ซึ่งอาจสร้างสารยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ต่างชนิดกัน หรือมีปริมาณไม่เท่ากันในสภาพต่าง ๆ จึงทำให้ผลการทดสอบทั้ง 2 วิธีนั้นไม่สอดคล้องกันโดยตรง

ในการศึกษาระดับ *in vivo* มีรายงานว่า *B. subtilis* (นิตยา และคณะ, 2549) และ *B. licheniformis* (นิตยา และคณะ, 2549; Li *et al*., 2007) และ *B. megeterium* (Li and Tan, 2009) สามารถลดปริมาณเชื้อ *Vibrio* sp. ในลำไส้ของกุ้งขาวได้ ($P<0.05$) สอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ที่พบว่าเมื่อให้อาหารผสมโปรไบโอติกเป็นระยะเวลา 1 เดือน มีจำนวนแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ในลำไส้เพิ่มขึ้นในทุกชุดการทดลอง และมีปริมาณ *Vibrio* spp. ในลำไส้น้อยกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่าในการทดลองที่ 3 หลังจากหยุดให้อาหารผสมโปรไบโอติกแล้ว 20 วันจำนวน *Vibrio* ในลำไส้ของกุ้งขาวแวนนาไมในชุดทดลองที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกมีจำนวนน้อยกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ในการลดจำนวนแบคทีเรียสกุล *Vibrio* ได้ดี ถึงแม้จะหยุดให้โปรไบโอติกไปแล้ว โดยอาจเกิดการแข่งขันกับเชื้อก่อโรคในการเจริญเติบโต ทำให้ *Vibrio* ไม่สามารถเจริญได้ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าเชื้อ *Bacillus* มีความสามารถ ในการยึดเกาะกับลำไส้ และสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Vibrio* spp. ได้ (Ravi *et al*., 2007) นอกจากนี้การลดลงของเชื้อ *Vibrio* อาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงสภาพของเชื้อ *Vibrio* โดยในการศึกษาของมณจันทร์ และกมลพร (2543) ที่ได้ทำการศึกษาแบคทีเรียที่มีประโยชน์บางชนิด ได้แก่ *B. subtilis* และ *B. licheniformis* ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *V. harveyi* พบว่ามีผลในการยับยั้งหลังการทดสอบ 72 ชั่วโมง และเมื่อนำ *V. harveyi* ที่ถูกยับยั้งดังกล่าว มาศึกษาด้วยกล้อง Scanning Electron Microscope พบว่ารูปร่างของเซลล์เล็กกว่าปกติมาก และเป็นความผิดปกติแบบถาวร

การศึกษาชนิดและระดับความเข้มข้นของโปรไบโอติกที่เหมาะสมในการผสมอาหารเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม

เมื่อพิจารณาจากผลการทดลองที่ 1 และจากการตรวจเอกสารการศึกษานี้จึงเลือกใช้ *Bacillus licheniformis* และ *Bacillus subtilis* เป็นโปรไบโอติก เพื่อนำมาศึกษาชนิดและระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมในการผสมอาหารเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม ถึงแม้ว่า *B. sphaericus* จะให้ผลการในยับยั้งเชื้อ *V. harveyi* ได้ดีในการทดสอบโดยวิธี co-culture แต่มีรายงานอ้างอิงถึงความเป็นพิษต่อยุงทั้งในระยะตัวอ่อน และตัวเต็มวัย (Oie *et al*., 1993) ซึ่งยุงจัดอยู่ในกลุ่ม crustacean เช่นเดียวกับกุ้ง ในขณะที่ *B. cereus* ก็มีการนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกได้เช่นกัน (Ravi *et al*., 2007) แต่มีรายงานว่า *B. cereus* เป็นเชื้อก่อโรคท้องร่วงในมนุษย์ (ศิวาพร, 2542; Ehling-Schulz *et al*., 2004) ซึ่งหากในการนำไปใช้แล้วมีการตกค้างในกุ้งอาจส่งผลต่อผู้บริโภคได้ จึงไม่นำเชื้อ *Bacillus* ทั้ง 2 ชนิดดังกล่าวมาใช้เป็นโปรไบโอติกในการทดลองผสมอาหารเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไมในการทดลองครั้งนี้

การศึกษาชนิดและระดับความเข้มข้นของโปรไบโอติกที่เหมาะสมในการผสมอาหารเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม ซึ่งการศึกษาครั้งนี้ใช้เชื้อ *Bacillus* ที่แยกได้มาผสมอาหารในรูปของสปอร์ เพราะจะสะดวกต่อการเก็บรักษา สามารถคลุกเคล้าอาหารได้อย่างทั่วถึง (Farzanfar, 2006) และเหมาะสมต่อการนำไปใช้ของเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้ง โดยมีจำนวนเชื้อประมาณ 10^7 CFUต่อกรัม ทำการศึกษาโดยเลือกใช้ *B. licheniformis* และ *B. subtilis* และ *B. licheniformis* ร่วมกับ *B. subtilis* ในอัตราส่วน 1:1 ที่ความเข้มข้น 2 ระดับ คือ 3 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม และ 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ให้อาหารผสมโปรไบโอติกเป็นระยะเวลา 30 วัน แล้วศึกษาการเจริญเติบโต โดยการชั่งน้ำหนัก และทำการสุ่มเจาะเลือดกุ้งในแต่ละชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 10 ตัว ทุก ๆ 10 วัน เป็นเวลา 30 วัน นำเลือดที่ได้ไปวิเคราะห์ ปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมด กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase กิจกรรมของเม็ดเลือดในการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytic activity) และกิจกรรมในการทำลายเชื้อแบคทีเรียของน้ำเลือด (bactericidal activity) จากนั้นทำการวัดระดับภูมิคุ้มกันดังกล่าวหลังจากหยุดให้อาหารผสมโปรไบโอติก เพื่อศึกษาความต่อเนื่องของระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งหลังจากได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก

ในการทดลองครั้งนี้พบว่า การให้อาหารผสมโปรไบโอติก มีผลในการเร่งอัตราการเจริญเติบโตของกุ้งเพียงเล็กน้อย น้ำหนักของกุ้งในทุกชุดการทดลองที่ระยะเวลา 30 วัน ไม่มีความแตกต่างกัน อาจเป็นเพราะระยะเวลาที่ให้อาหารผสมโปรไบโอติกเป็นเพียงระยะเวลาสั้น เพียง 30 วัน โดยการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมเพื่อการค้าจะเลี้ยงเป็นระยะเวลาประมาณ 120 วัน (ชลอ และ

พรเลิศ, 2547) ซึ่งในการทดลองของ Rengpipat *et al*. (1998b) ให้อาหารผสม *Bacillus* S11 เป็นระยะเวลา 100 วัน พบว่ากุ้งกุลาดำมีอัตราการเจริญเติบโตสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

