ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพ | เทคโนโลยีชีวภาพ

สาขา | **ภาควิชา**

เรื่อง การใช้จุลินทรีย์ *Lactobacillus plantarum* LP64 เป็นโปรไบโอติกในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*)

Application of *Lactobacillus plantarum* LP64 as Probiotics for Immunostimulation in Giant Freshwater Prawn (*Macrobrachium rosenbergii*)

นามผู้วิจัย นางสาวชมพูนุท แก้วใจรักษ์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

(รองศาสตราจารย์มังกร โรจน์ประภากร, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

(รองศาสตราจารย์อรพินท์ จินตสถาพร, วท.ด.)

หัวหน้าภาควิชา .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

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

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การใช้จุลินทรีย์ *Lactobacillus plantarum* LP64 เป็นโปรไบโอติกในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*)

Application of *Lactobacillus plantarum* LP64 as Probiotics for Immunostimulation in Giant Freshwater Prawn (*Macrobrachium rosenbergii*)

โดย

นางสาวชมพูนุท แก้วใจรักษ์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
พ.ศ. 2554

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ชมพูนุท แก้วใจรักษ์ 2554: การใช้จุลินทรีย์ *Lactobacillus plantarum* LP64 เป็นโปรไบโอติกในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์มังกร โรจน์ประภากร, Ph.D. 90 หน้า

ศึกษาการใช้จุลินทรีย์ *Lactobacillus plantarum* LP64 เป็นโปรไบโอติกสำหรับกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) โดยการศึกษาการรอดชีวิต (viability) ของเชื้อสายพันธุ์นี้ พบว่า ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เชื้อสดสามารถเก็บไว้ได้นาน 30 วัน ขณะที่เชื้อสดผสมอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปสามารถเก็บได้เพียง 3 วัน ผลของการใช้จุลินทรีย์ *L. plantarum* LP64 เป็นโปรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามต่อการเจริญเติบโตและการรอดชีวิต นาน 60 วัน พบว่า อัตราการเจริญเติบโตและอัตรารอดชีวิตของกุ้งระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มเสริมโปรไบโอติกไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) อย่างไรก็ตาม อัตราการเจริญเติบโตและอัตรารอดชีวิตของกุ้งที่ได้รับโปรไบโอติกมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งที่อัตราส่วน 1:3 ปริมาตรต่อน้ำหนักซึ่งแสดงค่าสูงสุด การศึกษาอัตราส่วนและการเสริม (ระยะเวลาและแบบแผนการให้) โปรไบโอติกที่เหมาะสมสำหรับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งนาน 60 วัน พบว่า ปริมาณเม็ดเลือดรวม กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส กิจกรรมของเม็ดเลือดในการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม และกิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดของกุ้งทุกกลุ่มการทดลองแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งกุ้งที่ได้รับอาหารเสริมโปรไบโอติกอัตราส่วน 1.5:3 (ปริมาตร/น้ำหนักอาหาร) ทุกวัน มีระดับภูมิคุ้มกันสูงกว่ากุ้งกลุ่มการทดลองอื่นๆ และกลุ่มควบคุม ยิ่งกว่านั้น ปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกภายในลำไส้กุ้งก้ามกรามของกลุ่มการทดลองนี้ก็สูงกว่ากลุ่มการทดลองอื่นๆและกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$)

_____ _____ ___ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Chompunut Kaewjairak 2011: Application of *Lactobacillus plantarum* LP64 as Probiotics for Immunostimulation in Giant Freshwater Prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). Master of Science (Biotechnology), Major Field: Biotechnology, Department of Biotechnology. Thesis Advisor: Associate Professor Mangkorn Rodprapakorn, Ph.D. 90 pages.

Application of *Lactobacillus plantarum* LP64 as probiotics for giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) was investigated. The viability study at 4°C showed this strain could alive for 30 days while cells which were mixed into commercial feed for giant freshwater prawn alived only 3 days. Effect of feeding *L. plantarum* LP64 as probiotics on growth and survival during the 60 days of feeding experiment was studied. The result showed that growth rate and survival rate of prawns between control and probiotics-supplemented feed treatments were not significantly different ($p>0.05$). However, growth rate and survival rate of prawns supplemented with probiotics showed tendency to increase especially at ratio 1:3 (v/w) which showed the highest result. The optimum probiotics ratio and supplement (period and pattern) for immunostimulation of prawn during the 60 days of feeding experiment were also investigated. There were significantly different in the total hematocyte count, phenoloxidase activity, phagocytic activity and antibactericidal activity among all treatments. It was found that prawns which were fed with probiotics-supplemented feed at ratio 1.5:3 (v/w) everyday have higher immune levels than prawns of other treatments and control. Moreover, the number of lactic acid bacteria in intestine of prawns of this treatment was also significantly higher than another treatments and control ($p<0.01$).

_____ _____ ___ / ___ / ___

Student's signature Thesis Advisor's signature

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สามารถสำเร็จลุล่วง ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.มังกร โรจน์ประภากร ประธานกรรมการที่ปรึกษา และรศ.ดร.อรพินท์ จินตสถาพร กรรมการ เป็นอย่างยิ่งที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำการทำวิทยานิพนธ์ตั้งแต่เริ่มต้น การวางแผนการวิจัยจนถึงการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้เสร็จสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร และภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สำหรับห้องปฏิบัติการและสถานที่ในการทำการวิจัยในครั้งนี้

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ครอบครัว ตลอดจนพี่ๆและเพื่อนๆ ที่ช่วยเหลือ แนะนำ และให้กำลังใจเป็นอย่างดีจนวิทยานิพนธ์เรื่องนี้เสร็จสมบูรณ์ ขอระลึกถึงพระคุณของคุณครูและอาจารย์ที่อบรม สั่งสอน และประสิทธิประสาทวิชาความรู้ ตั้งแต่เยาว์วัยจนถึงปัจจุบัน

ชมพูนุท แก้วใจรักษ์

สิงหาคม 2554

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	33
อุปกรณ์	33
วิธีการ	37
ผลและวิจารณ์	46
สรุปและข้อเสนอแนะ	67
สรุป	67
ข้อเสนอแนะ	68
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	69
ภาคผนวก	82
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	90

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	วิวัฒนาการของลูกกุ้งวัยอ่อนตามวิธีของ Uno and Soo (1969)	8
2	หน้าที่ของเม็ดเลือดกุ้งแต่ละชนิด	16
3	ค่าปกติทางชีวเคมีของเลือดกุ้ง	22
4	โปรไบโอติกชนิดต่างๆ	24
5	โปรไบโอติกที่มีการใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้ง	26
6	การรอดชีวิต (viability) ของ *Lactobacillus plantarum* LP64 ในรูปของเชื้อสดเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ 37 องศาเซลเซียส (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)	47
7	การรอดชีวิต (viability) ของ *Lactobacillus plantarum* LP64 ในรูปอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติกเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)	49
8	สมรรถภาพการผลิตของกุ้งก้ามกรามที่ได้รับด้วยอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติกที่อัตราส่วนต่างๆกันเป็นระยะเวลา 60 วัน (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)	51
9	ปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำ แอมโมเนีย ไนไตรท์ ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำและอุณหภูมิเฉลี่ยตลอดระยะเวลาการเลี้ยง 60 วัน (ค่าต่ำสุด - ค่าสูงสุด)	54
10	ปริมาณปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมดในน้ำเฉลี่ยตลอดระยะเวลาการเลี้ยง 60 วัน (ค่าต่ำสุด - ค่าสูงสุด)	55
11	ปริมาณเม็ดเลือดรวม (1×10^5 เซลล์/มล.) ของกุ้งก้ามกรามที่ได้รับอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติกที่อัตราส่วนต่างๆกันเป็นระยะเวลา 60 วัน	56
12	ปริมาณเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (unit/min/mg protein) ในเลือดกุ้งก้ามกรามที่ได้รับอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติกที่อัตราส่วนต่างๆกันเป็นระยะเวลา 60 วัน	58
13	กิจกรรมของเม็ดเลือดในการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม (% Phagocytosis) ของกุ้งก้ามกรามที่ได้รับอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติกที่อัตราส่วนต่างๆกันเป็นระยะเวลา 60 วัน	60
14	กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของเลือดกุ้งก้ามกรามที่ได้รับอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติกที่อัตราส่วนต่างๆกันเป็นระยะเวลา 60 วัน	62

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

15 Total Lactic Acid Bacteria (CFU/g) ของลำไส้กุ้งก้ามกรามที่ได้รับอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติกที่อัตราส่วนต่างๆกันเป็นระยะเวลา 60 วัน 64

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะทั่วไปของกุ้งก้ามกราม	5
2	ลักษณะเพศของกุ้งก้ามกราม	6
3	วิวัฒนาการของลูกกุ้งวัยอ่อน	9
4	เซลล์เม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำ H = hyalin cell, S = semigranular cell, L = large granular cell เมื่อย้อมด้วย Giemsa's stained	16
5	Phenoloxidase system	21
6	ความสัมพันธ์ระหว่างกุ้งกุลาดำ สิ่งแวดล้อมในบ่อเลี้ยงกุ้ง และเชื้อโรครวมทั้งวิธีการที่ใช้ในการจัดการของแต่ละปัจจัย	23
7	เปรียบเทียบการรอดชีวิต (viability) ของ *Lactobacillus plantarum* LP64 ในรูปของเชื้อสด เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ 37 องศาเซลเซียส	48
8	การรอดชีวิต (viability) ของ *Lactobacillus plantarum* LP64 ในรูปอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติกที่อัตราส่วนต่างๆกัน เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	50
9	ปริมาณเม็ดเลือดรวม (1×10^5 เซลล์/มล.) ของกุ้งก้ามกรามที่ได้รับอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติกที่อัตราส่วนต่างๆกันเป็นระยะเวลา 60 วัน	57
10	ปริมาณเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (unit/min/mg protein) ในเลือดกุ้งก้ามกรามที่ได้รับอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติกที่อัตราส่วนต่างๆกันเป็นระยะเวลา 60 วัน	59
11	กิจกรรมของเม็ดเลือดในการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม (%phagocytosis) ของกุ้งก้ามกรามที่ได้รับอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติกที่อัตราส่วนต่างๆกันเป็นระยะเวลา 60 วัน	61
12	Total Lactic Acid Bacteria (CFU/g) ของลำไส้กุ้งก้ามกรามที่ได้รับอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติกที่อัตราส่วนต่างๆกันเป็นระยะเวลา 60 วัน	65
13	ลำไส้ของกุ้งก้ามกรามกลุ่มควบคุมที่ได้รับอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปเป็นระยะเวลา 60 วัน ที่ส่องภายใต้กล้อง Scanning Electron Microscope (SEM) กำลังขยาย 10,000 เท่า	66

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

14 ลำไส้ของกุ้งก้ามกรามที่ได้รับอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติกที่อัตราส่วน 1.5:3 (ปริมาตร/น้ำหนักอาหาร) เป็นระยะเวลา 60 วัน ที่ส่องภายใต้กล้อง Scanning Electron Microscope (SEM) 10,000 เท่า 66

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การใช้จุลินทรีย์ *Lactobacillus plantarum* LP64 เป็นโปรไบโอติกในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*)

Application of *Lactobacillus plantarum* LP64 as Probiotics for Immunostimulation in Giant Freshwater Prawn (*Macrobrachium rosenbergii*)

คำนำ

กุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) เป็นกุ้งน้ำจืดที่นิยมบริโภคของชาวไทยและมีราคาสูงเมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์น้ำชนิดอื่นๆ ในการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามระยะแรกนั้นพบปัญหาหลัก คือ การขาดแคลนพันธุ์กุ้งเนื่องจากยังผลิตได้น้อย ทำให้ราคาค่อนข้างแพง แต่ในปัจจุบันกรมประมงได้ค้นคว้าและพัฒนารูปแบบการเลี้ยงที่เหมาะสม ทำให้มีโรงเพาะกุ้งก้ามกรามมากเพียงพอที่จะผลิตพันธุ์กุ้งเพื่อตอบสนองความต้องการของผู้เลี้ยง ซึ่งผู้เลี้ยงจะต้องปรับปรุงวิธีการเลี้ยงเพื่อลดต้นทุนและเพิ่มผลผลิตเพื่อให้ได้กำไรมากขึ้น การเลี้ยงกุ้งก้ามกรามนั้นจะต้องอาศัยความสนใจเอาใจใส่และดูแลอย่างมาก การปล่อยกุ้งในอัตราความหนาแน่นสูงจะทำให้กุ้งกินกันเอง และมีของเสียจากการขับถ่ายในบ่อเลี้ยงเป็นปริมาณมาก ทำให้คุณภาพน้ำเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้กุ้งเกิดความเครียดและมีภูมิคุ้มกันลดลง ทำให้เชื้อโรคเข้าทำอันตรายต่อกุ้ง นอกจากนั้นหากมีอาหารตกค้างในบ่อมากจะทำให้เกิดการสะสมของสารอินทรีย์ที่พื้นบ่อ ทำให้เชื้อโรคเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วซึ่งเป็นปัจจัยเสริมให้กุ้งมีภูมิคุ้มกันต่ำลง ทำให้เป็นโรคได้ง่ายขึ้น เมื่อเกิดโรคในกุ้งมักมีการใช้สารปฏิชีวนะเพื่อรักษาโรค หากมีการใช้อย่างต่อเนื่องนานนานจะทำให้เชื้อก่อโรคเกิดการดื้อยา ทำให้ใช้สารปฏิชีวนะในปริมาณเท่าเดิมไม่ได้ผลเท่าที่ควรจึงต้องมีการเพิ่มปริมาณขึ้นเรื่อยๆ นอกจากนี้ยังทำให้เกิดปัญหาการตกค้างของยาปฏิชีวนะในเนื้อกุ้งส่งออก ซึ่งปัจจุบันประเทศคู่ค้าได้เพิ่มความเข้มงวดในการตรวจสอบ และพัฒนาวิธีการตรวจสอบให้ทันสมัยสามารถตรวจสอบสารตกค้างได้แม้พบในปริมาณน้อย

จากสาเหตุดังกล่าวประเทศคู่ค้าสินค้าเกษตรของไทยได้มีการตกลงข้อกำหนดการใช้สารปฏิชีวนะและสารเคมีเพื่อลดการตกค้างในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ การใช้สารเสริมชีวภาพจึงเป็นแนวทางหนึ่งในการเพิ่มการย่อยได้และผลผลิต กระตุ้นภูมิคุ้มกัน ทำให้สัตว์แข็งแรง ลดสารตกค้างในเนื้อและการดื้อยาของเชื้อโรค โปรไบโอติกจึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่กำลังได้รับความสนใจ โดยกลุ่มจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เช่น *Lactobacillus* spp., *Bacillus*

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

spp. และ *Pseudomonas fluorescens* (Smith and Davey, 1993; Byun *et al*., 1997; Moriaty, 1998; Verschuere *et al*., 2000) โดยปรับสมดุลของจุลินทรีย์ประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหารและลดปริมาณเชื้อก่อโรค เพิ่มอัตราการรอดชีวิตและกระตุ้นการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ประจำถิ่น โปรไบโอติกนั้นต้องมีการคัดเลือกคุณสมบัติของการเป็นโปรไบโอติกและความจำเพาะเจาะจงต่อสัตว์ที่นำไปใช้ โดยต้องเป็นเซลล์ที่มีชีวิตและมีปริมาณเพียงพอไปจนถึงระบบทางเดินอาหาร ทนต่อสภาพกรดและน้ำดีในระบบทางเดินอาหาร และถูกเมทาบอไลซ์ในลำไส้ได้ ไม่ถูกดูดซึมในระบบทางเดินอาหาร และไม่ทำให้เกิดการแพ้ ทำให้สัตว์เจริญเติบโตและมีภูมิต้านทานต่อโรคดีขึ้น ไม่ทำให้เกิดโรคหรือเป็นพิษต่อสัตว์ ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำโดยเฉพาะกุ้งได้มีการใช้โปรไบโอติกกันอย่างแพร่หลาย แต่ขาดการศึกษาในวิชาการเชิงประยุกต์ใช้ ดังนั้นจึงศึกษาการใช้ *Lactobacillus plantarum* LP64 เป็นโปรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาอัตราส่วนและระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งก้ามกราม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการรอดชีวิต (viability) ของโปรไบโอติกในรูปของเชื้อสดและอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติก

2. เพื่อศึกษาอัตราส่วนของโปรไบโอติกที่เหมาะสมต่อการเพิ่มการเจริญเติบโต และการรอดชีวิตของกุ้งก้ามกราม

3. เพื่อศึกษาอัตราส่วนและระยะเวลาการให้โปรไบโอติกที่เหมาะสมในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งก้ามกราม

4. เพื่อศึกษาผลของโปรไบโอติกต่อปริมาณ *Vibrio* spp. และ Total Lactic Acid Bacteria ในทางเดินอาหารของกุ้งก้ามกราม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจเอกสาร

1. กุ้งก้ามกราม

1.1 อนุกรมวิธานของกุ้งก้ามกราม

กุ้งก้ามกรามมีชื่อสามัญที่แตกต่างกันออกไปในแต่ละท้องถิ่น เช่น กุ้งก้ามกราม กุ้งนาง กุ้งหลวง กุ้งก้ามเกลี้ยง กุ้งแห กุ้งใหญ่ แม่กุ้ง เป็นต้น มีชื่อภาษาอังกฤษว่า Giant Freshwater Prawn และมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Macrobrachium rosenbergii*