การทดลองที่ระยะเวลา 30 วัน ผลของการให้อาหารผสมโปรไบโอติกทั้ง 6 ชุดการทดลองต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม พบว่ามีค่าขององค์ประกอบทางระบบภูมิคุ้มกันแตกต่างกัน โดยกุ้งที่ให้อาหารผสม *B. licheniformis* 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไมได้ดี แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ในทุกค่าองค์ประกอบ ดังแสดงในตารางที่ 17 และพบว่าการใช้แบคทีเรียสกุล *B. licheniformis* ผสมอาหารที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดีที่สุด โดยมีค่าปริมาณเม็ดเลือดรวมเฉลี่ยสูงสุด คือ $22.33 \pm 2.16 \times 10^6$ เซลล์/มิลลิลิตร กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase 314.14 ± 98.04 หน่วย/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน ค่า Percent phagocytosis เท่ากับ 19.67 ±275 เปอร์เซ็นต์ แต่จะเห็นว่า ในชุดการทดลองที่ให้อาหารผสม *B. subtilis* 3 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม และ *B. licheniformis* + *B. subtilis* 3 และ 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม นั้นก็มีค่าสูงแตกต่างจากกลุ่มควบคุมเช่นกัน และค่า Bactericidal activity ก็มีค่าอยู่ที่ 1:128 เท่ากันในทุกชุดการทดลองที่ให้อาหารผสมโปรไบโอติก ซึ่งสูงกว่าชุดควบคุม

ค่าองค์ประกอบทางภูมิคุ้มกันที่ทำการศึกษา (ปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมด กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase ค่า percent phagocytosis และ bactericidal activity) ของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกในทุกชุดการทดลอง ทั้งในการทดลองที่ 2 และ 3 มีค่าขึ้นสูงที่ช่วงระยะเวลา 20-30 วันหลังจากได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก และลดลงเมื่อหยุดให้อาหารผสมโปรไบโอติก โดยที่ระยะเวลา 10 วัน และ 20 วัน หลังจากหยุดให้อาหารผสมโปรไบโอติกนั้น ค่าองค์ประกอบต่าง ๆ มีแนวโน้มลดลง ยกเว้นค่า percent phagocytosis ซึ่งยังคงมีค่าสูง อาจเป็นไปได้ว่า กิจกรรมการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้งนั้นถูกกระตุ้นต่อเนื่องได้ด้วย peptidoglycan และ lipopolysaccharide ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ของแบคทีเรียในลำไส้ที่ตายลง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเซลล์เม็ดเลือดที่ทำหน้าที่ในกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม รักษาระดับกิจกรรมไว้ได้เป็นระยะเวลานาน

กลไกการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไมโดยโปรไบโอติกนั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ซึ่งคาดว่าโปรไบโอติกสามารถเพิ่มความต้านทานโรค หรือการป้องกันโรคในกุ้งเหมือนกับสัตว์มีกระดูกสันหลัง คือป้องกันการเกาะผนังลำไส้ของเชื้อก่อโรค และกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่เกิดเองตาม

ธรรมชาติ การกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายกุ้งส่วนใหญ่เป็นการทำงานของเม็ดเลือดซึ่งเป็นการทำงานร่วมกันเพื่อดักจับสิ่งแปลกปลอม โดย Rodríguez *et al*. (2007) รายงานว่าระบบภูมิคุ้มกันที่ดีขึ้นสอดคล้องกับปริมาณเม็ดเลือดที่เพิ่มสูงขึ้น และเมื่อจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่ผสมอาหารให้กุ้งกินนั้นตายลงก็เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันแก่กุ้ง โดยองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์ของแบคทีเรียโปรไบโอติกก็คือ peptidoglycan ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน สอดคล้องกับรายงานของ มะลิ และคณะ (2543) ได้ทดลองใช้สาร peptidoglycan 2 ชนิด ซึ่งสกัดจากผนังเซลล์แบคทีเรีย คือ high molecular peptidoglycan (hm-PG) และ low molecular peptidoglycan (lm-PG) ที่สกัดจากเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกชนิด *Bifidobacterium thermophilum* นำมาผสมอาหารให้กุ้งกินเป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่าเม็ดเลือดของกุ้งที่ได้รับอาหารผสม peptidoglycan มีความสามารถในการผลิต superoxide anion ได้ดีกว่ากุ้งในกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ และในรายงานของ Itami *et al.* (1998) พบว่า กุ้งที่ได้รับอาหารผสม peptidoglycan ที่แยกได้จากผนังเซลล์ของ *B. thermophilum* มีค่ากิจกรรมของเม็ดเลือดในการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมสูง โดยมีค่า phagocytic index สูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) รวมทั้งมีปริมาณเม็ดเลือดชนิด granulocyte มากขึ้น เช่นเดียวกับในรายงานของ Purivirojkul *et al*. (2006) ซึ่งพบว่า กุ้งในกลุ่มที่ได้รับอาหารผสม peptidoglycan 0.18 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เป็นระยะเวลา 1 เดือน (5 วันต่อสัปดาห์) มีค่าองค์ประกอบทางภูมิคุ้มกัน ทั้งค่าปริมาณเม็ดเลือดรวม กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase ความสามารถในการผลิต superoxide anion และ bactericidal activity สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ส่วนองค์ประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบนั้นคือ lipopolysaccharide ซึ่งสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้เช่นกัน (Rengpipat *et al*., 2000; Gullian *et al*., 2004)

ตารางที่ 17 ผลของการใช้อาหารผสมโปรไบโอติกที่ชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ เลี้ยงกุ้งขาว ที่ระยะเวลา 30 วัน ต่อองค์ประกอบทางระบบภูมิคุ้มกันต่าง ๆ

ชนิดและความเข้มข้นของโปรไบโอติก	องค์ประกอบทางภูมิคุ้มกันที่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุม			
	ปริมาณเม็ดเลือดรวม	กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase	Percent phagocytosis	Bactericidal activity
ให้อาหารผสม *B. licheniformis* 3 กรัมต่ออาหาร 1 กก.	-	-	-	✓
ให้อาหารผสม *B. licheniformis* 5 กรัมต่ออาหาร 1 กก.	✓	✓	✓	✓
ให้อาหารผสม *B. subtilis* 3 กรัมต่ออาหาร 1 กก.	-	-	✓	✓
ให้อาหารผสม *B. subtilis* 5 กรัมต่ออาหาร 1 กก.	-	-	✓	✓
ให้อาหารผสม *B. licheniformis* + *B. subtilis* 3 กรัมต่ออาหาร 1 กก.	-	-	✓	✓
ให้อาหารผสม *B. licheniformis* + *B. subtilis* 5 กรัมต่ออาหาร 1 กก.	-	-	✓	✓

การศึกษาระยะเวลาการให้โปรไบโอติก ที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม

การทดลองนี้เลือกใช้แบคทีเรียสกุล *B. licheniformis* ที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ผสมอาหารให้กุ้งกินเพื่อศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสม เนื่องจาก ผลของการทดลองที่ 2 การใช้โปรไบโอติกที่ชนิดและความเข้มข้นนี้ สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยรวมได้ดีที่สุด โดยในการทดลองนี้พบว่า การเลี้ยงกุ้งด้วยอาหารผสม *B. licheniformis* ที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม โดยให้กินทุกวัน และวันเว้นวัน มีผลในการเร่งอัตราการเจริญเติบโตของกุ้งเพียงเล็กน้อย เช่นเดียวกับการทดลองที่ 2 โดยน้ำหนักของกุ้งในทุกชุดการทดลองที่ระยะเวลา 30 วัน ไม่มีความแตกต่างกัน ซึ่งน่าจะเกิดจากระยะเวลาของการทดลอง