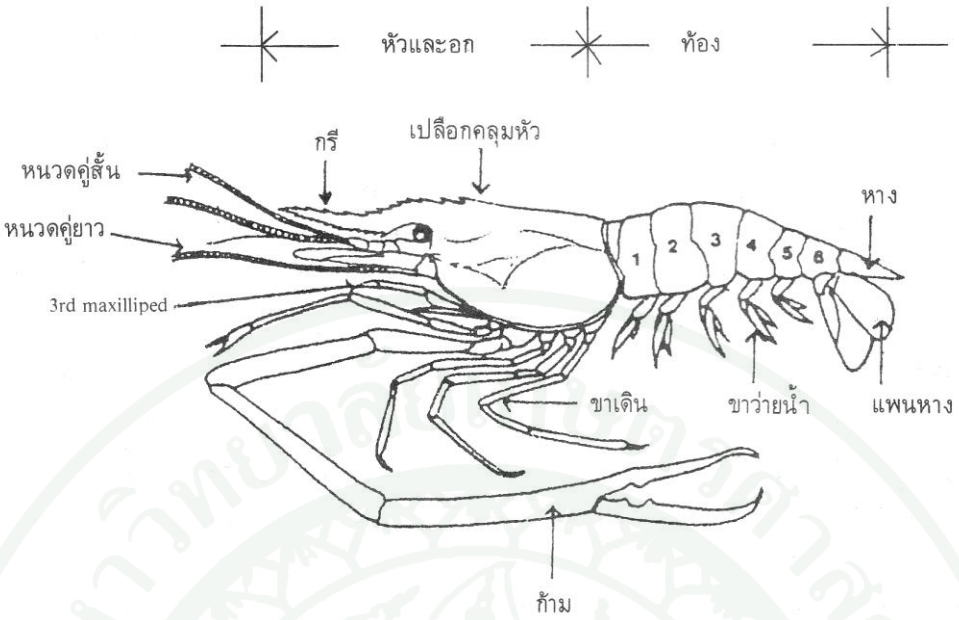
Phylum Arthropoda
Class Crustacea
Order Decapoda
Suborder Natantia
Family Palemonidae
Genus *Macrobrachium*
Species *rosenbergii*

1.2 ลักษณะทั่วไป

กุ้งก้ามกรามนั้นเป็นกุ้งน้ำจืดที่มีขนาดใหญ่ที่สุด มีเปลือกคลุมลำตัว ลำตัวแบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ หัว อก และท้อง ส่วนหัวและอกรวมเป็นปล้องเดียวกัน ทางส่วนหน้ามีหนาม 2 อัน (hepatic spine และ anternal spine) ข้างแก้มมีร่องเห็นได้ชัดเจน กรีมีลักษณะแบนข้างยาวเรียว โคนกรีหนาและนูน ตรงกลางโค้งแอ่นลงปลายโค้งขึ้น มีหยักคล้ายฟันเลื่อย สันกรีล่างมีหยักประมาณ 8-14 หยัก สันกรีบนมีหยักประมาณ 12-15 หยัก ตามีก้านยาวยื่นออกนอกเบ้าตา เคลื่อนไหวไปมาได้ (กลุ่มบัณฑิตเกษตรอาสา สาขาประมง, 2539)

ส่วนหัวและอกมีขาเดิน 5 คู่ ขาเดินคู่ที่ 1 และ 2 มีลักษณะเป็นก้าม มีสีคราม ขาเดินคู่ที่ 1 ใช้ในการหาอาหารและทำความสะอาดร่างกาย คู่ที่ 2 มีขนาดใหญ่กว่าคู่ที่ 1 โดยใช้ในการต่อสู้และจับเหยื่อ มีหนวด 2 คู่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



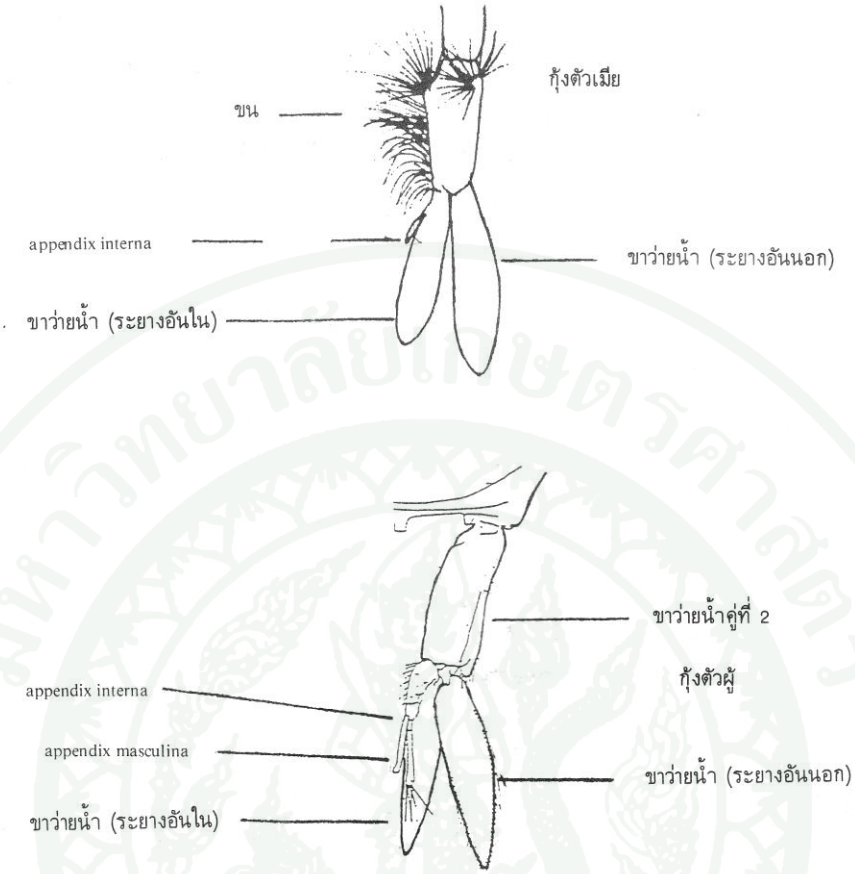
ภาพที่ 1 ลักษณะทั่วไปของกุ้งก้ามกราม

ที่มา: ยนต์ (2529)

ส่วนท้องมีปล้อง 5 ปล้อง มีขาว่ายน้ำจำนวน 5 คู่ ช่องปล่อยน้ำเชื้อของเพศผู้อยู่บริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 5 ส่วนเพศเมียมีช่องปล่อยไข่บริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 3 ในเพศผู้ปลายขาว่ายน้ำคู่ที่ 2 จะแยกเป็น 4 แขนง แต่ในเพศเมียจะแยกเป็น 3 แขนง ส่วนหางประกอบด้วยแพนหางข้างละ 1 คู่ ส่วนกลางเป็นหางแหลม ปลายหางมีหนาม 4 คู่ ปลายหางยาวจรดด้านข้างของแพนหาง (ชูศักดิ์, 2532)

กุ้งก้ามกรามเพศผู้และเพศเมียมีลักษณะแตกต่างกันที่สังเกตได้ดังนี้ ในกุ้งขนาดโตเต็มวัยเพศผู้จะมีขนาดใหญ่กว่าเพศเมีย โดยเฉพาะส่วนหัวและขาเดินคู่ที่ 2 ของเพศผู้จะใหญ่กว่าเพศเมียอย่างชัดเจน ถ้ากุ้งยังมีขนาดเล็กสังเกตได้จากขาว่ายน้ำคู่ที่ 2 โดยเพศผู้จะมีรยางค์เพศผู้อยู่คู่กับรยางค์อันใน ส่วนขาว่ายน้ำของกุ้งเพศเมียจะมีรยางค์ในอย่างเดียว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 2 ลักษณะเพศของกุ้งก้ามกราม

ที่มา: ยนต์ (2529)

1.3 ถิ่นที่อยู่และการแพร่กระจายของกุ้งก้ามกราม

กุ้งก้ามกรามมีการแพร่กระจายอยู่ทั่วไปในเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น เมียนมาร์ ไทย ลาว เวียดนาม เขมร อินโดนีเซีย และฟิลิปปินส์ ส่วนมากจะอาศัยในแหล่งน้ำจืดที่มีทางน้ำติดต่อกับทะเล สามารถดำรงชีวิตได้ทั้งน้ำจืดและน้ำกร่อยคือ ในระยะตัวอ่อนจะอยู่ในน้ำกร่อย ระยะหนึ่งจึงย้ายไปอาศัยในน้ำจืดจนเจริญเป็นตัวเต็มวัย สำหรับในประเทศไทยกุ้งก้ามกรามนั้นพบได้เกือบทุกภาค ส่วนมากจะอยู่ในแม่น้ำ ลำคลอง หนอง บึง ทะเลสาบ ภาคกลางพบกุ้งก้ามกรามชุกชุมในลุ่มแม่น้ำเจ้าพระยา แม่น้ำท่าจีน และแม่น้ำบางปะกง ในเขตจังหวัดอยุธยา ชัยนาท ปทุมธานี นนทบุรี สมุทรสงคราม สมุทรปราการ ราชบุรี สุพรรณบุรี เป็นต้น ภาคใต้พบกุ้งก้ามกรามชุกชุมในเขตจังหวัดสุราษฎร์ธานี ชุมพร นครศรีธรรมราช พัทลุง และสงขลา (บรรจง, 2535)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.4 วงจรชีวิตและการสืบพันธุ์

กุ้งก้ามกรามผสมพันธุ์วางไข่ได้ตลอดปีหากน้ำมีอุณหภูมิสูงกว่า 21 องศาเซลเซียส โดยวางไข่ได้ปีละ 4 - 5 ครั้ง เมื่อถึงฤดูผสมพันธุ์ แม่กุ้งที่ผสมพันธุ์แล้วจะเดินทางมาสู่บริเวณปากแม่น้ำหรือบริเวณน้ำกร่อย หลังจากวางไข่แล้ว ลูกกุ้งจะล่องลอยไปตามกระแสน้ำและใช้เวลา 15-40 วัน จนวิวัฒนาการเป็นกุ้งโตเต็มวัย (postlarvae) แล้วจึงอพยพเข้าไปเจริญเติบโตในน้ำจืด จนมีอายุประมาณ 5 เดือน จึงพร้อมจะผสมพันธุ์วางไข่ได้

การผสมพันธุ์วางไข่เกิดขึ้นเมื่อตัวเมียลอกคราบเสร็จใหม่ๆและเปลือกยังอ่อนอยู่ ตัวเมียจะรับน้ำเชื้อจากตัวผู้ซึ่งมีลักษณะเป็นสารเหนียวสีขาวติดอยู่ที่หน้าอกระหว่างขาเดินของตัวเมีย หลังจากนั้น 2-3 ชั่วโมง ไข่จะเคลื่อนออกมาผสมกับน้ำเชื้อแล้วถูกเก็บไว้บริเวณส่วนท้องระหว่างขาว่ายน้ำ แม่กุ้งจะใช้ขาว่ายน้ำโบกพัดให้น้ำไหลผ่านเพื่อให้ออกซิเจนแก่ไข่ ไข่ที่ออกมาใหม่จะมีสีเหลืองอมส้มขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6-0.8 มิลลิเมตร และจะมีวิวัฒนาการจนกระทั่งเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหรือสีเทา ซึ่งพร้อมจะฟักเป็นตัวภายใน 2-3 วัน โดยระยะเวลาที่ไข่ติดอยู่ที่ท้องจนฟักเป็นตัวประมาณ 17-21 วัน วิวัฒนาการของลูกกุ้งวัยอ่อนดังแสดงในตารางที่ 1

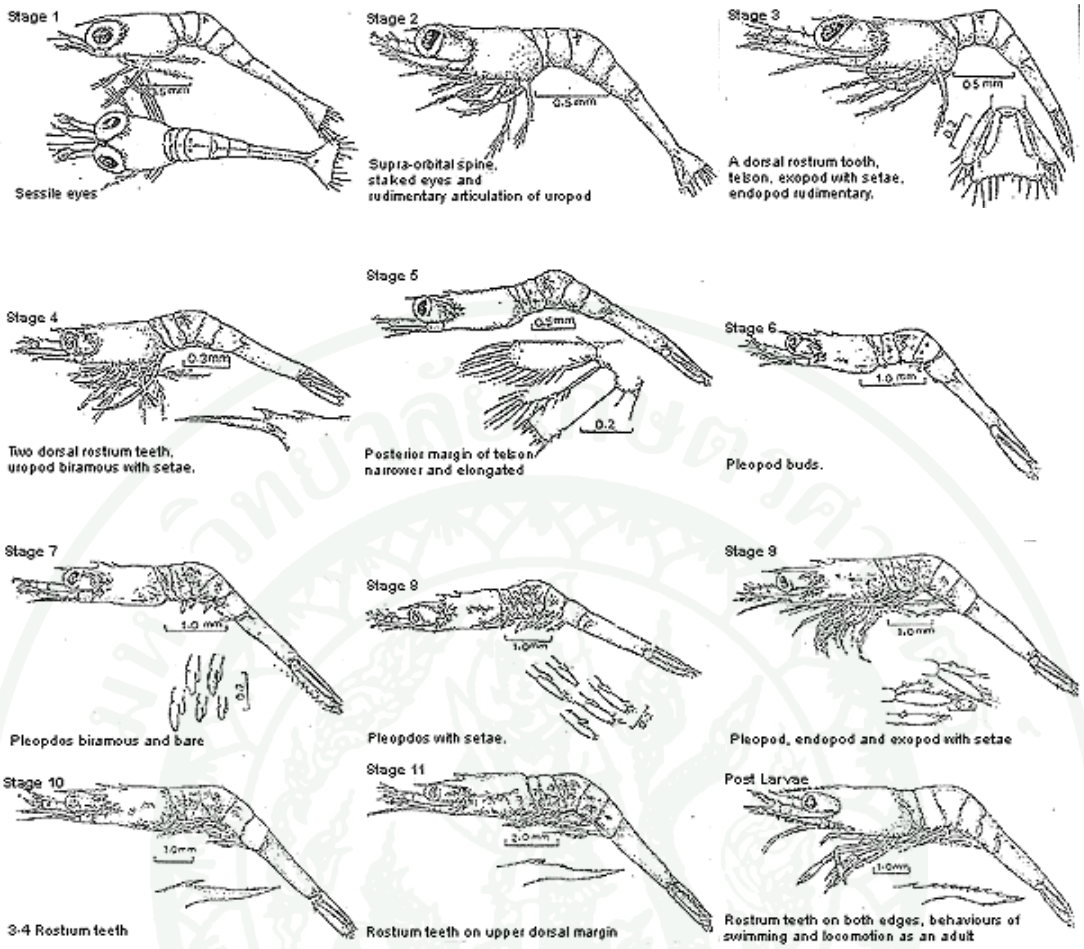
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 1 วิวัฒนาการของลูกกุ้งวัยอ่อนตามวิธีของ Uno and Soo (1969)

ระยะที่	ลักษณะ
1	ไม่มีก้านตา
2	มีก้านตา
3	ปลายหางแผ่กว้าง
4	กรีด้านบนมีฟัน 2 ซี่
5	ปลายหางแคบเรียวเข้า
6	ขาว่ายน้ำงอกเป็นปุ่ม
7	ปลายขาว่ายน้ำเป็น 2 แฉก ไม่มีขน
8	แขนงนอกของขาว่ายน้ำมีขน
9	ปลายขาว่ายน้ำทั้ง 2 แขนง มีขน
10	ปลายกรีด้านบนมีฟัน 3-4 ซี่
11	กรีด้านบนมีฟันหลายซี่
12 (กุ้งคว่ำ)	กรีมีฟันทั้งด้านบนและด้านล่าง

ที่มา: Uno and Soo (1969)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 3 วิวัฒนาการของลูกกุ้งวัยอ่อน

ที่มา: Uno and Soo (1969)

1.5 อาหารและการกินอาหารของกุ้งก้ามกราม

กุ้งก้ามกรามจะหากินอยู่หน้าดินบริเวณที่มีน้ำไหลและสะอาด มีความไวต่อแสง ว่องไว หลบหลีกศัตรูได้คล่องแคล่ว โดยปกติกุ้งก้ามกรามจะหากินในเวลากลางคืน ส่วนเวลากลางวันจะซ่อนตัว กุ้งก้ามกรามสามารถกินอาหารได้ทั้งพืชและสัตว์ ซากพืช ซากสัตว์ เช่น ปลา เนื้อปลา หอย พันธุ์ไม้น้ำ หนอน ตัวอ่อนของแมลง เมล็ดข้าว ถั่ว เป็นต้น และกุ้งก้ามกรามยังกินกันเองโดยเฉพาะในระยะที่กำลังลอกคราบ กุ้งตัวที่อ่อนแอกว่าจะถูกทำร้ายและเป็นอาหารของตัวที่แข็งแรงกว่า (ยนต์, 2529)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ดังนั้นอาหารที่ใช้เลี้ยงกุ้งก้ามกรามหากให้เป็นอาหารสดควรเป็นเนื้อปลาสด เนื้อหอย หรือบดผสมแล้วอัดเม็ดตากแห้ง และกุ้งเป็นสัตว์ที่กินอาหารได้ช้าอาหารผสมจึงควรจะคงรูปและจมในน้ำได้นานไม่ต่ำกว่า 3 ชั่วโมง ส่วนผสมของอาหารควรมีโปรตีนร้อยละ 20-30 ปัจจุบันมีอาหารกุ้งสำเร็จรูปในรูปอาหารเม็ดซึ่งสะดวกและครบคุณค่าทางโภชนะยิ่งขึ้น อาหารกุ้งควรเป็นอาหารชนิดเม็ดจมแท่งสั้นๆเพื่อความสะดวกในการกัดกินและคงสภาพในน้ำได้นานโดยไม่ละลายน้ำ ขนาดของอาหารควรมีขนาดที่เหมาะสมกับอายุของกุ้ง ควรมีลักษณะเป็นเกล็ดสำหรับกุ้งขนาดเล็กและเพิ่มขนาดของเม็ดอาหารตามขนาดของกุ้งที่เพิ่มขึ้น การให้อาหารควรโปรยให้โดยรอบเพื่อให้อาหารกระจายทั่วบ่อและกุ้งกินอาหารได้ทั่วถึง เนื่องจากกุ้งมีนิสัยหวงอาณาเขต อาจทำให้กุ้งที่มีขนาดเล็กไม่สามารถแย่งกินอาหารได้ เวลาในการให้อาหารกุ้งก้ามกรามควรให้ในปริมาณน้อยแต่บ่อยครั้ง อย่างน้อยวันละ 2-4 ครั้ง ในฤดูฝนหรืออากาศเปลี่ยนแปลงมากไม่ควรให้อาหารกุ้งหรืออาจให้ในปริมาณเพียงเล็กน้อย การพิจารณาให้อาหารกุ้งมีหลักในการพิจารณาดังนี้ ถ้าเป็นกุ้งที่มีขนาดเล็กต่ำกว่า 100 ตัวต่อกิโลกรัม ปริมาณอาหารที่ให้ร้อยละ 10-12 ของน้ำหนักกุ้ง ถ้าเป็นกุ้งที่มีขนาด 50-80 ตัวต่อกิโลกรัม ปริมาณอาหารที่ให้ร้อยละ 5-8 ของน้ำหนักกุ้ง ถ้าเป็นกุ้งที่มีขนาดใหญ่กว่านี้ให้อาหารในปริมาณ ร้อยละ 10-12 ของน้ำหนักกุ้ง (บรรจง, 2535)

1.6 โรคและปรสิตที่พบในกุ้งก้ามกราม

1.6.1 โรคเหงือกดำ หรือโรคแก้มดำ

พบได้บ่อยในบ่อเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย โดยเกิดจากแบคทีเรียพวก *Aeromonas*, *Hydrophilla* และ *Flavobacterium* จับที่เหงือก มองเห็นเป็นสีดำ ทำให้กุ้งหายใจไม่สะดวก หรืออาจเกิดจากพื้นบ่อมีการสะสมของเสียที่เป็นสารประกอบไนโตรเจนสูง น้ำมีออกซิเจนต่ำ ลักษณะอาการที่พบ บริเวณช่องเหงือกจะมีสีดำ ซึ่งอาจพบทั้งเหงือกหรือฝาปิดเหงือก ด้านใน วิธีการป้องกันและแก้ไขคือ เปลี่ยนถ่ายน้ำและย้ายกุ้งออกไปเลี้ยงในบ่อใหม่ เพื่อให้กุ้งลอกคราบแบคทีเรียที่จับอยู่ก็จะหลุดไปหรืออาจใช้ยาปฏิชีวนะ เช่น เตตราซัยคลิน คลอเตตราซัยคลิน หรือคลอแรมฟีนิคอล ในอัตรา 2.5-3.0 กรัมผสมอาหาร 1 กิโลกรัม ให้กุ้งกิน 5-7 วัน พร้อมกับการถ่ายน้ำ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.6.2 โรคเปลือกเน่า

เกิดจากแบคทีเรียทำให้ขอบหรือปลายเหงือกมีสีดำและขาดหายไป ถ้าเกิดที่ปลายขา จะทำให้ขาขาด ขากุด โรคนี้จะค่อยๆลามไป ทำให้กุ้งเกิดการระคายเคือง ไม่กินอาหารและตายในที่สุด

1.6.3 โรคที่เกิดจากแบคทีเรียเส้นใย

ลักษณะอาการนั้นจะพบแบคทีเรียเป็นเส้นบนผิวที่ส่วนต่างๆของลำตัว เหงือก ขา ว่ายน้ำ และแพนหาง จะพบมากในบ่อที่มีการเลี้ยงกุ้งอย่างหนาแน่น ทำให้มีอัตราการตาย สูง การป้องกันและรักษาโดยการหมั่นเปลี่ยนถ่ายน้ำและทำความสะอาดบ่อเป็นประจำ

1.6.4 โรคคอบวมหรือคอหนอก

พบบริเวณรอยต่อของเปลือกหัวกับลำตัวจะบวมและมีของเหลวอยู่ด้านในและต่อไปอาจแตกออก โรคนี้สามารถทำให้กุ้งตายได้ และยังไม่ทราบสาเหตุของโรคที่ชัดเจน ซึ่งอาจเกิดจากแบคทีเรีย การป้องกันรักษา ให้ยาปฏิชีวนะผสมอาหาร โดยใช้ออกซีเตตราซัยคลิน 5 กรัม ผสมอาหาร 1 กิโลกรัม

1.6.5 โรคที่เกิดจากโปรโตซัว

โรคนี้เกิดจากโปรโตซัวจำพวกยึดเกาะ มักพบในลูกกุ้งระยะก่อนคว่ำและ หลังคว่ำตัวแล้ว และยังพบในกุ้งโตเต็มวัย โปรโตซัวที่เป็นสาเหตุนี้อยู่ในสกุล *Epistylis* sp., *Zoothamnium* sp., *Acineta* sp. และ *Paracineta* sp. กุ้งที่มีโปรโตซัวจำพวกนี้เกาะอยู่มากๆจะเห็นเป็นปุยตรงบริเวณที่เกาะ สามารถป้องกันและรักษาโดยใช้ฟอร์มาลิน 25-30 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลูกบาศก์เมตร หรือด่างทับทิม 2-4 มิลลิกรัมต่อน้ำ 1 ลิตร หรือจุนสี 0.25-0.5 มิลลิกรัมต่อน้ำ 1 ลิตร หรืออาจป้องกันโดยการเปลี่ยนถ่ายน้ำในบ่อกุ้งบ่อยๆเพื่อลดการสะสมของเสียที่ก้นบ่อ

1.6.6 โรคเนื้อขาวหรือโรคเนื้อตาย

พบมากเมื่อสภาพแวดล้อมของบ่อกุ้ง ที่ไม่เหมาะสม ทำให้กุ้งเกิดความเครียด เช่น ความเค็มสูง อุณหภูมิเปลี่ยนแปลงผิดปกติ ขาดออกซิเจน และการเลี้ยงที่หนาแน่นเกินไป อาการที่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พบคือกล้ามเนื้อลำตัวและหางจะมีสีขาวขุ่น กล้ามเนื้อจะตายและลามออกไปเรื่อยๆ อาจเริ่มเกิดจากจุดเล็กๆและลุกลามต่อไปจนกุ้งตายภายใน 2-3 วัน บางครั้งพบที่หางก่อนที่จะลามไปยังส่วนอื่นๆ ของร่างกาย ป้องกันโดยการตรวจสอบคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งสม่ำเสมอ และลดปัจจัยที่ส่งผลต่อความเครียดในกุ้ง

1.6.7 โรคทางเดินอาหารอักเสบ

มักพบโรคนี้ในกุ้งก้ามกรามและกุ้งทะเล ลักษณะอาการที่พบคือ เยื่อบุผนังของทางเดินอาหารส่วนกลางและส่วนท้ายเซลล์เนื้อเยื่อตาย และมีเลือดคั่งในช่องทางเดินอาหารและบริเวณผนังทางเดินอาหาร สาเหตุอาจเกิดจากกุ้งกินสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวในสกุล *Oscillatoria* sp. การป้องกันนั้นทำได้โดยการรักษาระดับของแพลงก์ตอนพืชในบ่อกุ้งให้มีระดับที่เหมาะสม เพื่อป้องกันแสงไม่ให้ส่องถึงพื้นบ่อ และป้องกันสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวแบบเส้นใยขึ้นบนพื้นบ่อ

1.6.8 โรคทีจี

พบโรคนี้ได้ในกุ้งก้ามกรามขนาดใหญ่ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกุ้งก้ามกรามเพศผู้ กุ้งที่เป็นโรคจะอ่อนแอ ซึม ไม่ค่อยเคลื่อนไหวหรือเคลื่อนไหวเชื่องช้า เนื้อจะมีลักษณะขุ่นขาวทั้งลำตัว ตับและตับอ่อนจะมีขนาดเล็กลง มีเลือดคั่งบริเวณช่องทางเดินอาหารก่อนถึงกระเพาะ อาจพบจุลินทรีย์เกาะด้านล่างของลำตัว และบางครั้งพบจุดสีน้ำตาลตามลำตัวของกุ้งที่เป็นโรคทีจี การแก้ไขทำได้โดยการคัดแยกกุ้งที่เป็นโรคออกไป

1.6.9 โรคตัวขาว โรคกุ้งขาว

กุ้งที่เป็นโรคนี้สีจะค่อยๆซีดลงจนเป็นสีขาว และเปลือกอ่อนจะนิ่มลงเรื่อยๆ อาการระยะแรกเปลือกนอกจะแข็งตัวช้าลงหลังลอกคราบจนกระทั่งเปลือกจะนิ่มตลอด ลักษณะที่ตรวจพบของกุ้งที่เป็นโรคนี้คือการฝ่อของเม็ดสี กล้ามเนื้อจะขุ่นขาว ตับและตับอ่อนขนาดลดลง โดยสาเหตุของโรคนั้นเกิดจากการขาดสารอาหารหรือสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.6.10 โรคเรืองแสง

สาเหตุเกิดจากแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ซึ่งพบได้ทั้งในน้ำจืด น้ำทะเล และน้ำกร่อย จะพบการเรืองแสงบนตัวกุ้งที่เป็นโรคซึ่งเห็นได้ในเวลากลางคืน กุ้งว่ายน้ำเฉื่อยชา ลำตัว ขุ่น รวมกลุ่มกันและอัตราการตายอาจสูงถึง 100 % รักษาโดยใช้ยา Chloramphenical 2-3 ppm วิธีป้องกันที่ดีคือ ฆ่าเชื้อในน้ำด้วยแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ 20-30 ppm หรือฟอร์มาลิน 50 ppm

1.6.11 โรคลอกคราบไม่ออก

ลูกกุ้งที่ตายจะติดอยู่กับคราบตรงบริเวณขาว่ายน้ำ รยางค์และกรี ส่วนกุ้งที่ลอกคราบได้จะมีรยางค์ผิดปกติและตายหลังจากลอกคราบ แต่การตายจากโรคนี้มักไม่ร้ายแรง ส่วนสาเหตุที่ตายยังไม่ทราบแน่ชัดแต่อาจเกิดจากคุณภาพน้ำไม่ดีหรือขาดสารอาหาร ป้องกันและรักษาโดยรักษาคุณภาพน้ำให้เหมาะสมและให้อาหารที่มีเลซิติน

1.6.12 Larval mid cycle disease (MCD)

สาเหตุที่เกิดยังไม่ทราบแน่ชัด อาจเกิดจากสารพิษ เช่น โลหะหนัก ยากำจัดวัชพืช ขาดสารอาหาร หรือติดแบคทีเรียในกลุ่ม *Enterobacteraerogenes* กุ้งจะอ่อนแอ ไม่กินอาหาร เฉื่อยชา และถูกกินโดยกุ้งที่แข็งแรงกว่า กุ้งที่เป็นโรคมักจะมีสีน้ำเงินปนเทา และว่ายน้ำควงสว่าน มักจะพบในกุ้งอายุ 12-24 วัน วิธีป้องกันและแก้ไขที่ดีที่สุดคือ กำจัดกุ้งที่เป็นโรคทิ้งและฆ่าเชื้อและทำความสะอาดบ่อทุกครั้งที่อนุบาลเสร็จแต่ละชุด

1.6.13 โรคเนื้อตายจากแบคทีเรีย

กุ้งที่เป็นโรคมีสีออกน้ำเงินหรือซีด กระเพาะอาหารว่าง กุ้งที่อ่อนแอมักจะนอนก้นบ่อ และมีจุดสีน้ำตาลบนรยางค์และหนวด สาเหตุยังไม่แน่ชัด สันนิษฐานว่าเกิดจากแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *Leucothrix* sp. และแบคทีเรียในกลุ่ม bacilli และ cocci พบบนเหงือกและรยางค์ และอาจทำให้กุ้งตายภายใน 2 วัน รักษาโดยใช้เพนนิซิลิน 2 ppm หรือ furanace 7 ppm

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.6.14 ศัตรูของกุ้ง

ศัตรูของกุ้งที่เลี้ยงในบ่อมีหลายชนิด เช่น นกเป็ดน้ำ นกยาง กบ เต่า งู ปลากินเนื้อทุกชนิดโดยเฉพาะปลาช่อน แม้ขนาดเล็กก็สามารถกินลูกกุ้งได้ เมื่อจับปลาได้จะพบลูกกุ้งอยู่ในท้องเสมอ ปลาช่อนจึงเป็นปลาที่มีอันตรายและป้องกันยาก เพราะปลาช่อนสามารถกระโดดข้ามบ่อได้และมีอยู่ทุกแห่ง ส่วนปลาอื่นๆที่ไม่กินลูกกุ้งก็จะแย่งอาหาร ทำให้กุ้งไม่ได้รับอาหารเต็มที่และสิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย การป้องกันทำได้โดยใช้อวนมุ้งไนล่อนกั้นรอบบ่อและกรองน้ำก่อนปล่อยเข้าบ่อกุ้งเพื่อป้องกันไข่และลูกปลา สำหรับการกำจัดปลานั้นทำได้โดยสูบน้ำออกให้เหลือประมาณ 50 เซนติเมตร แล้วจึงใช้กากเมล็ดชาป่นแช่น้ำในอัตรา 25-30 กรัมต่อน้ำ 1 ตัน หรือใช้โล่ติ๊นสดในอัตรา 1 กิโลกรัมต่อน้ำ 100 ตัน โดยทุบโล่ติ๊นแช่น้ำ 1 คืนแล้วสาดให้ทั่วบ่อ ปลาจะตายหมดแต่กุ้งนั้นไม่ตาย หลังจากนั้นสูบน้ำให้เข้าไปเท่าเดิม (ยนต์, 2529)

2. ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง

สัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียน (Crustaceans) มีระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาโดยกำเนิด (innate immunity) ไม่มีระบบภูมิคุ้มกันโรคแบบจำเพาะเจาะจง โดยระบบทำงานด้วยแอนติบอดี้ (antibody) การตอบสนองแบบไม่จำเพาะเจาะจง (non-specific immune response) ส่วนใหญ่เกิดจากกิจกรรมของเม็ดเลือด น้ำเลือด และเนื้อเยื่อต่างๆในร่างกาย โดยระบบภูมิคุ้มกันโรคของกุ้งจะประกอบไปด้วย 2 ส่วน (Lackie, 1980; Ratcliffe *et al*., 1985; Smith and Chisholm, 1992) คือ

2.1 ระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์ (cellular immunity)

ระบบภูมิคุ้มกันชนิดนี้อาศัยเซลล์เม็ดเลือด 3 ชนิด คือ ไฮยาลินเซลล์ (hyalin cell) เซมิกรานูลลาร์เซลล์ (semigranular cell) และกรานูลาร์เซลล์ (large granular cell) ซึ่งเป็นเซลล์จับกินเชื้อโรคที่อยู่กับที่ (fix phagocyte) กระจายอยู่ตามเนื้อเยื่อ เหงือก ต่อมน้ำเหลือง หัวใจ และเนื้อเยื่อเกี่ยวพันต่างๆ ซึ่งทำหน้าที่ในการจับกินเชื้อโรค (phagocytic activity) และการห้อมล้อมกำจัดสิ่งแปลกปลอม (nodule formation and encapsulation) (Sindermann, 1971; Rabin, 1970)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.2 ระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด (humoral immunity)

ระบบภูมิคุ้มกันชนิดนี้เกิดจากการทำงานของหลายๆปฏิกิริยา เช่น การเกิดการแข็งตัวของเลือด (blood clotting) การเกิดเมลานิน (melanin formation) และ opsonization ระบบที่สำคัญคือโปรฟีนอลออกซิเดสแอกติเวติงซิสเตม (prophenoloxidase activating system) และเลคติน (lectin) ซึ่งคอยดักจับสิ่งแปลกปลอม (Sindermann, 1971; Rabin, 1970)

กุ้งมีระบบหมุนเวียนเลือดเป็นระบบเปิดคือ เลือดไม่ได้หมุนเวียนอยู่ในท่อเลือดตลอดเวลา เลือดจะถูกหัวใจบีบส่งไปเลี้ยงส่วนต่างๆของร่างกายแล้วจะไหลไปรวมกันที่แอ่งเลือดในส่วนของลำตัวบริเวณใต้ท้อง ซึ่งจุดนี้จะเป็นจุดรวมเลือดก่อนที่จะถูกหัวใจดึงไปฟอกที่เหงือกแล้วรับไปเลี้ยงส่วนต่างๆของร่างกายอีกครั้งหนึ่ง (กิจการ และคณะ, 2543ก) โดยน้ำเลือดของกุ้งจะ มีสีน้ำเงินซึ่งเป็นสีของฮีโมไซยานินซึ่งมีองค์ประกอบที่สำคัญคือทองแดง ทำหน้าที่ในการแลกเปลี่ยนและขนส่งออกซิเจนไปหล่อเลี้ยงเซลล์ที่เรียกกันว่า Hematopoictic tissue ซึ่งพบได้ในบริเวณฐานของกรีและโคนขาเดินในส่วนอก (อาจ, 2529; กิจการ และคณะ, 2543ก)

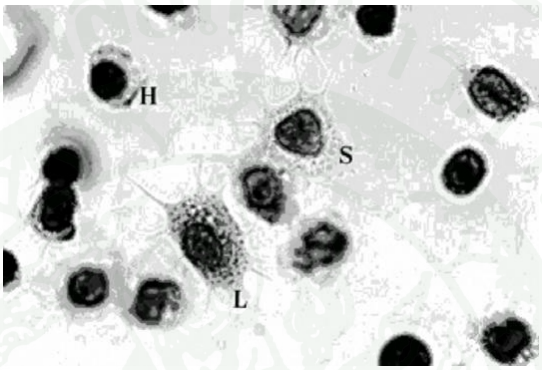
3. ชนิดและหน้าที่ของเม็ดเลือดกุ้ง

3.1 ไฮยาลินเซลล์ (hyalin cell) ไฮยาลินเซลล์เป็นเซลล์เม็ดเลือดที่มีรูปร่างแบน กลม ผิวเรียบ บางครั้งจะพบว่ามีลักษณะคล้ายกระสวย เซลล์จะมีนิวเคลียสขนาดใหญ่อยู่กลางเซลล์ พบ mitochondria, smooth endoplasmic reticulum (SER) และ rough endoplasmic reticulum (RER) น้อย ไม่มีกรานูลภายในเซลล์ เป็นเซลล์เม็ดเลือดที่มีขนาดเล็กที่สุด ขนาดของเซลล์ยาว 6.8-13.6 ไมโครเมตร กว้าง 6.4-8.3 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 5-6 ไมโครเมตร มีหน้าที่เกี่ยวกับการจับกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytosis) (Soderhall and Cerenius, 1992)