เมื่อพิจารณาองค์ประกอบต่าง ๆ ทางภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม พบว่า ค่าปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมด ค่าปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase และ ค่า percent phagocytosis ของกุ้งในกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก ทุกวัน และวันเว้นวัน เป็นเวลา 30 วัน ไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) ส่วนค่า Bactericidal activity ของกุ้งในกลุ่มที่กินอาหารผสมโปรไบโอติกทุกวันมีค่าสูงกว่า กุ้งในกลุ่มที่รับโปรไบโอติกวันเว้นวัน และเมื่อพิจารณาปริมาณ แบคทีเรียในลำไส้นั้น จะเห็นได้ว่า กุ้งในกลุ่มที่รับโปรไบโอติกทุกวันนาน 30 วันมีปริมาณ *Bacillus* spp. สูงถึง $9.38 \pm 5.00 \times 10^{10}$ CFU/กรัม แตกต่างจากชุดการทดลองที่ได้รับโปรไบโอติกวันเว้นวัน และชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และเมื่อพิจารณาปริมาณ *Vibrio* spp. ในลำไส้ของกุ้งก็พบว่ามีปริมาณน้อยกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากชุดควบคุม($P>0.05$) แต่ไม่แตกต่างจากชุดการทดลองที่ได้รับโปรไบโอติกวันเว้นวัน แต่หลังจากหยุดให้อาหารผสมโปรไอติกแล้ว ที่ระยะเวลา 50 วัน ปริมาณ *Vibrio* spp. ในลำไส้กุ้งในชุดการทดลอง ที่ได้รับโปรไบโอติกวันเว้นวันก็มีปริมาณลดลงเช่นเดียวกัน ซึ่งน่าจะเกิดจากการที่ *Bacillus* spp. สามารถดำรงชีวิตอยู่ในลำไส้ และเข้าไปแย่งพื้นที่แบคทีเรียก่อโรค เพื่อสร้างตัวเองให้โดดเด่น ตลอดจนสามารถสร้างสารปฏิชีวนะมายับยั้ง หรือทำลายเชื้อก่อโรคได้ สังเกตได้จากการไม่เพิ่มจำนวนของ *Vibrio* spp. ในลำไส้กุ้งหลังจากหยุดให้อาหารผสมโปรไบโอติก

จากการทดลองครั้งนี้พบว่า เมื่อหยุดให้อาหารผสมโปรไบโอติกไปอย่างน้อย 10 วัน (จากผลที่ระยะเวลา 40 วัน) ทั้งในการทดลองที่ 2 และ 3 ค่าองค์ประกอบทางภูมิคุ้มกันส่วนใหญ่จะมีค่าลดลง ดังนั้นในการใช้ประโยชน์จากเชื้อแบคทีเรียสกุล *Bacillus* เป็นโปรไบโอติกเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งขาวแวนนาไมนั้นควรให้ตลอดการเลี้ยงเพื่อช่วยในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันอย่างต่อเนื่อง ลดปริมาณเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร และอาจเพิ่มอัตราการเจริญเติบโต และอัตรารอดได้

จากผลการศึกษานี้จึงมีข้อเสนอว่าควรใช้ *B. licheniformis* 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เป็นโปรไบโอติกผสมอาหารให้กุ้งขาวแวนนาไมกินวันเว้นวันตลอดการเลี้ยง เพื่อยกระดับการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันได้อย่างมีประสิทธิภาพ

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. การแยกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จากลำไส้ของกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*, Boone) จากฟาร์มเอกชนที่เลี้ยงด้วยความเค็มปกติและความเค็มต่ำ พบเชื้อ *Bacillus* 5 ชนิด คือ *B. licheniformis, B. cereus, B. coagulans*, *B. sphaericus* และ *B. subtilis*

2. ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Vibrio harveyi* ด้วยวิธี cross streak พบว่าเชื้อ *B. licheniformis* สายพันธุ์ BLF และ *B. licheniformis* สายพันธุ์ BLS แสดงคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *V. harveyi* AQVH03 (Inhibition activity) เชื้อ *B. cereus* สายพันธุ์ BCES และ *B. sphaericus* แสดงคุณสมบัติการครอบครองพื้นที่ของเชื้อ *V. harveyi* AQVH03 (Colonization activity) ส่วนเชื้อ *B. cereus* สายพันธุ์ BCEF, *B. coagulans* และ *B. subtilis* ไม่แสดงการยับยั้ง *V. harveyi* AQVH03 เมื่อนำเชื้อ *Bacillus* spp. ที่แยกได้มาทำการทดสอบความสามารถในการลดปริมาณ *V. harveyi* AQVH03 ในน้ำทะเลความเค็ม 20 ppt พบว่า *Bacillus* ทุกชนิดสามารถลดปริมาณ *V. harveyi* AQVH03 ได้ที่ระดับต่าง ๆ กัน

3. การใช้ *B. licheniformis* และ *B. subtilis* ผสมอาหาร เป็นโปรไบโอติกที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม พบว่า การใช้ *B. licheniformis* เพียงชนิดเดียวที่ระดับความเข้มข้น 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีผลทำให้ค่าองค์ประกอบทางภูมิคุ้มกันส่วนใหญ่ ทั้งปริมาณเม็ดเลือดรวม กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase ค่า Percent phagocytosis และกิจกรรมของน้ำเลือดในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย (bactericidal activity) สูงกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ และแตกต่างจากกลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ที่ระยะเวลา 30 วัน และเมื่อหยุดให้อาหารผสมโปรไบโอติกระดับภูมิคุ้มกันจะลดลง ยกเว้นค่ากิจกรรมของเม็ดเลือดในการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม ส่วนผลในการยับยั้งเชื้อ *Vibrio* spp. ในลำไส้ของกุ้ง พบว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติกในทุกชุดการทดลองมีจำนวนเชื้อ *Vibrio* spp. ในลำไส้น้อยกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

4. การทดลองให้อาหารผสม *B. licheniformis* ความเข้มข้น 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ทุกวัน และวันเว้นวัน พบว่าระดับภูมิคุ้มกันของทั้งสองกลุ่มทดลองไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ยกเว้นค่า Bactericidal activity ซึ่งชุดการทดลองที่ให้อาหารผสมโปรไบโอติกทุกวัน มีค่าสูงกว่าชุดการทดลองที่ให้อาหารผสมโปรไบโอติกวันเว้นวัน ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า การใช้ *B. licheniformis* ระดับความเข้มข้น 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เป็นโปรไบโอติกในกุ้งขาวแวนนาไม ให้ผลดีในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และลดปริมาณเชื้อ *Vibrio* spp. ในลำไส้ โดยสามารถให้วันเว้นวันได้ และควรให้ต่อเนื่องตลอดการเลี้ยง

ข้อเสนอแนะ

1. กุ้งขาวแวนนาไมเป็นสัตว์เลือดเย็นซึ่งมีกลไกการเปลี่ยนแปลงในร่างกายขึ้นกับสภาวะแวดล้อมภายนอก ซึ่งส่งผลต่อระบบภูมิคุ้มกันด้วย ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมบางประการต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม เพื่อเป็นแนวทางจัดการระบบการเลี้ยงควบคู่ไปกับการใช้โปรไบโอติกให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อไป

2. ปัจจุบันการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมนิยมเลี้ยงในพื้นที่น้ำจืดมากขึ้น จึงประสบปัญหาโรคที่เกิดจากแบคทีเรียน้อยลง หากเป็นไปได้ควรมีการศึกษาเพิ่มเติม ถึงประสิทธิภาพการใช้โปรไบโอติก เพื่อกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน และความต้านทานต่อโรคไวรัสต่าง ๆ

3. การใช้โปรไบโอติกร่วมกับวิธีอื่น ๆ เช่น พรีไบโอติกยังเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่อาจสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของการใช้โปรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมได้

4. ควรมีการศึกษาเกี่ยวกับกลไกการยึดเกาะผนังลำไส้ของเชื้อ *Bacillus* ในลำไส้ของกุ้งขาวเพิ่มเติม และกลไกการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน เพื่อเป็นแนวทางในการอธิบายความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของโปรไบโอติกในกุ้งได้ดียิ่งขึ้น เนื่องจากปัจจุบันมีการศึกษาเกี่ยวกับกลไกดังกล่าวในกุ้งน้อยมาก

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กิจการ ศุภมาตย์, สุภาพ เกียรติทับทิว และ R. Hoffmann. 2543ก. ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ: III. การศึกษาทางจุลทรรศน์อิเลคตรอนของเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำ. **วารสารสงขลานครินทร์ ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี** 22 (ฉบับพิเศษ): 589-596.