3.2 เซมิกรานูลลาร์เซลล์ (semigranular cell) เป็นเซลล์เม็ดเลือดที่มีรูปร่างเป็นรูปไข่หรือรูปกระสวย นิวเคลียสอยู่ตรงกลางหรือขอบ พบ smooth endoplasmic reticulum (SER) และ rough endoplasmic reticulum (RER) มาก มีไซโตพลาสมิกแกรนูลมากขึ้น บริเวณผิวเซลล์อาจพบไมโครวิลไลได้เล็กน้อย เซลล์มีขนาดความยาว 9.0-14.2 ไมโครเมตร กว้าง 4.2-6.8 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 7-10 ไมโครเมตร ทำหน้าที่ในการสร้าง nodule formation และ encapsulation รวมทั้งในระบบ prophenoloxidase (Soderhall and Cerenius, 1992)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.3 กรานูลาร์เซลล์ (large granular cell) เป็นเซลล์เม็ดเลือดที่มีขนาดใหญ่ที่สุดและมีกรานูลขนาดใหญ่จำนวนมากอยู่ในไซโตพลาสซึม นิวเคลียสอยู่บริเวณขอบ พบ smooth endoplasmic reticulum (SER) และ rough endoplasmic reticulum (RER) ปานกลาง เซลล์มีขนาดความยาว 12.2-14.6 ไมโครเมตร กว้าง 7.2-7.8 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 8-10 ไมโครเมตร (กิจการ และคณะ, 2543ข) มีหน้าที่หลักในการทำงานในระบบ prophenoloxidase (Soderhall and Cerenius, 1992)



ภาพที่ 4 เซลล์เม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำ H = hyalin cell, S = semigranular cell, L = large granular cell เมื่อย้อมด้วย Giemsa's stained

ที่มา: กิจการ (2543ข)

ตารางที่ 2 หน้าที่ของเม็ดเลือดกุ้งแต่ละชนิด

หน้าที่	ชนิดของเม็ดเลือด		
	ไฮยาลิน	เซมิกรานูลาร์	กรานูลาร์
การแข็งตัวของเลือด (hemolymph clotting)	+	-	-
การกลืนทำลาย (phagocytosis)	-	+	+
การห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอม (encapsulation)	-	+	+
ระบบโปรฟีนอลออกซิเดส (prophenoloxidase system)	-	+	+

ที่มา: กิจการ (2543ก)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. ระบบภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์

4.1 กระบวนการ Phagocytosis

Phagocytosis เป็นกระบวนการที่สำคัญของเม็ดเลือดในการทำลายสิ่งแปลกปลอมทั้งที่มีชีวิตและไม่มีชีวิตที่เข้าไปในตัวกุ้ง ซึ่งเป็นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง (McKay and Jenkin, 1970) โดยกระบวนการกำจัดสิ่งแปลกปลอมด้วยวิธีการกลืนกิน (phagocytosis) ถือว่าเป็นระบบภูมิคุ้มกันด่านแรกของร่างกายที่จะทำงานทันทีเมื่อพบกับแอนติเจนหรือสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย เซลล์เม็ดเลือดที่ทำหน้าที่ดังกล่าวเรียกว่า เซลล์ฟาโกซัยติก (phagocytic cell) (สันนิภา, 2549) ขั้นตอนในการกลืนกินนั้นมีลักษณะเช่นเดียวกับสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง (Ratchiffe *et al*., 1985) เมื่อสิ่งแปลกปลอมนั้นเข้าสู่ระบบจะเกิดการยึดเกาะกันระหว่างสิ่งแปลกปลอมกับผิวของเซลล์เม็ดเลือด หลังจากนั้นผิวของเซลล์เม็ดเลือดเกิดการเว้าเข้าไปเกิดเป็นฟาโกโซม (phagosome) และจะสัมผัสกับไลโซโซม (lysosome) ที่อยู่ภายในเซลล์ เกิดเป็นฟาโกไลโซโซม (phagolysosome) ซึ่งไลโซโซมนั้นมีเอนไซม์หลายชนิดที่เรียกว่า acid hydrolases ซึ่งรวมถึงเอนไซม์ DNases, RNases, proteases, phosphatases และ lipase ทำหน้าที่ย่อยสลายสิ่งแปลกปลอมทั้งหลายให้เป็นหน่วยย่อยๆและมีการแตกตัวของออกซิเจน (oxygen burst) น้ำตาลที่ถูกสะสมไว้ที่ใช้ในการสร้าง NADPH จะรวมเข้ากับออกซิเจน ซึ่งออกซิเจนเหล่านี้จะถูกรีดิวซ์เป็น superoxidase anion (O_2^-) และ toxic peroxide (H_2O_2) การแตกตัวของออกซิเจนสามารถผลิตออกซิเจนในรูปที่เป็นพิษ จำนวนโมโลกุลทั้งหมดจะมีความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาสูง และมีการทำลายอนุภาคภายในฟาโกไลโซโซม โดยกลไกทางเคมีอย่างไม่เฉพาะเจาะจง หลังจากย่อยสลายแล้วจะปลดปล่อยส่วนที่ถูกทำลายแล้วออกมาจากเซลล์ (Kein, 1982; Pick and Keisari, 1980)

การเพิ่มจำนวนอิเล็กตรอน โดยมี NADPH เป็นตัวให้อิเล็กตรอน ทำให้เกิดอนุภาคต่างๆ

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

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

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

ภายในไลโซโซม จะมีค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ต่ำ เพราะเยื่อบุผิวของไลโซโซมจะสูบฉีดไฮโดรเจนไอออน (H^-) เข้าไปในไลโซโซม เพื่อรักษาระดับความเป็นกรดด่างให้ได้ 4.8 ซึ่งเป็นค่าความเป็นกรดด่างที่ทำให้โปรตีนหลายชนิดเสื่อมสภาพ (denature) และง่ายในการทำให้แตก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ออก สภาพความเป็นกรดนี้จะเร่งให้เกิดการสร้างสารประกอบออกซิเจนบางชนิดที่เป็นพิษ เช่น peroxide (Pick and Keisari, 1980)

ระยะเวลาในการเกิดกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมสำหรับการแตกตัวของอนุภาคสิ่งแปลกปลอมจะแตกต่างออกไปขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ชนิดของสิ่งแปลกปลอม ระดับของการกระตุ้นเซลล์ที่ทำหน้าที่กลืนกินสิ่งแปลกปลอม กระบวนการนี้บางครั้งสามารถเกิดได้ในเวลาไม่กี่ชั่วโมงหรือบางครั้งอาจใช้เวลาเป็นวัน (Sung *et al*., 1996)

4.2 Nodule formation และ Encapsulation

กระบวนการนี้เกิดขึ้นในกรณีที่สิ่งแปลกปลอมมีจำนวนมากหรือมีขนาดใหญ่เกินกว่าเซลล์เม็ดเลือดจะใช้กระบวนการ Phagocytosis กำจัดออก โดยกระบวนการ Nodule formation จะเกิดขึ้นเมื่อสิ่งแปลกปลอมนั้นเข้ามาเป็นจำนวนมาก การสร้างโนดูลนั้นจะเป็นกลุ่มก้อนเซลล์รอบๆ สิ่งแปลกปลอมจะเกิดขึ้นเพื่อไม่ให้สิ่งแปลกปลอมกระจายลุกลามทั่วร่างกาย และมักพบการสร้างโนดูลบริเวณเหงือกและเฮปพาโทแพนเครียส (hepatopancreas) พร้อมกับการเกิดเม็ดสีดำ (melanin) ในระบบโปรฟีนอลออกซิเดส (Johansson and Soderhall, 1989)

ส่วน Encapsulation จะเกิดขึ้นเมื่อสิ่งแปลกปลอมนั้นมีขนาดใหญ่มากกว่า 10 ไมโครเมตร (Lackie, 1980) จนเม็ดเลือดเซลล์เดียวไม่สามารถกลืนทำลายได้ ต้องอาศัยเม็ดเลือดจำนวนมากมาล้อมจับกระจายหุ้มสิ่งแปลกปลอม เช่น เชื้อรา ไข่ของปรสิต (Ratchiffe *et al*., 1985) เซลล์ที่ทำหน้าที่ในการห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอม ได้แก่ เซมิแกรนูลาร์เซลล์ และแกรนูลาร์เซลล์ (ตารางที่ 2) โดยที่เซมิแกรนูลาร์เซลล์จะมีบทบาทมากกว่าแกรนูลลาร์เซลล์ กลไกการกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่ถูกห่อหุ้มจะอาศัยองค์ประกอบในระบบโปรฟีนอลออกซิเดสพร้อมกับมีการเกิดเม็ดสีดำ (melanin) (Nappi, 1973; Ratchiffe *et al*., 1985) และพบว่าโปรตีน 76 kDa ในน้ำเลือดจะเป็นตัวช่วยในการห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอมที่เกิดเพิ่มขึ้น โดยกระตุ้นให้เม็ดเลือดยึดเกาะสิ่งแปลกปลอมดีขึ้น (Johansson and Soderhall, 1989; Smith and Chisholm, 1992)

4.3 Melanization

การเกิด Melanization เป็นกระบวนการหนึ่งที่เกิดขึ้นในสัตว์ในไฟลัม Arthopoda หลังจากการเกิด Nodule formation หรือ Encapsulation มีการรายงานครั้งแรกโดย Lightner และ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Redman (1977) ในบริเวณที่เกิดการอักเสบของกุ้งในสกุล *Peneaus* ที่เป็นโรค ซึ่งกระบวนการนี้ถูกกระตุ้นโดย prophenoloxidase

5. ระบบที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยสารน้ำ

5.1 การแข็งตัวของเลือด (Hemolymph clotting)

การแข็งตัวของเลือดเป็นปฏิกิริยาที่สำคัญทั้งในสัตว์มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลัง เป็นกระบวนการแรกที่เกิดขึ้นทันทีภายหลังที่เกิดบาดแผล เพื่อป้องกันการสูญเสียเลือดจากบาดแผล และป้องกันการบุกรุกของเชื้อโรคผ่านบาดแผล (Johansson and Soderhall, 1989) เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นโดยเม็ดเลือดชนิดไฮยาลีนเซลล์ปลดปล่อยสารเคมีออกมาไปกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของโคแอคกลูโลเจน (coagulogen) ซึ่งเป็นสารที่ทำให้เกิดการจับตัวเป็นก้อน โดยเป็นโปรตีนหลักเกี่ยวกับการแข็งตัวของเลือดซึ่งอยู่ในน้ำเลือดของครัสเตเซียน ทำให้เกิดการแข็งตัวของเลือด การที่เลือดไม่สามารถแข็งตัวได้ อาจเกิดมาจากการที่เม็ดเลือดชนิดไฮยาลีนเซลล์มีปริมาณลดลงจากการติดเชื้อจุลินทรีย์ (Martin *et al*., 1993) และพบว่าการแข็งตัวของเลือดจะเกิดขึ้นพร้อมกับการสร้างเม็ดสีดำ (melanin) ที่เกิดขึ้นในระบบโปรฟีนอลออกซิเดส (Johansson and Soderhall, 1989; Ratchliffe *et al*., 1985)

5.2 Prophenoloxidase activating system

การสร้างเม็ดสีดำ (melanin) ในระบบโปรฟีนอลออกซิเดส บริเวณบาดแผลที่ปิดแล้ว หรือบริเวณ nodule หรือภายในกลุ่มเม็ดเลือดที่ encapsulation (Nappi, 1973) เป็นกลไกป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์ที่สำคัญของสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง (Ratchliffe *et al*., 1985) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มครัสเตเซียน (Johansson and Soderhall, 1989) พบว่าเซมิแกรนูลาร์เซลล์และแกรนูลาร์เซลล์จะเป็นแหล่งสร้างและเก็บเอนไซม์ชนิดต่างๆในระบบนี้ (ตารางที่ 2)

ระบบโปรฟีนอลออกซิเดสเป็นระบบที่มีความซับซ้อนขององค์ประกอบต่างๆทางเอนไซม์ (Johansson and Soderhall, 1989; Smith and Soderhall, 1991) ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ที่สำคัญคือ ฟีนอลออกซิเดส (PO) จะอยู่ในรูปของ pro-enzyme ที่เรียกว่า โปรฟีนอลออกซิเดส (proPO) และเอนไซม์ในกลุ่มเซอรีนโปรติเอส โดยจะทำงานร่วมกันอย่างมีระบบ (Leonard *et al*., 1985; Soderhall *et al*., 1994) เริ่มจากเซมิแกรนูลาร์เซลล์และแกรนูลาร์เซลล์จะจดจำและถูกกระตุ้น

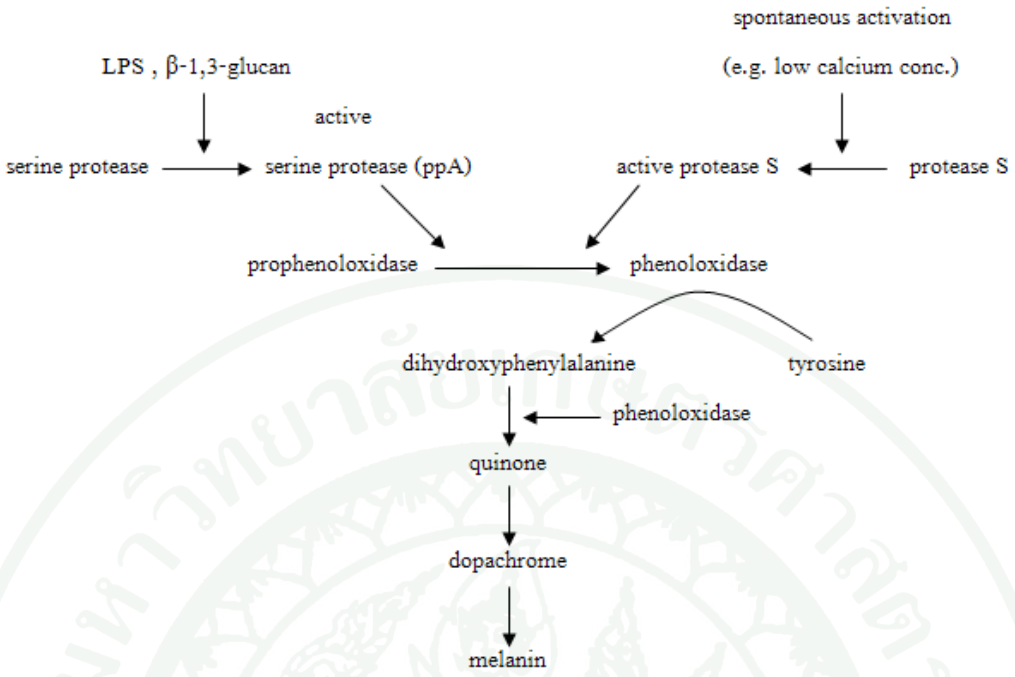
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โดยองค์ประกอบเซลล์ของเชื้อก่อโรคจำพวกไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide; LPS) ที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรีย หรือเบตา-1,3-กลูแคนซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรียและยีสต์ (Soderhall and Hall, 1984) มีผลทำให้เซลล์เม็ดเลือดเกิดการดีแกรนูเลชัน (degranulation) หลั่งเอนไซม์กระตุ้นโปรฟีนอลออกซิเดส (prophenoloxidase activating enzyme; ppA) ได้แก่ เซอรีนโปรติเอส (serine protease) และโปรฟีนอลออกซิเดส ออกจากเม็ดแกรนูล (Johansson and Soderhall, 1989; Ratchliffe *et al*., 1985) หลังจากนั้นเซอรีนโปรติเอสจะถูกกระตุ้นโดยไลโปโพลีแซคคาไรด์และเบตา-1,3-กลูแคน ให้กลายเป็นเซอรีนโปรติเอสที่อยู่ในรูปแอคทีฟ (Soderhall, 1983; Ratchliffe *et al*., 1985) มีผลไปยังปฏิกิริยาการเปลี่ยนโปรฟีนอลออกซิเดสเป็นฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase) ปฏิกิริยาการเปลี่ยนช่วงสุดท้ายนี้สามารถเกิดได้อีกทางหนึ่งคือ สภาวะที่มีความเข้มข้นของแคลเซียมต่ำจะไปกระตุ้นให้มีการเปลี่ยนโปรติเอส เอส (protease S) ให้อยู่ในรูปแอคทีฟ และมีผลเปลี่ยนโปรฟีนอลออกซิเดสเป็นฟีนอลออกซิเดสได้เช่นกัน (Ratchliffe *et al*., 1985) ดังแสดงในภาพที่ 5

ฟีนอลออกซิเดสหรืออีกชื่อหนึ่งที่เรียกว่า ไทโรซิเนส (tyrosinase) (Aspan and Soderhall, 1995) มีความสามารถเกาะจับกับผิวของจุลินทรีย์และพยาธิ พร้อมกับชักนำให้เกิดการสร้างเม็ดสีดำบนเชื้อก่อโรคนั้นๆ (Johansson and Soderhall, 1989; Thornqvist and Soderhall, 1997) ฟีนอลออกซิเดสจะเร่งปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชัน (hydroxylation) เปลี่ยนเป็นไทโรซีน (tyrosine) ให้เป็นไฮดรอกซีฟีนิลอะลานีน (dihydroxyphenylalanine; DOPA) และออกซิไดซ์ไดไฮดรอกซีฟีนิลอะลานีนให้กลายเป็นควิโนน (quinone) หลังจากนั้นควิโนนจะมีการเรียงตัวใหม่เองโดยไม่มีเอนไซม์เกี่ยวข้องกลายเป็นโดปาโครม (dopachrome) เกาะตัวรวมกันเป็นเม็ดสีดำ (Aspan and Soderhall, 1995; Pawelek and Korner, 1982) ดังแสดงในภาพที่ 5

เม็ดสีดำ (melanin) ที่สร้างขึ้นในระบบโปรฟีนอลออกซิเดสพบว่า สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่มารุกรานได้ (Kuo and Alexander, 1967; ชัยชาญ, 2545) นอกจากนี้สารตัวกลางในขั้นตอนการสร้างเม็ดสีดำก็สามารถทำลายจุลินทรีย์และพยาธิได้เช่นกัน (Pawelek and Lerner, 1978; Zlotkin *et al*., 1973)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 5 Phenoloxidase system