_____, วุฒิพร พรหมขุนทอง, ชุติมา ตันติกิตติ และ R. Hoffmann. 2543ข. ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ: II. เซลล์และเนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมในกุ้งกุลาดำ. **วารสารสงขลานครินทร์ ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี** 22 (ฉบับพิเศษ): 581-588.

_____. 2543ข. 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 เอกปณิธานพงศ์, T. Itami และ จิราพร เกษรจันทร์. 2543ค. ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ: I. เทคนิคในการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันโรคและองค์ประกอบเลือดในกุ้งกุลาดำ. **วารสารสงขลานครินทร์ ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี** 22 (ฉบับพิเศษ): 567-580.

_____. 2543ค. 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. Cytochemical features of shrimp hemocytes. **Biol. Bull. Mar. Biol. Lab. Woods. Hole.** 173 (1): 178-187.

_____. 2543ค. 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.

_____. 2543ค. 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.

_____. 2543ค. ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ: I. เทคนิคในการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันโรคและองค์ประกอบเลือดในกุ้งกุลาดำ. **วารสารสงขลานครินทร์ ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี** 22 (ฉบับพิเศษ): 567-580. อ้างถึง Soderhall, K. 1982. Prophenoloxidase activating system and melanization a recognition machanism of arthropods. A review. **Dev. Comp. Immunol.** 6: 601-611.

_____. 2543ค. 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.

จิรพร สิงหพันธ์. 2547. **ผลของ Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV) ต่อการเจริญเติบโตและการรอดของกุ้งขาวแปซิฟิก (*Litopenaeus vannamei*; Boone, 1931).** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ชลอ ลิ้มสุวรรณ. 2528. **โรคปลา.** ภาควิชาชีววิทยาประมง, คณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

_____ และ พรเลิศ จันทร์รัชชกูล. 2547. **อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย**. บริษัท เมจิคพับบลิเคชั่น จำกัด, กรุงเทพ.

ชัยชาญ ไตรศรีศิลป์. 2545. **ฟีนอลออกซีเดสที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon*.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นิตยา ยิ้มเจริญ, นนทวิทย์ อารีย์ชน, ชุมพล ศรีทอง และ นิติ ชูเชิด. 2549. การใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius), น. 214-228. *ใน* **การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44 (สาขาประมง),** 30 มกราคม - 2 กุมภาพันธ์ 2549.

บุญอ้อม โฉมที. 2550. **สถิติการวางแผนการทดลอง: ทฤษฎีและการวิเคราะห์ด้วย SAS**. ภาควิชาสถิติ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์. 2546. ศาสตร์ของกุ้งขาวลิโทพีเนียส แวนนาไม. **สัตว์น้ำ** 14 (161): 109-112.

ภิญโญ เกียรติภิญโญ. 2545. **วิธีปฏิบัติสำหรับการเลี้ยงกุ้งขาว แอล. แวนาไม (Practical Technology or *Litopenaeus vannamei* Culture).** สำนักพิมพ์เมืองเกษตร แม็กกาซีน, สมุทรปราการ.

มณจันทร์ เมฆธน และ กมลพร มาแสวง. 2543. ศักยภาพของแบคทีเรียที่มีประโยชน์บางชนิดในการยับยั้งแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ที่ทำให้เกิดโรคเรืองแสง, น. 259-268. *ใน* **การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38**, 1-4 กุมภาพันธ์ 2543.

มะลิ บุณยรัตผลิน, กิจการ ศุภมาตย์, จูอะดี พงศ์มณีรัตน์, สิทธิ บุณยรัตผลิน และ Y. Toride. 2543. สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันและการใช้วัคซีนในกุ้งกุลาดำ: IV. ผลของเปปติโดกลัยแคนโมเลกุลใหญ่และเล็กต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ. **วารสารสงขลานครินทร์ ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี** 22 (ฉบับพิเศษ): 689-696.

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

วรรณิภา เพี้ยงภักตร์. 2539. **การใช้แบคทีเรียเสริมในอาหารกุ้ง**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วัชริยา ภูรีวิโรจน์กุล. 2549. **การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* Fabricius**. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

_____ และ นนทวิทย์ อารีย์ชน. 2550. การใช้ประโยชน์จากแบคทีเรียสกุล *Bacillus* spp. ที่แยกได้จากลำไส้กุ้งกุลาดำจากแหล่งธรรมชาติ ในการควบคุมแบคทีเรียก่อโรคในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ, น.166-173. *ใน* **การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45 (สาขาประมง)**, 30 มกราคม - 2 กุมภาพันธ์ 2550.

ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์, ศิริเพ็ญ สังข์ชัย และ พิสมัย โพธิ์เวชกุล. 2547. การเสริมโพรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ, น. 96-109. *ใน* **สัมมนาเผยแพร่ผลงานวิจัย เรื่อง การวิจัยเพื่อแก้ปัญหาอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งของประเทศไทย.** กองโครงการและประสานงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ, กรุงเทพฯ.

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

ศิวาพร ศิวเวชช. 2542. **การสุขาภิบาลโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร**. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ศุภชัย ประพัสศร และ ลิลา เรืองแป้น. 2540. แบคทีเรียฟลอร่าในดินบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ, น. 133-144. *ใน* **รายงานการประชุมสัมมนาทางวิชาการสถาบันเทคโนโลยีราชมงคล ครั้งที่ 14**, 26-29 มกราคม 2546. โรงแรมพาวิลเลี่ยนและวิทยาเขตภาคใต้ จ.สงขลา.

สิทธิ แดงสกุล และลิลา เรืองแป้น. 2541. ประสิทธิภาพของโปรไบโอติกที่ผลิตจาก *Bacillus* เพื่อการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. **วารสารการประมง.** 5 (5): 446-455.

อนันต์ชัย เขื่อนธรรม. 2542. **หลักการวางแผนการทดลอง**. ภาควิชาสถิติ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

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

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.

Balcázar, J.L., T. Rojas-Luna and D.P. Cunningham. 2007. Effect of the addition of four potential probiotic strains on the survival of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following immersion challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. **J. Inver Patho.** 96: 147-150.

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

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.

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. Rawin and R.Y. Stanier. 1974. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.** 8th ed. The William and Wikins Co., Baltimore.

Cowan, S. T. 1975. **Cowan and Steel's Manual for Identification of Media Bacteria**. Cambridge Univ. Press, London.

Dore, I. and C. Frimodt. 1987. **An Illustrated Guide to Shrimp of the World.** Osprey Books.

Ehling-Schulz, M., M. Fricker and S. Scherer. 2004. "*Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness". **Mol. Nutr. Food Res**. 48 (7): 479–487.