ที่มา: สมบัติ (2542)

นอกจากการทำงานของเม็ดเลือดในการทำลายสิ่งแปลกปลอมในน้ำเลือดของกุ้งยังมีสารประกอบทางชีวเคมีที่มีพิษต่อเชื้อที่ทำให้เกิดโรคอีกหลายชนิด สารชีวเคมีเหล่านี้เรียกรวมกันว่าสารน้ำ (humoral defenses) ได้แก่ สารที่ออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (antibacterial activity) แอกกลูตินิน (agglutinin) สารคล้ายไซโตไคน์ (cytokine-like) โมดูเลเตอร์ (modulator) และสารที่เกี่ยวข้องกับการแข็งตัวของเลือด (clotting factor) (กิจการ และคณะ, 2543ก) โดยค่าชีวเคมีของเลือดกุ้งดังแสดงในตารางที่ 3

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 3 ค่าปกติทางชีวเคมีของเลือดกุ้ง

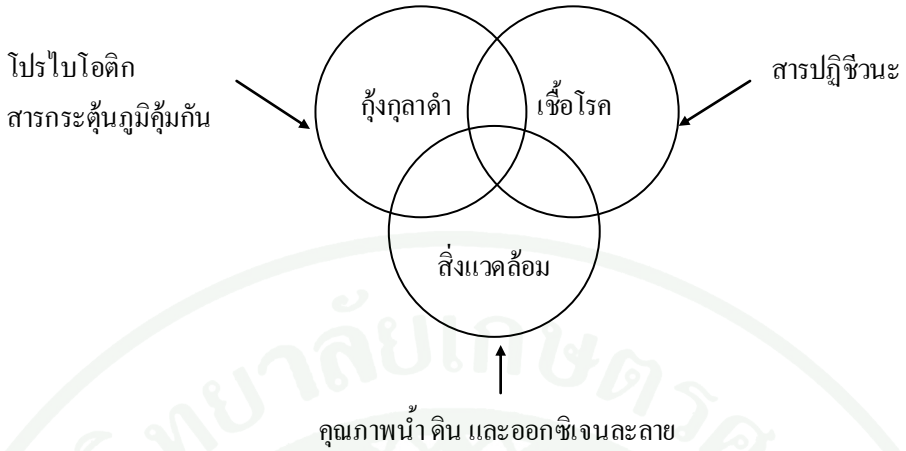
Parameter	Value
Total hemocyte count (10^4 cell/mm^3)	4.26 ± 1.10x10^4 cell/ml (n=20)
Phenoloxidase activity: Hemocytes	352.72 ± 52.30 unit/min/mg protein (n=20)
Serum	32.23 ± 6.04 unit/min/mg protein (n=20)
Phagocytic activity	22.87 ± 2.37 % (n=10)
Clearance activity	2.20 ± 1.23 x 102 CFU/ml (n=20)
Virucidal activity	1:2 - 1:4 (n=20)
Bactericidal activity	1:2 - 1:4 (n=20)
Superoxide activity	25.41 ± 8.32 (n=20) 1 O.D. = 0.001 Unit

ที่มา: กิจการ และคณะ (2543ค)

6. กลไกการเกิดโรคในบ่อกุ้ง

กลไกการเกิดโรคในบ่อเลี้ยงกุ้งก้ามกรามนั้นขึ้นอยู่กับการจัดการสิ่งแวดล้อม ได้แก่ คุณภาพน้ำ คุณภาพดิน และออกซิเจนที่ละลายในน้ำที่เหมาะสม ไม่มีเชื้อก่อโรคกุ้ง ในปริมาณที่สูงจนเกินไป ส่งผลต่อการเจริญเติบโต การรอดชีวิต และสุขภาพของกุ้ง ในปัจจุบัน ได้มีการใช้สารปฏิชีวนะ โปรไบโอติก หรือสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันเพื่อให้กุ้งมีสุขภาพดี ซึ่งการใช้สารปฏิชีวนะเพื่อป้องกันและรักษาโรคกุ้งนั้น หากใช้ในปริมาณมากเกินไปและใช้ติดต่อกันนานนานย่อมส่งผลเสีย ทำให้เชื้อก่อโรคเกิดการดื้อยาสูงขึ้นเรื่อยๆ ทำให้รักษาโรคยากขึ้น และเสียค่าใช้จ่ายสูง เกิดสารตกค้างในกุ้งก่อนจับจำหน่าย ซึ่งปัจจุบันประเทศที่นำเข้ากุ้งจากประเทศไทยนั้นได้มีการกำหนดมาตรฐานสินค้าผลิตภัณฑ์กุ้งที่มีคุณภาพ ปราศจากสารตกค้าง ทำให้การเลี้ยงกุ้งจึงนิยมใช้โปรไบโอติกทดแทนยาปฏิชีวนะ (ศิริรัตน์, 2539)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 6 ความสัมพันธ์ระหว่างกุ้งกุลาดำ สิ่งแวดล้อมในบ่อเลี้ยงกุ้ง และเชื้อโรค รวมทั้งวิธีการที่ใช้ในการจัดการของแต่ละปัจจัย

ที่มา: ศิริรัตน์ (2539)

7. โปรไบโอติก

โปรไบโอติกมีรากศัพท์จากภาษากรีก หมายความว่า เพื่อชีวิต โปรไบโอติกมีการวิจัยครั้งแรกโดย Lilly และ Stillwell ในปี 1965 ซึ่งได้กล่าวถึงสารที่จุลินทรีย์ชนิดหนึ่งหลั่งออกมา และช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่ง ต่อมา Parker (1974) ให้คำจำกัดความของโปรไบโอติกว่าเป็นสิ่งมีชีวิตและสารเคมีที่มีผลต่อสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ โดยสารที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นมามีคุณสมบัติคล้ายยาปฏิชีวนะแต่ไม่ทราบว่าเป็นสารใด และ Fuller (1989) ได้ให้คำจำกัดความโปรไบโอติกคือ อาหารเสริมซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิต และสามารถก่อให้เกิดประโยชน์ต่อร่างกายของสิ่งมีชีวิตที่อาศัยโดยการปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในร่างกาย Havenaar and Huis in't Veld (1992) กล่าวว่า โปรไบโอติกคือจุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่เพาะเลี้ยงเป็นจุลินทรีย์ชนิดเดียวหรือจุลินทรีย์ผสมนำไปเสริมให้แก่สัตว์และคนแล้วมีผลประโยชน์ต่อสัตว์และคนนั้นๆ โดยช่วยเสริมคุณสมบัติของจุลินทรีย์ประจำถิ่น จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกมีหลายชนิดดังแสดงในตารางที่ 4

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 4 โปรไบโอติกชนิดต่างๆ

Lactobacilli	*Bifidobacteria*	Other LAB	Non-LAB
L. acidophilus	*B. animalis*	*E. faecium*	*B. cereus*
L. casei	*B. breve*		*E. coli*
L. johnsonii	*B. infantis*		*S. boulardii*
L. reuteri	*B. longum*		*Cl. butyricum*
L. rhamnosus	*B. adolescentis*		
L. salvarius	*B. lactis*		
L. plantarum	*B. bifidum*		
L. crispatus			

ที่มา: Shortt (1999)

7.1 ประโยชน์ของโปรไบโอติก

โปรไบโอติกมีประโยชน์ต่อร่างกายสัตว์เนื่องจากช่วยปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค ส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย ส่งเสริมการเจริญเติบโต กระตุ้นภูมิคุ้มกัน ทำให้ปริมาณน้ำนมเพิ่มขึ้น และให้ไข่ปริมาณมากขึ้น โปรไบโอติกที่นิยมใช้ในอาหารสัตว์ ได้แก่ *Lactobacillus, Bifidobacterium, Bacillus, Streptococcus, Pediococcus, Enterococcus, Saccharomyces cerevisiae* และ *S. boulardii* ปัจจุบันมีงานวิจัยที่สนับสนุนว่า โปรไบโอติกนั้นมีประโยชน์ต่อร่างกายสัตว์ และสามารถจำแนกประโยชน์ได้ดังนี้ (Jariyawaranukul, 2005)

7.1.1 เพิ่มการเจริญเติบโต

7.1.2 เพิ่มประสิทธิภาพการย่อยอาหาร

7.1.3 กระตุ้นการกินอาหารของสัตว์

7.1.4 ปรับสมดุลของจุลินทรีย์ภายในลำไส้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

7.1.5 ควบคุมการติดเชื้อก่อโรคในลำไส้ เพิ่มภูมิคุ้มกันโรคให้กับร่างกาย

7.1.6 สร้างจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่เป็นประโยชน์ต่อลำไส้ในสัตว์ที่เจริญเติบโตไม่เต็มที่

7.2 โปรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงกุ้ง

ปัจจุบันได้มีการใช้โปรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำกันอย่างแพร่หลายทั้งในรูปของการผสมในอาหารให้กุ้งกินและให้โปรไบโอติกในน้ำโดยตรง โดยจุลินทรีย์ที่ใช้นั้นมีทั้งการใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกเพียงชนิดเดียวหรือการใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกหลายชนิดร่วมกัน ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้ได้มีการคัดเลือกจุลินทรีย์คุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก ตัวอย่างจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่มีการใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้งแสดงดังตารางที่ 5

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 5 โปรไบโอติกที่มีการใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้ง

จุลินทรีย์โปรไบโอติก	แหล่งที่มา	สัตว์ที่ใช้	รูปแบบการนำไปใช้	กลไกการทำงาน	ปริมาณการใช้ (CFU/ml)	อ้างอิง
Bacillus sp. (strain S11)	*P. monodon*	*P. monodon*	เสริมในอาหาร	ยับยั้ง *V. harveyi* และมีผลต่อคุณภาพน้ำ	10^6-10^7	Rengpipat *et al*., 1998a
Bacillus sp.	*P. monodon*	*P. monodon*	เสริมในอาหาร	กระตุ้นภูมิคุ้มกันและต้านทานต่อ *V. harveyi*	10^2	Rengpipat *et al*., 2000
Bacillus sp.	*P. monodon*	*P. monodon*	เสริมในอาหาร	ยับยั้ง *V. harveyi* และมีผลต่อคุณภาพน้ำ	10^8	Rengpipat *et al*., 2003
Bacillus sp.	*P. monodon*	*P. monodon*	เสริมในอาหาร	ยับยั้ง *V. harveyi*	10^3	Meunpol *et al*., 2003
Bacillus sp. (strain P64)	*L. vannamei*	*L. vannamei*	เสริมในน้ำ	ยับยั้ง *V. harveyi*	10^7	Gullian *et al*., 2004
Bacillus sp. (strain BT23)	บ่อดินเลี้ยงกุ้ง	*P. monodon*	เสริมในน้ำ	ยับยั้ง *V. harveyi*	10^8	Vaseeharan *et al*., 2003
Bacillus sp.	ไม่ระบุ	Penaeids	เสริมในน้ำ	ไม่ระบุ	ไม่ระบุ	Moriarty *et al*., 1998
Bacillus sp.	ไม่ระบุ	*L. vannamei*	เสริมในอาหาร	มีผลต่อการย่อยอาหาร	10^8	Lin *et al*., 2004
Bacillus sp., *S. cerevisiae*, *Nitrosomonas* sp., *Nitrobacter* sp.	ไม่ระบุ	*L. vannamei*	เสริมในน้ำ	มีผลต่อคุณภาพน้ำและควบคุมแบคทีเรีย	10^9,4.5×10^5, 6.4×10^4,2.8×10^6	Wang *et al*., 2005
Bacillus sp., *S. cerevisiae*, *Nitrosomonas* sp., *Nitrobacter* sp.	ไม่ระบุ	*P. monodon*	เสริมในน้ำ	มีผลต่อแบคทีเรียและสุขภาพของกุ้ง	ไม่ระบุ	Dalmin *et al*., 2001
Bacillus sp., *Saccharomyces* sp.	ไม่ระบุ	*P. monodon*	เสริมในน้ำ	มีผลต่อคุณภาพน้ำ	10^8,5.6×10^5	Matias *et al*., 2002

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 5 (ต่อ)

จุลินทรีย์โปรไบโอติก	แหล่งที่มา	สัตว์ที่ใช้	รูปแบบการนำไปใช้	กลไกการทำงาน	ปริมาณการใช้ (CFU/ml)	อ้างอิง
Bacillus sp., *Nitrobacter* sp., *Nitrosomonas* sp.	ไม่ระบุ	*P. monodon*	เสริมในน้ำ	มีผลต่อคุณภาพน้ำ	ทั้งหมด 10^8	Matias *et al*., 2002
สปอร์ *B. subtilis, B. licheniformis, B. polymyxa, B. laterosporus, B. circulans,*	ไม่ระบุ	*F. indicus*	เสริมในน้ำและอาหาร	มีผลต่อการย่อยอาหาร	10^6และ10^7	Ziaei-Nejad *et al*., 2006
*B. pumilus, B. sphae*ricus, *B. subtilis*	*P. monodon*	*P. monodon*	เสริมในอาหาร	ยับยั้ง *V. harveyi* และกระตุ้นภูมิคุ้มกัน	10^{10}-10^{11}	Purivirojkul *et al*., 2005
L. bulgaricus (strain NCIM2056)	ไม่ระบุ	*F. indicus*	เสริมในอาหาร	ยับยั้ง *V. alginolyticus*	5×10^6	Ajitha *et al*., 2004
L. bulgaricus (strain NCIM2057)	ไม่ระบุ	*F. indicus*	เสริมในอาหาร	ยับยั้ง *V. alginolyticus*	5×10^6	Ajitha *et al*., 2004
L. acidophilus (strain NCIM2285)	ไม่ระบุ	*F. indicus*	เสริมในอาหาร	ยับยั้ง *V. alginolyticus*	5×10^6	Ajitha *et al*., 2004

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

7.3 กลไกการทำงานของโปรไบโอติกในกุ้ง

7.3.1 การแข่งขันกับเชื้อก่อโรค

กลไกการป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคคือ การแข่งขันในการยึดเกาะบนผิวทางเดินอาหารหรือบนเนื้อเยื่อของเจ้าบ้าน จึงนับว่าการแข่งขันในการยึดเกาะกับเชื้อก่อโรคเป็นกลไกการทำงานแรกของโปรไบโอติก โดยการยึดเกาะไม่จำเป็นต้องมีความจำเพาะ อาจขึ้นอยู่กับปัจจัยทางเคมีหรือโมเลกุลบริเวณที่เป็นตัวรับบนผิวเซลล์ (receptor molecules) การยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อก่อโรคบนผิวเซลล์ของมนุษย์ได้มีการวิจัยที่ยืนยันผล แต่ในการศึกษาในสัตว์น้ำ นั้น กลไกการแข่งขันการยึดเกาะนั้นเป็นเพียงสมมติฐานซึ่งยังไม่มีการวิจัยเพื่อพิสูจน์สมมติฐานนี้ การแข่งขันพื้นที่ในการยึดเกาะที่บริเวณทางเดินอาหารโดยโปรไบโอติกนั้นเป็นสาเหตุให้เชื้อก่อโรคถูกกำจัดออกนอกร่างกายได้ หรือสารที่โปรไบโอติกผลิตขึ้น เช่น กรดแลคติก ซึ่งมีสภาพเป็นกรดทำให้เชื้อก่อโรคอยู่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการก่อโรคในสัตว์ได้

7.3.2 กระตุ้นการเจริญเติบโต

แบคทีเรียบางสายพันธุ์นั้นมีคุณสมบัติในการย่อยสารอาหารโดยการผลิต extracellular enzymes เช่น เอนไซม์โปรตีนเอส เอนไซม์ไลเปส ซึ่งเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโต (Prieur *et al*., 1990) อีกทั้งเป็นเอนไซม์เสริมการย่อยหรือจุลินทรีย์บางชนิดสร้างน้ำย่อยทำให้การดูดซึมสารอาหารมีประสิทธิภาพเนื่องจากสภาพความเป็นกรดในลำไส้กุ้งหรือเกิดจากกิจกรรมของแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหาร เช่น วิตามิน หรือกรดอะมิโนจำเป็น (Dall and Moriarty, 1983) รวมถึงแร่ธาตุต่างๆซึ่งมีส่วนช่วยในการเจริญเติบโต

Rengpipat *et al.* (1998a) ศึกษาการเสริมแบคทีเรียโปรไบโอติก *Bacillus* S11 ปริมาณ 10^6 ถึง 10^7 CFU/ml ในอาหารกุ้งกุลาดำสำเร็จรูป โดยเลี้ยงกุ้งกุลาดำระยะโพสต์ลาวา 15 (PL-15) นาน 100 วัน พบว่า กุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารเสริมโปรไบโอติกมีอัตราการเจริญเติบโตไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) จากนั้นทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* D331 ปริมาณ 10^5 CFU/ml นาน 10 วัน พบว่า กุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารเสริมโปรไบโอติกมีอัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่กลุ่มควบคุมมีอัตราการรอดชีวิตเพียง 26 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Rengpipat *et al*. (1998b) ศึกษาการเสริมโปรไบโอติก *Bacillus* S11 ปริมาณ 10^4 CFU/ml ในอาหารของโฮสต์คืออาร์ทิเมีย ในระยะการเพาะเลี้ยงอาร์ทิเมียนาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำอาร์ทีเมียที่ได้รับโปรไบโอติกไปเลี้ยงกุ้งกุลาดำในระยะโพสต์ลาวาร์ (PL-10) นาน 2 สัปดาห์ จากนั้นทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. haveyi* D331 ปริมาณ 10^7 CFU/ml พบว่า กลุ่มที่ได้รับอาร์ทิเมียเสริมโปรไบโอติกมีน้ำหนักและความยาวลำตัวสูง กว่ากลุ่มควบคุม อัตราการรอดชีวิตตลอดการทดลองสูงขึ้น (89% และ 85% ตามลำดับ) และหลังทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. haveyi* D331 พบว่า มีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 13% และ 4% ตามลำดับ

Phianphak (1999) ศึกษาการเสริมโปรไบโอติก *Lactobacillus* spp. 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1338, *L. bulgaricus* TISTR 1339, *L. casei* TISTR 1340, *L. casei* subsp. *tolerans* TISTR 1341 และ *L. jensenii* TISTR 1342 ซึ่งแยกจากทางเดินอาหารไก่ เสริมในอาหารกุ้งสำเร็จรูปในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำนาน 100 วัน พบว่า กุ้งที่ได้รับอาหารเสริมโปรไบโอติกทุกกลุ่มทดลองมีการเจริญเติบโตและการรอดชีวิตสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อนำกุ้งทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* D331 นาน 10 วัน พบว่า กุ้งในกลุ่มควบคุมมีอัตราการรอดชีวิตเพียง 26 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กลุ่มทดลองที่ได้รับอาหารเสริมโปรไบโอติกมีอัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์

Deeseenthum *et al*. (2007) ศึกษาผลของการใช้จุลินทรีย์ *Bacillus* sp. เป็นโปรไบโอติกต่อการเจริญเติบโตของกุ้งก้ามกราม นาน 120 วัน โดยแบ่งอาหารออกเป็นกลุ่มควบคุม อาหารสำเร็จรูปผสม *Bacillus* KKU03 อาหารสำเร็จรูปผสม *Bacillus* KKU02 และอาหารสำเร็จรูปผสม *Bacillus* KKU02 กับ *Bacillus* KKU03 ในอัตราส่วนโปรไบโอติก 200 มิลลิลิตรต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ซึ่งมีปริมาณโปรไบโอติกก่อนผสมในอาหารประมาณ 10^7 CFU/ml ผลการศึกษาพบว่า กุ้งที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปผสม *Bacillus* KKU02 กับ *Bacillus* KKU03 มีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับกลุ่มการทดลองอื่นๆ ($p>0.05$) และการเก็บอาหารสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติกที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่า มีการรอดชีวิตโปรไบโอติกลดลงน้อยกว่าการเก็บอาหารสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติกที่อุณหภูมิห้อง

วรรนิภา (2539) แยกแบคทีเรียจากบริเวณทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำและน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกคือ *Bacillus* S11 ซึ่งสามารถสร้างสารต่อต้านจุลินทรีย์ก่อโรคได้ดีในช่วง late log phase และ stationary phase โดยอัตราการผสมโปรไบโอติก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กับอาหารกุ้งที่เหมาะสมเท่ากับ 1:3 คือ ใช้โปรไบโอติก 1 กรัมต่ออาหารกุ้ง 3 กรัม โดยอาหารเม็ดนั้นยังคงรูปเมื่อนำ *Bacillus* S11 ผสมในอาหารกุ้งกุลาดำและเลี้ยงนาน 100 วัน พบว่า กุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกมีการเจริญเติบโตและอัตราการรอดสูงกว่ากุ้งกลุ่มควบคุมแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) หลังจากนั้นนำมาทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* นาน 10 วัน พบว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสม *Bacillus* S11 มีอัตราการรอดชีวิต 100% ส่วนกุ้งกลุ่มควบคุมมีอัตราการรอดชีวิตเพียง 26% แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

วลัยพร (2544) ได้คัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกราม โดยแยกได้จากตัวอย่างลำไส้สัตว์น้ำจืด ไส้ไก่ มูลสุกร มูลวัว ผลิตภัณฑ์นม ผลิตภัณฑ์หมักดองจากเนื้อสัตว์และผักต่างๆ พบจุลินทรีย์ 4 สายพันธุ์ ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก ได้แก่ *Lactobacillus plantarum* LP64, *Lactobacillus casei* LM26, *Enterococcus faecium* E26 และ *Lactobacillus lactis* F4 จากนั้นศึกษาผลของการใช้แบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 4 สายพันธุ์ ต่อการเจริญเติบโตและการรอดชีวิตของกุ้งก้ามกราม พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 4 สายพันธุ์ ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโต แต่ทั้งนี้มีผลต่ออัตราการรอดชีวิตแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

7.3.3 คุณภาพน้ำ

การเพิ่มคุณภาพน้ำให้ดีขึ้น โดย *Bacillus* sp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก สามารถเปลี่ยนสารอินทรีย์เป็นคาร์บอนไดออกไซด์ได้ แบคทีเรียแกรมบวกสามารถเพิ่มสารอินทรีย์ที่ละลายในปริมาณน้อย Dalmin *et al*. (2001) รายงานว่า *Bacillus* sp. มีผลต่อคุณภาพน้ำ กระตุ้นการเจริญเติบโต การรอดชีวิต และสุขภาพของกุ้งลูกกุ้งกุลาดำ พร้อมทั้งลดปริมาณ *Vibrio* sp.

7.3.4 กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน

โปรไบโอติกนั้นสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงได้ โดย Rengpipat *et al*. (2000) เสริม *Bacillus* S11 ในกุ้งกุลาดำ พบว่า สามารถต่อต้านการเกิดโรคโดยการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์และระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือดของกุ้งกุลาดำ

Ajitha *et al*. (2004) ศึกษาผลของแบคทีเรียกรดแลคติกต่อความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio algnolyticus* ในกุ้งแชบ๊วย โดยใช้แบคทีเรียกรดแลคติก 4 สายพันธุ์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus ceremoris*, *Lactobacillus bulgaricus*-56 และ *Lactobacillus bulgaricus*-57 โดยเสริมแบคทีเรียกรดแลคติกปริมาณ 5×10^6 CFU/อาหาร 1 กรัม นาน 4 สัปดาห์ พบว่า กุ้งที่ได้รับโปรไบโอติกมีอัตราการรอดชีวิตสูงขึ้น ทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. algnolyticus* โดยฉีดเข้ากล้ามเนื้อ 0.1 มิลลิลิตร ปริมาณเชื้อ 3×10^9 CFU/ml พบว่า ไม่มีผลเหนี่ยวนำให้เกิดโรคในกุ้งที่ได้รับแบคทีเรียกรดแลคติก สรุปได้ว่าแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถยับยั้งเชื้อ *V. algnolyticus* และกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้

Tseng *et al*. (2009) ศึกษาผลของ *Bacillus subtilis* E20 ซึ่งแยกจากถั่วเหลืองหมักต่อระบบภูมิคุ้มกันและความต้านทานโรคของกุ้งขาวแวนนาไมซึ่งเลี้ยงนาน 98 วัน โดยเสริมโปรไบโอติกในปริมาณต่างๆกันดังนี้ 10^6, 10^7 และ 10^8 CFU/อาหาร 1 กิโลกรัม พบว่ามีอัตราการรอดชีวิตสูงขึ้นเท่ากับ 13.3%, 16.7% และ 20% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม จากนั้นทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio alginolyticus* พบว่า จำนวนเม็ดเลือดรวมทั้งหมด, repiratory burst, superoxide dismutase และ glutathione peroxidase ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ทุกกลุ่มการทดลอง กุ้งที่ได้รับโปรไบโอติกปริมาณ 10^8 CFU/kg มีกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส กิจกรรมของเม็ดเลือดในการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม และประสิทธิภาพการทำลายเชื้อก่อโรคสูงกว่ากลุ่มควบคุม เช่นเดียวกับ Liu *et al*. (2010) ศึกษาผลของ *Bacillus subtilis* E20 โดยเสริมในน้ำที่เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมปริมาณ 10^8 และ 10^9 CFU/น้ำ 1 ลิตรทุกๆ 3 วัน ตลอดการทดลอง 14 วัน ต่อสภาวะความเครียดและระบบภูมิคุ้มกัน พบว่า อัตราการรอดชีวิตของกลุ่มที่ได้รับโปรไบโอติกปริมาณ 10^9 CFU/น้ำ 1 ลิตร สูงกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับโปรไบโอติกปริมาณ 10^8 CFU/น้ำ 1 ลิตร แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

Vieira *et al*. (2010) ศึกษาผลของการเสริม *Lactobacillus plantarum* ต่ออัตราการรอดชีวิต อัตราการเจริญเติบโต จุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร ระบบภูมิคุ้มกัน และความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. haveyi* ของกุ้งขาวแวนนาไม นาน 60 วัน พบว่า อัตราการรอดชีวิตและน้ำหนักตัวแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และในการทดลองวันที่ 20 ของการทดลอง กลุ่มที่ได้รับโปรไบโอติกมีปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกในระบบทางเดินอาหารสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม หลังจากทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. haveyi* นาน 10 ชั่วโมง อัตราการรอดชีวิตของกลุ่มเสริมโปรไบโอติกสูงกว่ากลุ่มควบคุม (65.7±2.9% และ 39.9±4.4% ตามลำดับ) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และยังพบว่า

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จุลินทรีย์ในเลือดและตับของกลุ่มได้รับโปรไบโอติกนั้นมีปริมาณต่ำกว่ากลุ่มควบคุม อีกทั้งปริมาณเม็ดเลือดรวมสูงกว่ากลุ่มควบคุมแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

นิตยา (2549) ศึกษาการเสริมโปรไบโอติก *Bacillus subtilis* และ *Bacillus licheniformis* แยกจากกุ้งกุลาดำ โดยเลี้ยงกุ้งกุลาดำนาน 1 เดือน แบ่งการทดลองออกเป็น 7 ชุดการทดลอง ได้แก่ ชุดการทดลองที่ 1 อาหารสำเร็จรูปไม่ผสมโปรไบโอติก (control) ชุดการทดลองที่ 2 อาหารสำเร็จรูปผสม *Bacillus subtilis* 3 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ชุดการทดลองที่ 3 อาหารสำเร็จรูปผสม *Bacillus subtilis* 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ชุดการทดลองที่ 4 อาหารสำเร็จรูปผสม *Bacillus licheniformis* 3 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ชุดการทดลองที่ 5 อาหารสำเร็จรูปผสม *Bacillus licheniformis* 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ชุดการทดลองที่ 6 อาหารสำเร็จรูปผสม *Bacillus subtilis* กับ *Bacillus licheniformis* (ในอัตราส่วน 1:1) 3 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม และชุดการทดลองที่ 6 อาหารสำเร็จรูปผสม *Bacillus subtilis* กับ *Bacillus licheniformis* (ในอัตราส่วน 1:1) 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม พบว่า น้ำหนักตัวระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) และกุ้งที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปผสม *Bacillus subtilis* กับ *Bacillus licheniformis* (ในอัตราส่วน 1:1) 3 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีระดับภูมิคุ้มกันสูงกว่ากลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กุ้งที่ได้รับอาหารกลุ่มทดลองทั้งหมดมีปริมาณ *Vibrio* spp. ในลำไส้ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมให้การกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่เหมาะสม พบว่า กุ้งที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปผสม *Bacillus subtilis* และ *Bacillus licheniformis* (ในอัตราส่วน 1:1) 3 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ทุกวัน มีระดับภูมิคุ้มกันสูงกว่ากลุ่มได้รับโปรไบโอติกวันเว้นวันและกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. สัตว์ทดลอง

กุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) เพศผู้ อายุ 4 เดือน น้ำหนัก 12-20 กรัม จากฟาร์มเอกชนจังหวัดนครปฐม

2. โปรไบโอติก

แบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria) สายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum* LP64 ที่คัดเลือกโดยวลัยพร (2544) เก็บรักษาเพื่อเป็น stock culture ในอาหารเหลว MRS ที่มีสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3. อาหารทดลอง

อาหารที่ใช้ทดลอง ได้แก่ อาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูป และอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสม *L. plantarum* LP64 โดยสูตรอาหารทดลองมี 4 สูตรดังนี้

สูตรที่ 1 อาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูป

สูตรที่ 2 อาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสม *L. plantarum* LP64 อัตราส่วน 0.5:3 (ปริมาตร/น้ำหนักอาหาร)

สูตรที่ 3 อาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสม *L. plantarum* LP64 อัตราส่วน 1:3 (ปริมาตร/น้ำหนักอาหาร)

สูตรที่ 4 อาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสม *L. plantarum* LP64 อัตราส่วน 1.5:3 (ปริมาตร/น้ำหนักอาหาร)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. อุปกรณ์และสารเคมีในการเลี้ยงโปรไบโอติก

4.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ de Man, Rogosa and Sharpe (MRS)

4.2 เครื่องเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (3K-17, Sigma, Germany)

4.3 ตู้บ่มเชื้อ (ZSD-A1090, Zhicheng, China)

5. อุปกรณ์การเลี้ยงกุ้ง

5.1 ตู้กระจก ขนาด 51×61×37 เซนติเมตร (ความจุ 100 ลิตร)

5.2 ระบบเติมอากาศ เช่น สายยางต่อกับหัวทราย

5.3 อุปกรณ์การเปลี่ยนถ่ายน้ำ และดูดเศษอาหาร เช่น สายยาง

5.4 เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง

6. อุปกรณ์สำหรับเก็บตัวอย่างเลือดของกุ้งก้ามกราม

6.1 กระบอกฉีดยาขนาด 3 มิลลิลิตร

6.2 เข็มฉีดยาขนาด 1 นิ้ว เบอร์ 24

6.3 เครื่องเหวี่ยง (MCD-2000, Hsiangtai, Taiwan)

6.4 Microcentrifuge tube

6.5 สารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (10% sodium citrate in RPMI)

7. อุปกรณ์และสารเคมีในการวิเคราะห์ปริมาณเม็ดเลือดรวม

7.1 Trypan blue solution

7.2 Hemacytometer

7.3 กล้องจุลทรรศน์ (BA 210, Motic, China)

8. อุปกรณ์และสารเคมีในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส

8.1 สาระละลาย L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA)

8.2 สารละลาย 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES)

8.3 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (V-1100D, Mapada, China)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

9. อุปกรณ์และสารเคมีในการวิเคราะห์กิจกรรมของเม็ดเลือดในการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม

9.1 ยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*)

9.2 สี Giemsa

9.3 Shrimp saline

9.4 Methanol

9.3 กล้องจุลทรรศน์ (BA 210, Motic, China)

9.4 เครื่องเหวี่ยง (MCD-2000, Hsiangtai, Taiwan)

10. อุปกรณ์และสารเคมีในการวิเคราะห์กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือด

10.1 แบคทีเรีย *Vibrio harveyi*

10.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soya broth (TSB)

10.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulfate citrate bile sucrose agar (TCBS)

10.4 1.5% NaCl และ 2.6% NaCl ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

10.5 เครื่องเหวี่ยง (MCD-2000, Hsiangtai, Taiwan)

11. อุปกรณ์และสารเคมีในการวิเคราะห์โปรตีน

11.1 1% Na_2CO_3

11.2 0.5% NaOH

11.3 0.5% $CuSO_4$

11.4 1% NaKtatrate

11.5 Folin (Ciocalteu's phenol reagent)

12. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับวัดคุณภาพน้ำ

12.1 เครื่องวัดค่าออกซิเจนละลายน้ำ (YSI 550A-12, YSI, U.S.A.)

12.2 เครื่องวัดค่าพีเอช และ วัดอุณหภูมิ (YSI pH10, YSI, U.S.A.)

12.3 สารเคมีในการวิเคราะห์แอมโมเนียในน้ำ ได้แก่ $MgSO_4$, phenol reagent และ hypochlorite reagent

12.4 สารเคมีในการวิเคราะห์ไนไตรท์ในน้ำ ได้แก่ sulfanilamide และ N-(1-naphthyl)-ethylennediamine dihydrochloride solution

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

13. วัสดุอุปกรณ์อื่นๆ

13.1 ถังไฟเบอร์ขนาดความจุ 1 ลูกบาศก์เมตร

13.2 อุปกรณ์ในการชั่งน้ำหนักและขนย้ายสัตว์ทดลอง เช่น กระป๋องพลาสติก

13.3 ตาข่ายพลาสติกแข็ง

13.4 ตาข่ายไนลอน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิธีการ

การเตรียมเชื้อ

กระตุ้น *Lactobacillus plantarum* LP64 จาก working stock ซึ่งเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส โดยถ่ายเชื้อ 1 ลูป ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (v/v) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นเพิ่มปริมาณเชื้อโดยถ่ายเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ลงในอาหารเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้ง จากนั้นแขวนลอยเซลล์ด้วยอาหารเหลว MRS

การทดลองที่ 1 การศึกษาการรอดชีวิต (viability) ของโปรไบโอติกในรูปเชื้อสดและอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติก

1.1 ตรวจสอบการรอดชีวิตของ *L. plantarum* LP64 ในรูปเชื้อสดเปรียบเทียบระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ 37 องศาเซลเซียส โดยผลิตเชื้อสดแล้วแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และส่วนที่ 2 เก็บที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นับปริมาณจุลินทรีย์โดยวิธี spread plate บน MRS agar ที่มีบรอมครีซอลเพอเพิลเป็นอินดิเคเตอร์ที่เวลา 0, 3, 5, 7, 15, 30, 45 และ 60 วัน

1.2 ผลิตเชื้อสด จากนั้นพ่นบนอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปในอัตราส่วน 0.5:3, 1:3 และ 1.5:3 ปริมาตรต่อน้ำหนักอาหาร บนอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปแล้วผึ่งให้แห้ง จากนั้นเคลือบด้วยน้ำมันถั่วเหลือง อัตราส่วน 10 มิลลิลิตรต่ออาหาร 100 กรัม เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นับปริมาณจุลินทรีย์โดยวิธี spread plate บน MRS agar ที่มีบรอมครีซอลเพอเพิลเป็นอินดิเคเตอร์ที่เวลา 0, 3, 5 และ 7 วัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การทดลองที่ 2 การศึกษาอัตราส่วนของโปรไบโอติกที่เหมาะสมต่อการเพิ่มการเจริญเติบโต และการรอดชีวิตของกุ้งก้ามกราม

2.1 การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design) โดยมี 4 ชุดการทดลอง (Treatment) ในแต่ละชุดการทดลองมี 6 ซ้ำ (Replication) ชุดการทดลองที่ 1 คือ อาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูป ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม (Control) และชุดการทดลองที่ 2-4 คือ อาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติกที่อัตราส่วน 0.5:3, 1:3 และ 1.5:3 (ปริมาตร/น้ำหนักอาหาร) ตามลำดับ