Farzanfar, A. 2006. Minireview/ The use of probiotics in shrimp aquaculture. **FEMS Immunol Med Microbiol**. 48: 149-158.

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 setiperus*. **J. Inver. Pathol.** 24: 141-148.

Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. **J. Appl. Bacteriol.** 66: 365-378.

_____. 1992. **Probiotics**. The Scientific Basis. 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.

Goto, K., T. Omura, Y. Hara and Y. Sadaie. 2000. Application of the partial 16S rDNA sequence as an index for rapid identification of spicies in the genus *Bacillus*. **J. Gen. Appl. Microbiol**. 46: 1-8.

Gram, L., J. Melchiorsen, 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.

Gullian, M., F. Thompson and J. Rodriguez. 2004. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. **Aquaculture** 233: 1-14.

Gunnarsson, S. G. S. and A. M. Lackie. 1985. Haemocyte aggregation in *Schistocera gregaria* and *Periplaneta amerricana* as a response to injected substances of microbial origin. **J. Invertebr. Pathol.** 46: 312-319.

Havenaar, R. and J.H.J. Huis in't Veld. 1992. Probiotics : a general views, pp. 151-170. *In* B.J.W. Wood ed. **The Lactic Acid Bacteria in Health and Diseases.** London: Elsevier Applied Science.

Henriques, A.O. and C.P. Moran. 2000. Structure and assembly of the bacterial endospore coat. **Methods Enzymol.** 20: 95-110.

Hoffmann, J. A., J. M. Reichhart and C. Hetru. 1996. Innate immunity in higher insects. **Curr. Opin. Immunol**. 8: 8-13.

_____, F. C. Kafatos, C. A. Jr. Janeway and R. A. B. Ezekowitz. 1999. Phylogenetic perspectives in innate immunity. **Science** 248: 1313-1318.

Holt, J.G., M.P. Bryant, N.R. Krieg, S.P. Lapage, H. Lautrop, J. Liston, R.G.E. Murray, A.W. Rawin and J.T. Staley. 1979. **The Shorter Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.** 8th ed**.** The William and Wikins Co., Baltimore.

Holthuis, L.B. 1980. **FAO A Species Catologue Vol. 1, Shrimp and Prawns of the World.** Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Hose, J.E., G.E. Martin, V.A. Nguyen, J. Lucus and T. Rusentein. 1987. Cytochemical features of shrimp hemocytes. **Biol. Bull. Mar. Biol.** 173 (1): 178-187.

Inglis, V., R. J. Roberts and N. R. Bromage. 1993. **Bacterial Diseases of Fish.** Institute of Aquaculture. The University Press, Cambridge.

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 and C. H. Tan, eds. **The Third Asian Fisheries Forum.** Asian Fisheries Society, Manila, Philippines.

_____, M. Asano, K. Tokushige, K. Kubono, A. Nakagawa, N. Takeno, H. Nishimura, M. Maeda, M. Kondo and Y. Takahashi. 1998. Enhancement of disease resistance of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, after oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. **Aquaculture** 164: 277–288.

Johansson, M.W. and K. Soderhall. 1989. A cell adhesion factor from crayish haemocytes has degranulating activity towards crayfish granulars cells. **Insect. Biochem.** 19:183-190.

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.

Katz, E. and A.L. Demain. 1977. The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry biogenesis and possible function. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 41: 449-474.

Kawasaki, H., Y. Hoshino, A. Hirata and K. Yamasato. 1993. Is intracytoplasmic membrane structure a generic criterion? It is not parallel to phylogenetic interrelationships among photosynthetic purple non-sulfur bacteria. **Arch. Microbiol.** 160: 358-362.

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 mucus coated 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.

Lee, S.Y. 2001. Initiation of innate immune responses in the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. Acta Univertitiatis Upsaliensis. **Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology**.

Lemos, M.L., A.E. Toranzo and J.L. Barja. 1985. Antibiotic activity of epiphytic bacteria isolated from intertidal seaweeds. **Microb. Ecol**. 11: 149-163.

_____, 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.

Li, J. and B. Tan. 2009. Dietary probiotic *Bacillus* OJ and isomaltooligosaccharides influence the intestine microbial populations, immune responses and resistance to white spot syndrome virus in shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Aquaculture** 291: 35-40.

Li, K., T. Zheng, Y. Tain, F. Xi, J. Yuan, G. Zhang and H. Hong. 2007. Beneficial effects of *Bacillus licheniformis* on the intestinal microflora and immunity of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Biotechnol. Lett**. 29: 525-530.

Lightner, D.V. 1996. **A Handbook of Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Penaeid Shrimp**. World Aquaculture Society, World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA.

Limsuwan, C. 2003. Status and prospects of white shrimp culture in Southeast Asia, pp. 50-59. *In* **DSM Nutritional Products the 9th Aquaculture Conference Asia Pacific.** Bangkok, Thailand.

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.

Millar, B. C., X. Jiru and J. E. Moore. 2000. A simple and sensitive method to extract bacterial, yeast and fungal DNA from blood culture material. **J. Microbiol. Methods**. 42: 139-147.

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. 1997. The role of microorganisms in aquaculture ponds. **Aquaculture** 151: 333–349.

_____. 1998. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. **Aquaculture** 164: 351–358.

Nicholson, W.L., N. Munakata, G. Horneck, H.J. Melosh and P. Setlow. 2000. Resistance of endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 64: 548-572.

Ochoa-Solano, J.L. and J. Olmos-Soto. 2006. The functional property of *Bacillus* for shrimp feeds. **Food Microbiol.** 23: 519-521.

Oie C., J. Hindley and C. Berry. 1993. Binding of purified *Bacillus sphaericus* binary toxin and its deletion derivatives to *Culex quinquefasciatus* gut: elucidation of functional binding domains. **J. Gen. Microbiol**. 138: 1515-1526.

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 poecilotherms**. Proceedings of the International Symposium on Microbiology in Poecilotherms. 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.

Patel, A. K., M. K. Deshattiwar, B. L. Chaudhari and S. B. Chincholkar. 2009. Production, purification and chemical characterization of the catecholate siderophore from potent probiotic strain of *Bacillus* spp. **Bioresour. Technol.** 100: 368-373.

Perez Farfante, I. and B. Kensley. 1997. **Penaeoid and Sergestoid Shrimps and Prawns of the World : Keys and Diagnoses for the Families and Genera.** Memories du Museum National. Paris, France.

Phianphak, W., S. Piyatirativarakul, P. Menasveta and S. Rengpipat. 1997. Use of probiotics in *Penaeus monodon*, pp. 18. *In* **2nd Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference 1997,** abstract of poster session. Phuket, Thailand.

Pick, E. and Y. Keisari. 1980. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. **J. Immunol. Methods** 38: 161-170.

Purivirojkul, W., M. Maketon and N. Areechon. 2005. Probiotic properties of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus subtilis* in black tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius) culture. **Kasetsart J. (Nat. Sci.)** 39: 262-273.

_____, N. Areechon and P. Srisapoome. 2006. The effect of peptidoglycan on immune response in black tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius). **Kasetsart J. (Nat. Sci.)** 40: 181-187.

_____ and N. Areechon. 2007. Application of *Bacillus* spp. isolated from black tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius) from natural habitat for control pathogenic bacteria in aquaculture. **Kasetsart J. (Nat. Sci.)** 41: 125-132.