2.2 การเตรียมสัตว์ทดลอง

2.2.1 การเตรียมน้ำที่ใช้ในการทดลอง

นำน้ำประปาที่จะใช้ในการทดลองมาทำการเป่าลมเพื่อไล่คลอรีนให้ระเหยออกไป นาน 3 วัน จากนั้นเติมน้ำใส่ตู้กระจกให้ได้ปริมาตร 70 ลิตร ณ โรงเรือนปิด ให้อากาศโดยใช้ปั๊มลมผ่านหัวทรายตลอดเวลา

2.2.2 การเตรียมสัตว์ทดลอง

การเตรียมกุ้งก้ามกรามที่ใช้ในการทดลองนั้นใช้กุ้งก้ามกรามที่มีสุขภาพสมบูรณ์ คัดขนาดกุ้งที่มีน้ำหนักและความยาวลำตัวให้ใกล้เคียงกัน น้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 12-20 กรัม นำมาพักในถังไฟเบอร์ขนาดความจุ 1 ลูกบาศก์เมตร เพื่อปรับสภาพก่อนเริ่มทำการทดลอง เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปปกติ โดยให้อาหาร 3 ครั้งต่อวัน ในเวลาประมาณ 8.00 น., 12.00 น. และ 17.00 น. ให้อากาศอย่างเพียงพอ เปลี่ยนถ่ายน้ำและดูดตะกอนทุก 3 วัน เมื่อครบ 1 สัปดาห์ นำกุ้งก้ามกรามใส่ในตู้กระจกซึ่งบรรจุน้ำปริมาตร 70 ลิตร จำนวน 24 ตู้ ใส่กุ้งทดลองตู้ละ 4 ตัว ใช้ตาข่ายพลาสติกกั้นให้กุ้งอยู่ช่องละ 1 ตัว โดยเลี้ยงกุ้งเพื่อให้ปรับตัวกับสภาพแวดล้อมก่อนทำการทดลอง 1 สัปดาห์ และให้อากาศตลอดการทดลอง เปลี่ยนถ่ายน้ำทุก 3 วัน ประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ และดูดตะกอนทุกวัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.3 อาหารและการให้อาหาร

อาหารที่ใช้ในการทดลองแบ่งออกเป็น 4 ชุดการทดลอง โดยให้อาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปไม่ผสมโปรไบโอติกเป็นกลุ่มควบคุม (control) และให้อาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติกตามอัตราส่วนที่แตกต่างกันดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 อาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปไม่ผสมโปรไบโอติก (control)

ชุดการทดลองที่ 2 อาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสม *L. plantarum* LP64 อัตราส่วน 0.5:3 (ปริมาตร/น้ำหนักอาหาร)

ชุดการทดลองที่ 3 อาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสม *L. plantarum* LP64 อัตราส่วน 1:3 (ปริมาตร/น้ำหนักอาหาร)

ชุดการทดลองที่ 4 อาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสม *L. plantarum* LP64 อัตราส่วน 1.5:3 (ปริมาตร/น้ำหนักอาหาร)

อาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติกที่ใช้ในการทดลองนั้นพ่นด้วยเชื้อสด *L. plantarum* LP64 บนอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปแล้วผึ่งให้แห้ง จากนั้นเคลือบด้วยน้ำมันถั่วเหลือง อัตราส่วน 10 มิลลิลิตรต่ออาหาร 100 กรัม ส่วนอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปในชุดควบคุมพ่นด้วยอาหารเหลว MRS บนอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปแล้วผึ่งให้แห้ง จากนั้นเคลือบด้วยน้ำมันถั่วเหลือง อัตราส่วน 10 มิลลิลิตรต่ออาหาร 100 กรัม เก็บอาหารทุกชุดการทดลองที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ให้อาหาร 3 ครั้งต่อวัน ในเวลาประมาณ 8.00 น., 12.00 น. และ 17.00 น. (ยกเว้นวันที่ทำการชั่งน้ำหนักจะงดให้อาหาร) ในอัตราร้อยละ 3 ของน้ำหนักตัวกุ้งทั้งหมดต่อวัน ให้อาหารนาน 60 วัน และทำการชั่งน้ำหนักกุ้งเพื่อปรับอาหารทุก 2 สัปดาห์ และเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

2.4 การบันทึกข้อมูล

2.4.1 การเก็บข้อมูลสมรรถภาพการผลิต ทำการเก็บข้อมูลเมื่อสิ้นสุดการทดลอง ดังนี้

2.4.1.1 น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (weight gain, WG)

2.4.1.2 น้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มต่อวัน (average daily gain, ADG)

2.4.1.2 อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนัก (feed conversion ratio, FCR)

2.4.1.3 อัตรารอด (survival rate, SR%)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.4.2 การเก็บข้อมูลคุณภาพน้ำ

2.4.2.1 วัดค่าออกซิเจนละลายน้ำ

2.4.2.2 วัดค่าแอมโมเนีย

2.4.2.3 วัดค่าไนไตรท์

2.4.2.4 วัดค่าความเป็นกรดด่าง

2.4.2.5 อุณหภูมิ

2.4.2.6 ปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมดและแบคทีเรียกรดแลคติก

การทดลองที่ 3 การศึกษาอัตราส่วนและระยะเวลาการให้โปรไบโอติกที่เหมาะสมในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งก้ามกราม

3.1 การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียลในสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in Completely Randomized Design) โดยมี 7 ชุดการทดลอง (Treatment) ในแต่ละชุดการทดลองมี 6 ซ้ำ (Replication) โดยแต่ละชุดการทดลองให้อาหารที่อัตราส่วนและระยะเวลาที่แตกต่างกัน

3.2 การเตรียมสัตว์ทดลอง

3.2.1 การเตรียมน้ำที่ใช้ในการทดลอง

นำน้ำประปาที่จะใช้ในการทดลองมาทำการเป่าลมเพื่อไล่คลอรีนให้ระเหยออกไป นาน 3 วัน จากนั้นเติมน้ำใส่ตู้กระจกให้ได้ปริมาตร 70 ลิตร ณ โรงเรือนปิด ให้อากาศโดยใช้ปั๊มลมผ่านหัวทรายตลอดเวลา

3.2.2 การเตรียมสัตว์ทดลอง

การเตรียมกุ้งก้ามกรามที่ใช้ในการทดลองนั้นใช้กุ้งก้ามกรามที่มีสุขภาพสมบูรณ์ คัดขนาดกุ้งที่มีน้ำหนักและความยาวลำตัวให้ใกล้เคียงกัน โดยมีน้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 12-20 กรัม นำมาพักในถังไฟเบอร์ขนาดความจุ 1 ลูกบาศก์เมตร เพื่อปรับสภาพก่อนเริ่มทำการทดลอง เลี้ยงด้วยอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปปกติ โดยให้อาหาร 3 ครั้งต่อวัน ในเวลาประมาณ 8.00 น., 12.00

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

น. และ 17.00 น. ให้อากาศอย่างเพียงพอ เปลี่ยนถ่ายน้ำและดูดตะกอนทุก 3 วัน เมื่อครบ 1 สัปดาห์ นำกุ้งก้ามกรามใส่ในตู้กระจกซึ่งบรรจุน้ำปริมาตร 70 ลิตร จำนวน 48 ตู้ ใส่กุ้งทดลองตู้ละ 4 ตัว ใช้ตาข่ายพลาสติกกั้นให้กุ้งอยู่ช่องละ 1 ตัว โดยเลี้ยงกุ้งให้ปรับตัวกับสภาพแวดล้อมก่อนทำการทดลอง 1 สัปดาห์ และให้อากาศตลอดการทดลอง เปลี่ยนถ่ายน้ำทุก 3 วัน ประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ และดูดตะกอนทุกวัน

3.3 อาหารและการให้อาหาร

อาหารที่ใช้ในการทดลองแบ่งออกเป็น 3 ชุดการทดลอง โดยให้อาหารดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 อาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปไม่ผสมโปรไบโอติก (control) ทุกวัน
ชุดการทดลองที่ 2 อาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสม *L. plantarum* LP64 ทุกวัน
ชุดการทดลองที่ 3 อาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสม *L. plantarum* LP64 วันเว้นวัน

อาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติกที่ใช้ในการทดลองนั้นพ่นด้วยเชื้อสด *L. plantarum* LP64 บนอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปแล้วผึ่งให้แห้ง จากนั้นเคลือบด้วยน้ำมันถั่วเหลือง อัตราส่วน 10 มิลลิลิตรต่ออาหาร 100 กรัม ส่วนอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปในชุดควบคุมพ่นด้วยอาหารเหลว MRS บนอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปแล้วผึ่งให้แห้ง จากนั้นเคลือบด้วยน้ำมันถั่วเหลือง อัตราส่วน 10 มิลลิลิตรต่ออาหาร 100 กรัม เก็บอาหารทุกชุดการทดลองที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ให้อาหาร 3 ครั้งต่อวัน ในเวลาประมาณ 8.00 น., 12.00 น. และ 17.00 น. (ยกเว้นวันที่ทำการชั่งน้ำหนักจะงดให้อาหาร) ในอัตราร้อยละ 3 ของน้ำหนักตัวกุ้งทั้งหมดต่อวัน ให้อาหารนาน 60 วัน และทำการชั่งน้ำหนักกุ้งเพื่อปรับอาหารทุก 2 สัปดาห์ และเมื่อสิ้นสุดการทดลองก่อนทำการเก็บเลือดเพื่อศึกษาการระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งก้ามกราม

3.4 การศึกษาระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งก้ามกราม

หลังจากเลี้ยงและให้อาหารทดลองนาน 60 วัน ทำการสุ่มกุ้งในแต่ละชุดการทดลองๆละ 3 ตัว เจาะเลือดบริเวณแอ่งเลือดที่อยู่ระหว่างรอยต่อของหัวกับอก (ventral sinus) ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ด้วยหลอดฉีดยาขนาด 3 มิลลิลิตร ที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (10% sodium citrate in RPMI) ในอัตราส่วน 1:1 นำเลือดที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณเม็ดเลือดรวม กิจกรรมของเอนไซม์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ฟีนอลออกซิเดส กิจกรรมของเม็ดเลือดในการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือด ตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

3.4.1 การวิเคราะห์ปริมาณเม็ดเลือดรวม (total hemocyte count : THC)

ผสมตัวอย่างเลือดปริมาตร 100 ไมโครลิตร เข้ากับสารละลายทริปเปนบลู ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้นาน 15-20 นาที จากนั้นหยดลงบน hemocytometer เพื่อนับปริมาณเม็ดเลือดรวม และนำไปคำนวณปริมาณเม็ดเลือดรวมเป็นจำนวนเซลล์/ลบ.มล. ดังรายละเอียดในภาคผนวก

3.4.2 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase) (ดัดแปลงจากวิธีของ Encarnacion *et al*., 2010)

3.4.2.1 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในเลือด

ผสมตัวอย่างเลือดปริมาตร 300 ไมโครลิตร เข้ากับสารละลาย L-DOPA (L-dihydroxyphenylalanine) ความเข้มข้น 1.6 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 300 ไมโครลิตร และสารละลาย HEPES ปริมาตร 570 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยมีน้ำกลั่นบริสุทธิ์ผสมกับสารละลาย L-DOPA และสารละลาย HEPES เป็น blank คำนวณหาปริมาณของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส โดยที่ปริมาณเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส 1 หน่วย คือค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ที่เปลี่ยนแปลงไป 0.001 ในหนึ่งนาที ดังรายละเอียดในภาคผนวก

3.4.2.2 การวิเคราะห์โปรตีนในเลือด

ผสมตัวอย่างเลือดปริมาตร 50 ไมโครลิตร เข้ากับน้ำกลั่นปริมาตร 450 ไมโครลิตร และSolution I ปริมาตร 2,000 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที จากนั้นเติม Solution II (Folin 1:10) ปริมาตร 3,000 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นบริสุทธิ์เป็น blank

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.4.3 ศึกษากิจกรรมของเม็ดเลือดในการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม (ดัดแปลงจากวิธีของ Itami *et al*., 1994)

เหวี่ยงตัวอย่างเลือดกุ้งให้ตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 6,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นดูดของเหลวด้านบนทิ้ง แล้วเติม shrimp saline ปั่นล้างที่ 6,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที 2 ครั้ง ละลายตะกอนใน shrimp saline 1 มิลลิลิตร ให้สารละลายเข้ากัน นำสารแขวนลอยเซลล์ปริมาตร 200 ไมโครลิตรเลี้ยงบน cover slip ทิ้งไว้ 20 นาที ล้างด้วย shrimp saline 3 ครั้ง จากนั้นเติมสารแขวนลอยยีสต์ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ซึ่งยีสต์จะเป็นเสมือนสิ่งแปลกปลอม ทำให้เกิดกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเซลล์เม็ดเลือด เลี้ยงเซลล์นาน 2 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย shrimp saline 5 ครั้ง จากนั้น fix เซลล์ด้วยเมทานอลนาน 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ทิ้งให้แห้ง 20-60 นาที ย้อมสีเซลล์ด้วยสี Giemsa นาน 10 นาที แล้วล้างสีออกด้วยน้ำกลั่น ทิ้งไว้ให้แห้ง ตรวจดูผลและนับจำนวนเม็ดเลือดรวมทั้งหมด และเม็ดเลือดที่มีการกลืนกินเซลล์ยีสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นำข้อมูลที่ได้หาค่า Percent phagocytosis ดังรายละเอียดในภาคผนวก

3.4.4 ศึกษากิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือด (bactericidal activity) (ดัดแปลงจากวิธีของ Adams, 1991)

เหวี่ยงตัวอย่างเลือดกุ้งให้ตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 6,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นดูดซีรัม (ของเหลวด้านบน) เจือจางด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 2.6 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 และ 1:32 โดยปรับปริมาตรการเจือจางให้ได้หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร โดยเตรียมแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* บริสุทธิ์ที่เลี้ยงในอาหาร TSB ร่วมกับโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ เหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำเชื้อที่ได้มาละลายในโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร ให้ได้ค่าประมาณ 0.1-0.15 (ประมาณ 10^7-10^8 CFU/ml) จากนั้นนำมาเติมในซีรัมแต่ละความเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 3 ชั่วโมง จากนั้นนับปริมาณแบคทีเรียที่เกิดจากกิจกรรมในการทำลายแบคทีเรียของซีรัม โดยวิธี spread plate ใน TCBS agar บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 48 ชั่วโมง และบันทึกค่าของการเจือจางซีรัมที่สามารถลดปริมาณแบคทีเรียได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 3 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.5 การบันทึกข้อมูล

3.5.1 การเก็บข้อมูลระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งก้ามกราม ทำการเก็บข้อมูลเมื่อสิ้นสุดการทดลอง ดังนี้

3.5.1.1 ปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมด (total hemocyte count : THC)

3.5.1.2 กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase)

3.5.1.3 กิจกรรมของเม็ดเลือดในการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม

3.5.1.4 กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือด (bactericidal activity)

การทดลองที่ 4 การศึกษาผลของโปรไบโอติกต่อปริมาณ *Vibrio* spp. และ Total Lactic Acid Bacteria ในทางเดินอาหารของกุ้งก้ามกราม

หลังจากเลี้ยงและให้อาหารนาน 60 วัน นำกุ้งจากการทดลองที่ 3 ทำการสุ่มกุ้งในแต่ละชุดการทดลองๆละ 3 ตัว ผ่าหลังเพื่อเก็บลำไส้กุ้งวิเคราะห์หาปริมาณแบคทีเรีย *Vibiro* spp. และ Total Lactic Acid Bacteria ทั้งหมดในลำไส้ และตรวจดูจุลินทรีย์โดยส่องภายใต้กล้อง Scanning Electron Microscope (SEM) เพื่อประเมินการดำรงอยู่ของจุลินทรีย์ภายในลำไส้กุ้ง

4.1 การศึกษาปริมาณ *Vibiro* spp. ทั้งหมดในลำไส้

ผ่าหลังกุ้งเพื่อเก็บลำไส้กุ้งมาชั่งน้ำหนัก เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร แล้วบดให้ละเอียดด้วย Homogenizer จากนั้นนับปริมาณ *Vibiro* spp. ในลำไส้กุ้งโดยวิธี spread plate บน TCBS agar บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 48 ชั่วโมง

4.2 การศึกษาปริมาณ Total Lactic Acid Bacteria ทั้งหมดในลำไส้

นำสารละลายที่ได้จากข้อ 4.1 นับปริมาณ Total Lactic Acid Bacteria ในลำไส้กุ้งโดยวิธี spread plate บน MRS agar ที่มีบรอมครีซอลเพอเพิลเป็นอินดิเคเตอร์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4.3 การตรวจสอบจุลินทรีย์โดยส่องภายใต้กล้อง Scanning Electron Microscope (SEM)

นำลำไส้กุ้งของชุดการทดลองที่มีผลการทดลองที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 4.1 และ 4.2 มาตรวจหาจุลินทรีย์ภายในลำไส้โดยส่องภายใต้กล้อง Scanning Electron Microscope (SEM) เพื่อประเมินการดำรงอยู่ของจุลินทรีย์ภายในลำไส้กุ้งก้ามกราม

5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ความแตกต่างของชุดการทดลองของข้อมูลน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น น้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มต่อวัน อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนัก และอัตรารอด โดยการวิเคราะห์แบบแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design) วิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของกลุ่มทดลองโดยวิธี Duncan's new multiple range test ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ SAS

การวิเคราะห์ความแตกต่างของชุดการทดลองของข้อมูลปริมาณเม็ดเลือดรวม กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส กิจกรรมของเม็ดเลือดในการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม ปริมาณ *Vibiro* spp. และปริมาณ Total Lactic Acid Bacteria ทั้งหมดในลำไส้ โดยการวิเคราะห์แบบแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียลในสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in Completely Randomized Design) วิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของกลุ่มทดลองโดยวิธี Duncan's new multiple range test ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ SAS