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

Ravi, A.V., K.S. Musthafa, G. Jegathammbal, K. Kathiresan and S.K. Pandian. 2007. Screening and evaluation of probiotics as a biocontrol agent against pathogenic *Vibrios* in marine aquaculture. **Lett. App. Micro.** 45: 219-223.

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. Piyatirativarakul and P. Menasveta. 1998a. 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.

_____. 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). **Aquaculture** 191: 271-288.

_____, W. Phianphak., S. Piyatirativarakul and P. Menasveta. 1998b. Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. **Aquaculture** 167: 301-313.

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.

Rodríguez, J., Y. Espinosa, F. Echeverría, G. Cárdenas, R. Román and S. Stern. 2007. Exposure to probiotics and β-1,3/1,6-glucans in larviculture modifies the immune response of *Penaeus vannamei* juveniles and both the survival to white spot syndrome virus challenge and pond culture. **Aquaculture** 273: 405-415.

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.

_____, 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.

Sharmila, R., T.J. Abraham and V. Sundararaj. 1996. Bacterial flora of semi-intensive pond reared *Penaeus indicus* (H.Milne Edwards) and the environment. **J. Aquacult. Trop.** 11: 193–203.

Smith, V. J. and J.R.S Chisholm. 1992. Non-cellular immunity in crustaceans. **Fish Shellfish Immunol.** 2 (1): 1-31.

Soderhall, K. and L. Cerenius. 1992. Crustacean immunity. **Annu. Rev. Fish Dis.** 2: 3-23.

Srisuvan, T., K.F.J. Tang and D.V. Lightner. 2005. Experimental infection of *Penaeus monodon* with Taura syndrome virus (TSV). **Dis. Aquat. Org.** 67: 1–8.

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., 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.

Sung, H.H., Y.L. Yang, and Y.L. Song. 1996. Enhancement of microbicidal activity in tiger shrimp *Penaeus monodon* via immunostimulation. **J. Crust. Biol.** 16: 278-284.

Todar, K. 2005. **Todar's Online Textbook of Bacteriology: The Genus Bacillus**. University of Wisconsin -Madison, Department of Bacteriology.

Tseng, D.Y., P.L. Ho, S.Y. Huang, S.C. Cheng, Y.L. Shiu, C.S. Chiu and C.H. Liu. 2009. Enhancement of immunity and disease resistance in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by the probiotic, *Bacillus subtilis* E20. **Fish Shellfish Immunol.** 26: 339-344.

Vandenbergh, P. 1993. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. **FEMS Microbiol. Rev.** 12: 221–238.

Vaseeharan, B. and P. Ramasamy. 2003. Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Lett. Appl. Microbiol.** 36 (2): 83.

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. **Microb. Ecol.** 12: 43-52.

Yamada, Y., K. Kazushige, H. Kawasaki, Y. Widyastuti, S. Saono, T. Seki, T. Uchimura and K. Komagata. 2000. *Asia bogorensis* gen. nov., sp. nov., an unusual acetic acid bacterium in the α*–Proteobacteria*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol**. 50: 823-829.

ภาคผนวก

สารเคมีที่ใช้สำหรับงานทางด้านอณูชีวโมเลกุล

1. 10X MOP buffer

200 mM [N-Morpholino] proprapane sulfonic acid
50 mM Sodium acetate
10 mM EDTA

ปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 6.5-7.0 ด้วย NaOH

2. PBS buffer (Phosphate buffer saline) ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

NaCl	8.0 กรัม
KCl	0.2 กรัม
Na_2HPO_4	1.44 กรัม
KH_2PO_4	0.24 กรัม

เติมน้ำกลั่นปริมาตร 900 มิลลิลิตร แล้วปรับ pH ให้ได้ประมาณ 7.4 ด้วยกรดเกลือเข้มข้น (Conc. HCl) จากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 20 นาที

3. 1.0 M IPTG (Isopropylthio-β-D-thiogalactoside)

Isopropylthio-β-D-thiogalactoside 2.38 กรัม
น้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร

4. X-gal (5-Bromo-4-Cholo-3-Indoyl-β-D-Galactopyranoside) 50 mg/ml

5-Bromo-4-Cholo-3-Indoyl-β-D-Galactopyranoside 100 มิลลิลิตร
Dimethyl-formamide 2 มิลลิลิตร

6. Ethidium bromide (5 μg/ml)

ทำเป็น Stock solution ของ Ethidium bromide โดยละลายผง Ethidium bromide ด้วยน้ำ deionized ให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นจึงเตรียมความเข้มข้นเพื่อใช้สำหรับแช่ Agarose gel ให้ได้ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

7. Marker 100 bp ปริมาตร 60 ไมโครลิตร

100 bp DNA Ladder plus	10 ไมโครลิตร
6X Loading dye solution	10 ไมโครลิตร
Distilled water	40 ไมโครลิตร

8. 5X TBE (Tris-Borate-EDTA) ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

Tris base	54.0 กรัม
Boric acid	27.5 กรัม
EDTA (pH 8.0)	20.0 กรัม

ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร แล้วจึงนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 20 นาที

9. 10X Loading dye

Ficol 400 7.5 กรัม
Bromphenol blue 0.125 กรัม
เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 50.0 มิลลิลิตร

การถ่ายโอน DNA ลูกผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน (Transformation)

1. การเตรียม Competent Cell

1.1 นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ JM109 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บ่มแบบเขย่านานข้ามคืน (16-18 ชั่วโมง)

1.2 แบ่งเซลล์ที่เลี้ยงได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตรมาเลี้ยงต่อในหลอดทดลองที่มีอาหาร LB broth ปริมาตร 9 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง แล้วจึงแช่ในน้ำแข็งนาน 10 นาที

1.3 แบ่งอาหารเลี้ยงเซลล์ใส่ในหลอด Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร อันใหม่ จำนวน 6 หลอด นำไปปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที แล้วจึงดูดอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง เหลือเฉพาะตะกอนสีขาว

1.4 เติม 100 mM $CaCl_2$ ปริมาตร 625 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันโดยใช้ปิเปตดูดขึ้นดูดลง แล้วจึงแช่ในน้ำแข็งนาน 30 นาที

1.5 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ดูดของเหลวส่วนบนทิ้ง แล้วเติม 100 mM $CaCl_2$ (ที่มี 15% Glycerol) ปริมาตร 375 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้

2. การเคลื่อนย้าย DNA ลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านด้วยวิธี Transformation

การเคลื่อนย้าย DNA ลูกผสมที่เตรียมได้เข้าสู่เซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านใช้วิธี Heat shock transformation โดยการเติม Ligation product ปริมาตร 5 ไมโครลิตรลงในหลอด Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วใส่ Competent cell ที่เตรียมได้ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันโดยการดีดเบา ๆ แล้วแช่ไว้ในน้ำแข็งนาน 25 นาที จึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส 50 วินาที จากนั้นนำกลับไปแช่ในน้ำแข็งทันที เป็นเวลา 3 นาที เติม SOC medium ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วปิดปากหลอดด้วยพาราฟิล์ม จากนั้นบ่มแบบ

เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 5 นาที จากนั้นดูดปริมาตรของสารละลายรวมออกให้เหลือเพียง 100 ไมโครลิตร ผสมตะกอนและอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหลือให้เข้ากัน แล้วนำสารละลายทั้งหมดไปเกลี่ยลงบนอาหาร LB agar plate ที่มียาปฏิชีวนะ Ampicilin 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งได้มีการเกลี่ย X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และ IPTG (Isopropylthio-β-D-galactoside) ความเข้มข้น 100 mM ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงบนอาหาร LB agar plate ไว้ก่อนแล้ว จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืนคัดเลือกเซลล์ที่มีพลาสมิด DNA สายผสม โดยคัดเลือกโคโลนีของเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยว ๆ สีขาว ซึ่งคาดว่าจะมีพลาสมิด DNA สายผสมมาเลี้ยงต่อใน LB-Ampicillin plate เพื่อเตรียมเป็น Master plate สำหรับนำไปใช้ในการตรวจสอบผลการโคลนต่อไป

3. การตรวจสอบผลของการโคลน

การตรวจสอบผลของการโคลน จะอาศัยการทำ Colony PCR เพื่อตรวจสอบความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้ Universal primer ชนิด M13 Forward และ M13 Reverse ซึ่งมีตำแหน่งอยู่ทางด้านซ้ายและขวาของตำแหน่ง Multiple cloning site ตามลำดับ ในการตรวจสอบหาชิ้น Insert ของยีนที่สนใจ โดยการทำ Colony PCR จะใช้โคโลนีสีขาวของแบคทีเรียที่ได้มีการคัดเลือกไว้ใน Master plate มาใช้เป็น Template ส่วนสารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยามีดังนี้

10X *Taq* Buffer ที่มี $(NH_4)_2SO_4$	1.500	ไมโครลิตร
2.5 mM dNTP	1.600	ไมโครลิตร
5 mM M13 forward primer	1.500	ไมโครลิตร
5 mM M13 reverse primer	1.500	ไมโครลิตร
1.25 mM $MgCl_2$	1.875	ไมโครลิตร
5 U/UI *Taq* DNA polymerase	0.200	ไมโครลิตร
Distilled water	6.825	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	15.000	ไมโครลิตร

ใช้ไม้จิ้มฟันหรือ Micropipette tip ที่สะอาดและปลอดเชื้อ เขี่ยโคโลนีของแบคทีเรียที่ต้องการตรวจสอบจาก Master plate ใส่ลงในสารละลายที่เตรียมไว้ในหลอด PCR ขนาด 200

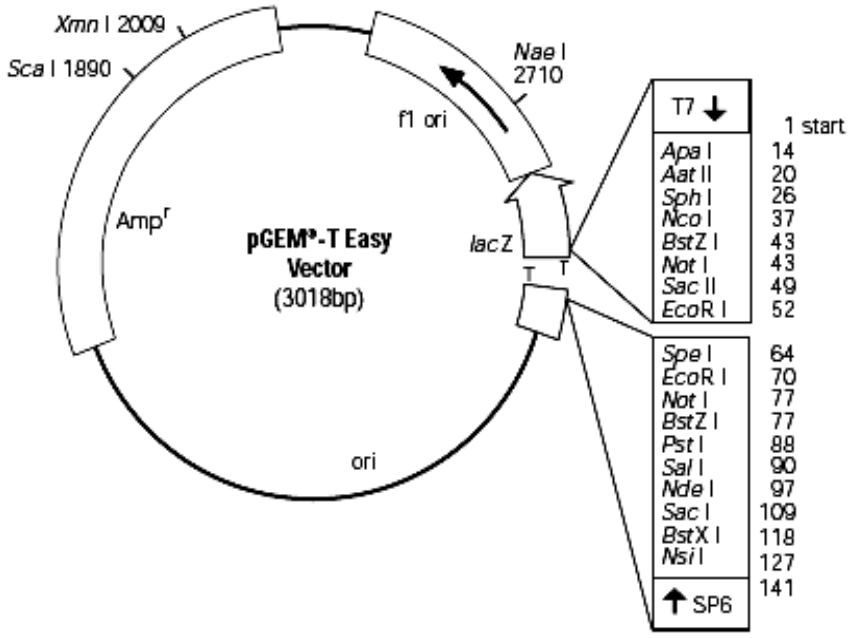
ไมโครลิตร จากนั้นนำหลอด PCR ที่ได้ใส่ในเครื่อง Thermal cycle machine เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA สำหรับอุณหภูมิที่ใช้นั้นเป็นดังนี้ คือช่วงแรก ใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ช่วงที่สอง ใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที 55 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที 30 วินาที จำนวน 30 รอบ และช่วงที่สาม 72 องศาเซลเซียส 5 นาที

การตัด Plasmid DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

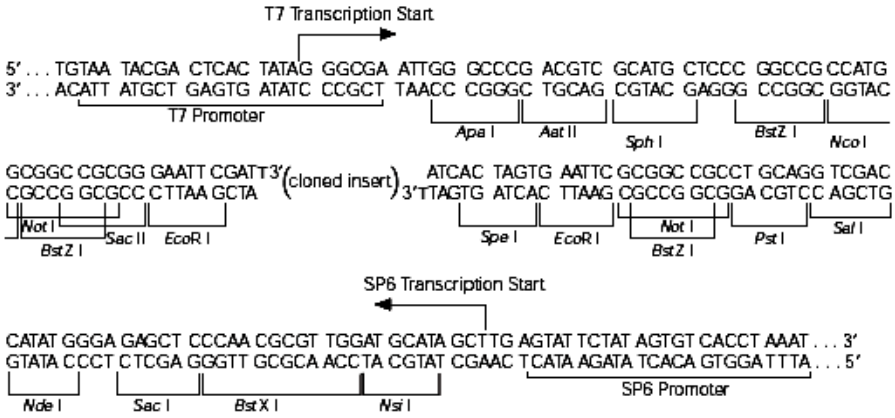
จากแผนที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pGEM-T Easy (ภาพผนวกที่ 1) ซึ่งเป็น Cloning vector ที่มีจุดตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme) ชนิด *Eco* RI อยู่ทั้งสองด้านของชิ้น Insert ดังนั้นจึงใช้เอนไซม์ชนิด *Eco* RI เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการตัด Recombinant DNA ที่ได้จากการโคลน ซึ่งมีส่วนประกอบในการทำปฏิกิริยาดังนี้

Plasmid DNA		2.00	ไมโครลิตร
10X Buffer *Eco* RI		2.00	ไมโครลิตร
Eco RI		0.25	ไมโครลิตร
Distilled water		5.75	ไมโครลิตร
	ปริมาตรรวม	10.00	ไมโครลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดใส่ลงในหลอดขนาด 0.6 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน (16-18 ชั่วโมง) ตรวจสอบผลของการทำปฏิกิริยาโดยใช้วิธี Agarose gel electrophoresis โดยใช้ Agarose gel ที่เข้มข้น 1% ในบัฟเฟอร์ 1X TBE โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ ตรวจสอบแถบ DNA ด้วยการย้อมใน Ethidium bromide ที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตรวจดูแถบ DNA และถ่ายภาพแถบ DNA ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต



(ก)



(ข)

ภาพผนวกที่ 1 (ก) แผนที่ของ pGEM T-Easy cloning vector

(ข) ตำแหน่ง Promoter และ Multiple cloning size

ที่มา: Promega Corporation (2009)

อาหารเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือด K-199 และสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด

1. ส่วนผสมของอาหารเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือด K-199

1.1 M-199

อาหารเลี้ยงเซลล์ Medium-199 จำนวน 1 ซอง ผสมกับ $NaHCO_3$ 2.2 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรจนครบ 500 มิลลิลิตร

1.2 Salt Mixture ประกอบด้วย

- KCl 0.4 กรัม
- $MgCl_2.6H_2O$ 3.3 กรัม
- $MgSO_4.7H_2O$ 3.0 กรัม
- $NaH_2PO_4.2H_2O$ 0.05 กรัม

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

1.3 NaCl

ละลาย NaCl 11 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

1.4 $CaCl_2.H_2O$

ละลาย $CaCl_2.H_2O$ 0.9 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

1.5 L-glutamin

ละลาย L-glutamin 0.015 กรัม ในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร แล้วกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 μm

2. การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ K-199 ปริมาณ100 มิลลิลิตร

2.1 ผสมสารละลายตามลำดับ ดังนี้

-	M-199	50	มิลลิลิตร
-	Salt Mixture	10	มิลลิลิตร
-	NaCl	10	มิลลิลิตร
-	$CaCl_2.H_2O$	10	มิลลิลิตร
-	L-glutamin	1	มิลลิลิตร
-	Hepes	0.238	กรัม

ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

2.2 ปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 7.3-7.6 ด้วย HCl หรือ NaOH

3. การเตรียมสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด

เติม Tri-Sodium Citrate Dihydrate ($C_6H_5Na_3.2H_2O$) คิดเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ของอาหารเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือด K-199

สารเคมีในการวิเคราะห์ Phenoloxidase activity

1. สารละลาย cacodylate buffer pH 7.4

ผสมสารละลาย 0.2 M sodium cacodylate ปริมาณ 50 มิลลิลิตร สารละลาย 0.2 M HCl ปริมาณ 2.7 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่น 47.3 มิลลิลิตร

2. L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA)

ละลาย L-dihydroxyphenylalanine 4 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร

3. สารละลายทริปซิน

เตรียมจาก 0.1% ทริปซินใน cacodylate buffer

สารเคมีในการวิเคราะห์โปรตีน

1. reagent a

เตรียมจาก 2 % Weight/Volumn Na_2CO_3 ละลายใน 0.1 M NaOH

2. reagent b

เตรียมจาก 0.5% $CuSO_4$ ละลายใน 1% Dipotassium tatrate

3. reagent c

เตรียมจาก reagent a 50 มิลลิลิตร รวมกับ reagent b 1 มิลลิลิตร

4. reagent d

เตรียมจาก Folin 1 ส่วน ผสมกับน้ำกลั่น 2 ส่วน

สารเคมีในการวิเคราะห์ Phagocytic Activity

1. สารละลาย Shrimp Saline

- NaCl 28.4 กรัม
- $MgCl_2.6H_2O$ 10.0 กรัม
- $MgSO_4.7H_2O$ 2.0 กรัม
- $CaCl_2.H_2O$ 2.25 กรัม
- KCl 0.7 กรัม
- Glucose 1.0 กรัม

- Hepes 2.38 กรัม

ผสมในน้ำกลั่น 1 ลิตร กรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.22 μm ใส่ในขวดที่ผ่านการเชื้อแล้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส

2. Heat-Killed Yeast

2.1 นำ Baker's Yeast 0.5 กรัม มาละลายใน 0.9% NaCl 250 มิลลิลิตรแล้วต้มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

2.2 หลังจากนั้นทำการปั่นล้างด้วย Shrimp Saline ที่ 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที 5 ครั้ง

2.3 นำเซลล์ยีสต์ที่ได้มาปรับปริมาณเซลล์ด้วย Shrimp Saline ให้ได้ปริมาณเซลล์จำนวน $5x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร

การคำนวณปริมาณเม็ดเลือด (Total Hemocyte count)

นับช่องตารางบนผิว Hemacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า

ปริมาตรของ Hemacytometer = กว้าง x ยาว x สูง

ปริมาตรของ Hemacytometer = 1 มิลลิเมตร x 1 มิลลิเมตร x 0.1 มิลลิเมตร

= 0.1 เซนติเมตร x 0.1 เซนติเมตร x 0.01 เซนติเมตร

= 0.0001 ลูกบาศก์เซนติเมตร = 0.0001 มิลลิลิตร

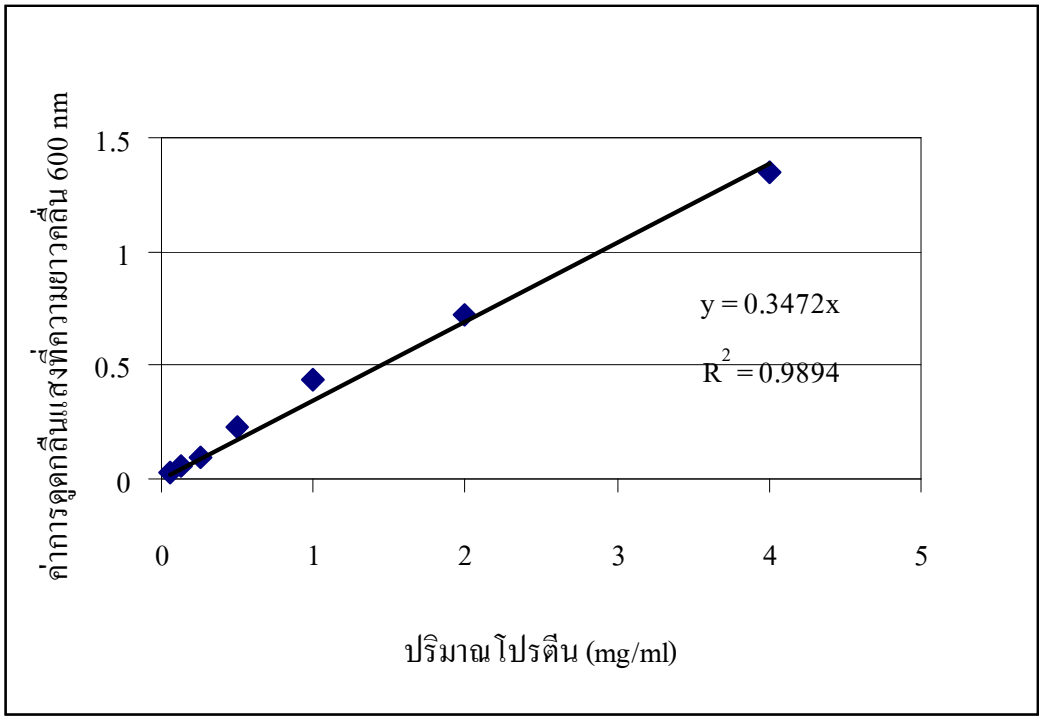
= 10^{-4} มิลลิลิตร

จำนวนเซลล์เม็ดเลือด / มิลลิลิตร = (ค่าเฉลี่ย) เซลล์เม็ดเลือดที่นับได้ x 10^4 x ค่า dilution

การคำนวณหน่วยของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส

phenoloxidase activity = unit/min/ mg Protein

กำหนดให้ ค่าดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลง 0.001 = 1 unit



ภาพผนวกที่ 2 กราฟมาตรฐานโปรตีน (Bovine Serum Albumin) โดยวิธี Lowry (1951)

การคำนวณ Percent Phagocytosis

$$\text{Percent Phagocytosis} = \frac{\text{จำนวนเม็ดเลือดที่จับกินยีสต์}}{\text{จำนวนเม็ดเลือดทั้งหมด}} \times 100$$

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวมินตรา ศีลอุดม
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 19 มีนาคม 2527
สถานที่เกิด	จ. ฉะเชิงเทรา
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.) ประมง (เกียรตินิยมอันดับหนึ่ง) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-