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลและวิจารณ์

การทดลองที่ 1 การศึกษาการรอดชีวิต (viability) ของโปรไบโอติกในรูปของเชื้อสดและอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติก

จากผลการศึกษาการรอดชีวิตของ *L. plantarum* LP64 ในรูปของเชื้อสดโดยเปรียบเทียบการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ 37 องศาเซลเซียส พบว่า มีปริมาณเชื้อสดเริ่มต้นเท่ากับ 3.60×10^{8} CFU/ml เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน ปริมาณเชื้อลดลงเหลือ 1.18×10^{8} CFU/ml เก็บนาน 15 วัน มีปริมาณเชื้อ 1.38×10^{7} CFU/ml และเมื่อครบ 60 วัน มีปริมาณเชื้อ 2.73×10^{5} CFU/ml ส่วนการเก็บรักษาเชื้อสดที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน ปริมาณเชื้อลดลงเหลือ 1.61×10^{8} CFU/ml เก็บนาน 15 วัน มีปริมาณเชื้อ 5.70×10^{6} CFU/ml เมื่อครบ 60 วัน ไม่พบว่ามีปริมาณเชื้อมีชีวิตหลงเหลืออยู่ ดังตารางที่ 6

จากผลการศึกษาข้างต้นแสดงให้เห็นว่าการเก็บรักษาเชื้อนาน 30 วัน จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น 3.60×10^{8} CFU/ml เมื่อเก็บเชื้อที่อุณหภูมิต่ำคือ 4 องศาเซลเซียส ปริมาณเชื้อเหลือ 3.95×10^{7} CFU/ml แต่เมื่อเก็บรักษาเชื้อที่อุณหภูมิสูงคือ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณเชื้อลดลงเหลือเพียง 3.77×10^{5} CFU/ml พบว่า การเก็บรักษาเชื้อสดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 วัน นั้นมีปริมาณเพียงพอต่อการผลิตอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติก ซึ่งจะมีการสูญเสียเชื้อไประหว่างการผลิตประมาณ 1-2 log CFU/g

วิธีที่นิยมในการเก็บรักษาแบคทีเรียกรดแลคติกในรูปเชื้อสดคือ การแยกเซลล์ออกจากน้ำหมัก หรืออาหารเลี้ยงเชื้อ โดยวิธีการหมุนเหวี่ยงซึ่งจะอาศัยหลักการเซดิเมนต์ (sedimentation) ภายใต้แรงเหวี่ยงหรือแรงหนีศูนย์กลาง สารที่มีความหนาแน่นหรือขนาดโมเลกุลใหญ่จะตกตะกอนก่อน (อาภัสสรา, 2537) จากนั้นนำเซลล์ที่เก็บเกี่ยวได้แขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่หรือสารละลายอื่นๆที่เหมาะสม ซึ่งวิธีนี้เป็นการช่วยลดความเป็นกรดที่เกิดจากกิจกรรมของเซลล์ในระบบ (Foster, 1962) ซึ่งการเก็บเกี่ยวเซลล์นั้นจะทำในการเจริญเติบโตช่วง stationary phase ซึ่งมีปริมาณเชื้อสูงคงที่และมีการรอดชีวิตสูงตลอดการเก็บรักษา (Iijima and Sakane, 1973; Morice *et al*., 1992) สอดคล้องกับ Brashears *et al*. (1995) กล่าวว่า การเก็บเกี่ยวเซลล์ในการเจริญเติบโตช่วง stationary phase จะมีปริมาณเชื้อลดลงน้อยกว่าการเก็บเกี่ยวเซลล์ในการเจริญเติบโตช่วง logarithmic phase

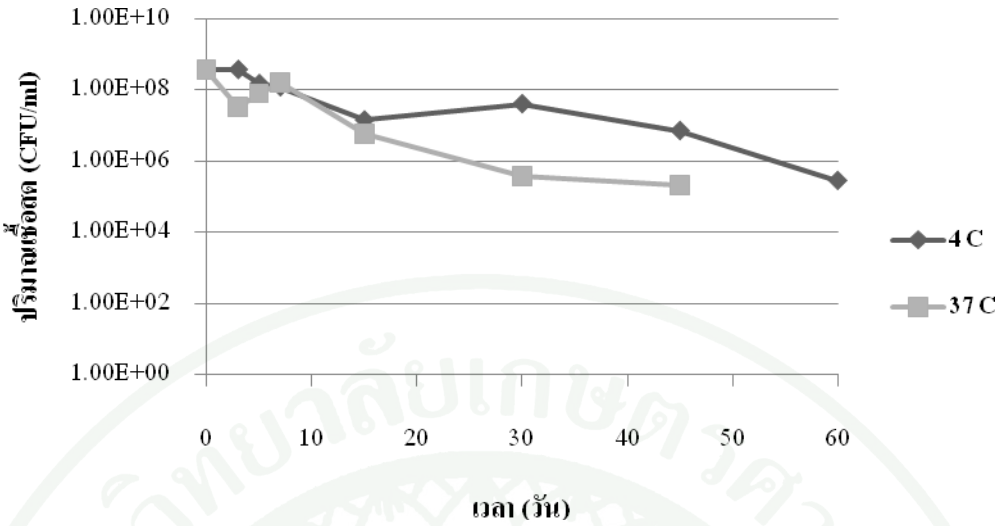
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การเก็บรักษาเชื้อสดที่อุณหภูมิต่ำสามารถเก็บรักษาเชื้อได้ดีกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (สายชล, 2520) เนื่องจากแบคทีเรียกรดแลคติกเมื่อเจริญเติบโตจะผลิตกรดแลคติก ซึ่งทำให้ระบบมีความเป็นกรดสูงขึ้นซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์ การเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำเชื้อจะเจริญเติบโตช้าลงหรือหยุดชะงักทำให้มีการผลิตกรดแลคติกลดลง และลดอัตราการตายของเชื้อ แต่การเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องหรืออุณหภูมิสูงเชื้อจะตายอย่างรวดเร็ว เนื่องจากมีการเจริญเติบโตและผลิตกรดแลคติกตลอดเวลา (Hammer and Babel, 1943) ดังนั้นการผลิตเชื้อสดและแขวนลอยเซลล์ในอาหารเหลว MRS เพื่อเก็บเป็น stock เชื้อสำหรับใช้ผสมอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปควรเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ เนื่องจากสามารถเก็บได้นานกว่าที่อุณหภูมิสูง ลดอัตราการตายของเชื้อ ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายในการผลิตเชื้อ (Lapage, 1970; Baati *et al*., 2000; Fonseca *et al*., 2001)

ตารางที่ 6 การรอดชีวิต (viability) ของ *Lactobacillus plantarum* LP64 ในรูปของเชื้อสดเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ 37 องศาเซลเซียส (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

เวลา (วัน)	ปริมาณ *Lactobacillus plantarum* LP64 (CFU/ml)		
	4 °C	37 °C	P-Value
0	$3.60\pm0.11\times10^{8}$	$3.60\pm0.11\times10^{8}$	1.0000
3	$3.62\pm0.29\times10^{8}$	$3.33\pm0.33\times10^{7}$	0.0001
5	$1.46\pm0.26\times10^{8}$	$7.83\pm1.42\times10^{7}$	0.0157
7	$1.18\pm0.14\times10^{8}$	$1.61\pm0.33\times10^{8}$	0.1051
15	$1.38\pm0.12\times10^{7}$	$5.70\pm0.46\times10^{6}$	0.0001
30	$3.95\pm0.10\times10^{7}$	$3.77\pm0.07\times10^{5}$	0.0001
45	$6.93\pm1.88\times10^{6}$	$2.10\pm0.53\times10^{5}$	0.0001
60	$2.73\pm0.31\times10^{5}$	0	0.0001

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 7 การรอดชีวิต (viability) ของ *Lactobacillus plantarum* LP64 ในรูปของเชื้อสด เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ 37 องศาเซลเซียส

การศึกษาอุณหภูมิที่มีผลต่อการเก็บรักษาเชื้อสดนั้นนำไปสู่การศึกษาการรอดชีวิตและอายุการเก็บรักษาอาหารเสริมโปรไบโอติก โดยผลิตเชื้อสดและแขวนลอยเซลล์ในอาหารเหลว MRS จากนั้นพ่นลงบนอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปและพ่นเคลือบด้วยน้ำมันถั่วเหลืองเพื่อให้โปรไบโอติกเกาะอยู่ในอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูป จากนั้นเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตรวจสอบปริมาณเชื้อ *L. plantarum* LP64 บน MRS agar ที่เวลา 0, 3, 5 และ 7 วัน พบว่า เมื่อเก็บรักษาอาหารเสริมโปรไบโอติกที่อุณหภูมิต่ำคือ 4 องศาเซลเซียส อาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติกอัตราส่วน 0.5:3 (ปริมาตร/น้ำหนักอาหาร) มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 3.73×10^{7} CFU/g เมื่อเก็บรักษานาน 3 วัน และ 7 วัน มีปริมาณเชื้อเหลือ 3.20×10^{6} CFU/g และ 7.70×10^{4} CFU/g ตามลำดับ อาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติกอัตราส่วน 1.0:3 (ปริมาตร/น้ำหนักอาหาร) มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 4.37×10^{7}CFU/g เมื่อเก็บรักษานาน 3 วัน และ 7 วัน มีปริมาณเชื้อเหลือ 3.56×10^{7} CFU/g และ 8.10×10^{5} CFU/g ตามลำดับ และอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติกอัตราส่วน 1.5:3 (ปริมาตร/น้ำหนักอาหาร) มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5.60×10^{7} CFU/g เมื่อเก็บรักษานาน 3 วัน และ 7 วัน มีปริมาณเชื้อเหลือ 4.16×10^{7} CFU/g และ 3.23×10^{6} CFU/g ตามลำดับ

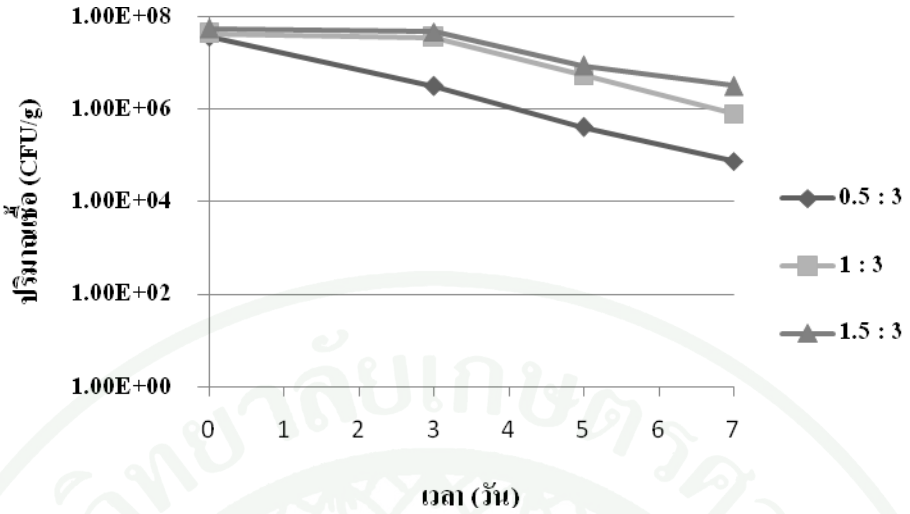
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ระยะเวลาเหมาะสมในการเปลี่ยนอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติกใหม่ทั้งสามสูตรคือ 3 วัน (ตารางที่ 7) เนื่องจากมีปริมาณเชื้อ *L. plantarum* LP64 ในปริมาณที่เพียงพอในการใช้เป็นอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปเสริมโปรไบโอติกเพื่อการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามคือ มีปริมาณ 10^6-10^7 CFU/g และสูงเกินเกณฑ์มาตรฐานตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ พ.ศ. 2539 ซึ่งกำหนดให้ชีวภัณฑ์ซึ่งมีชื่อทางวิชาการอาหารสัตว์ว่า สารเสริมชีวนะที่เติมในอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปเพื่อขายได้ในอัตราส่วนไม่น้อยกว่า 1×10^5 CFU ต่ออาหารสัตว์หนึ่งกิโลกรัม หรือปริมาณของโปรไบโอติกที่เติมในอาหารสัตว์สำเร็จรูปซึ่งมีปริมาณเหมาะสมต่อสมดุลของโปรไบโอติกและจุลินทรีย์ประจำถิ่นคือ 10^6-10^7 CFU/g (Guillot, 1998)

ตารางที่ 7 การรอดชีวิต (viability) ของ *Lactobacillus plantarum* LP64 ในรูปอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติกที่อัตราส่วนต่างๆกัน เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

เวลา (วัน)	อัตราส่วนของโปรไบโอติกต่ออาหาร (CFU/g)			
	0.5:3	1:3	1.5:3	P-Value
0	$3.73\pm0.95\times10^7$	$4.37\pm1.36\times10^7$	$5.60\pm1.10\times10^7$	0.210
3	$3.2\pm0.26\times10^6$	$3.56\pm0.51\times10^7$	$4.16\pm0.06\times10^7$	0.001
5	$4.17\pm0.32\times10^5$	$5.43\pm0.55\times10^6$	$8.77\pm0.55\times10^6$	0.001
7	$7.70\pm0.30\times10^4$	$8.10\pm0.75\times10^5$	$3.23\pm0.25\times10^6$	0.001

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 8 การรอดชีวิต (viability) ของ *Lactobacillus plantarum* LP64 ในรูปอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติกที่อัตราส่วนต่างๆกัน เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การทดลองที่ 2 การศึกษาอัตราส่วนของโปรไบโอติกที่เหมาะสมต่อการเพิ่มการเจริญเติบโต และการรอดชีวิตของกุ้งก้ามกราม

2.1 สมรรถภาพการผลิต

เมื่อให้อาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติกที่มีอัตราส่วนต่างๆครบ 60 วัน พบว่า กุ้งก้ามกรามที่ได้รับอาหารกลุ่มควบคุมและอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติกทั้ง 3 กลุ่ม มีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น น้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มต่อวัน อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนัก และอัตรารอด แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) อย่างไรก็ตามกุ้งก้ามกรามที่ได้รับอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติกทั้ง 3 กลุ่ม มีการเจริญเติบโตและอัตรารอดสูงกว่ากลุ่มควบคุม โดยกุ้งก้ามกรามที่ได้รับอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติกที่อัตราส่วน 1:3 (ปริมาตร/น้ำหนักอาหาร) มีแนวโน้มการเจริญเติบโตและอัตรารอดสูงสุด (ตารางที่ 8) ซึ่งสอดคล้องกับ Vieira *et al*. (2010) รายงานว่า กุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปผสม *Lactobacillus plantarum* นาน 60 วัน มีการเจริญเติบโต และอัตรารอดแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) เช่นเดียวกับการให้อาหารกุ้งกุลาดำผสม *Bacillus* สายพันธุ์ S11 ในกุ้งกุลาดำระยะวัยรุ่น นาน 90 วัน พบว่า น้ำหนักกุ้งกุลาดำและอัตรารอดของกุ้งกลุ่มที่ได้รับโปรไบโอติกสูงกว่ากลุ่มควบคุมไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) (สมบัติ, 2542) ในขณะที่ Phianphak

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

et al. (1999) เสริมโปรไบโอติก *Lactobacillus* spp. 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1338, *L. bulgaricus* TISTR 1339, *L. casei* TISTR 1340, *L. casei* subsp. *tolerans* TISTR 1341 และ *L. jensenii* TISTR 134 ในอาหารกุ้งสำเร็จรูป เลี้ยงกุ้งกุลาดำนาน 100 วัน พบว่า กุ้งที่ได้รับอาหารเสริมโปรไบโอติกทุกกลุ่มทดลองมีการเจริญเติบโตและอัตรารอดสูงกว่ากุ้งกุลาดำในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

เนื่องจากการทดลองครั้งนี้ใช้ตาข่ายพลาสติกกั้นให้กุ้งอยู่ช่องละ 1 ตัว เพื่อป้องกันการกินกันเองขณะลอกคราบของกุ้ง (ยนต์, 2529; โชคชัย, 2548) จึงลดการตายของกุ้งก้ามกรามเนื่องจากการเลี้ยงกุ้งในตู้กระจกจะไม่มีที่หลบซ่อน ทำให้กุ้งกินกันขณะลอกคราบ อัตราการรอดของกุ้งก้ามกรามทุกกลุ่มการทดลองจึงสูงและมีค่าใกล้เคียงกัน ส่วนอัตรารอดของกุ้งก้ามกรามในการศึกษาครั้งนี้ พบว่า กลุ่มที่ได้รับโปรไบโอติกทุกกลุ่มมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

ตารางที่ 8 สมรรถภาพการผลิตของกุ้งก้ามกรามที่ได้รับด้วยอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติกที่อัตราส่วนต่างๆ กันเป็นระยะเวลา 60 วัน (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

สมรรถภาพการผลิต	อัตราส่วนของโปรไบโอติกต่ออาหาร (ปริมาตร/น้ำหนัก)				
	0	0.5 : 3	1 : 3	1.5 : 3	P-Value
น้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้น (กรัม/ตัว)	15.13±2.78	15.13±2.90	15.19±3.05	15.22±3.30	0.9999
น้ำหนักเฉลี่ยเมื่อสิ้นสุด (กรัม/ตัว)	19.56±2.25	19.75±1.93	20.80±5.31	20.63±3.97	0.9233
น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (กรัม/ตัว)	4.43±1.97	4.62±1.97	5.61±3.82	5.41±3.43	0.8671
น้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มต่อวัน (กรัม/ตัว/วัน)	0.074±0.033	0.077±0.030	0.093±0.064	0.090±0.057	0.8655
อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนัก	3.25±1.52	2.83±0.83	2.86±1.81	2.95±1.39	0.9550
อัตรารอด (เปอร์เซ็นต์)	95.83±12.57	100.00±0	100.00±0	100.00±0	0.4133

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.2 คุณภาพน้ำ

2.2.1 ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ

ตู้เลี้ยงกุ้งก้ามกรามที่ได้รับอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติก และกลุ่มควบคุม มีปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำเฉลี่ยอยู่ในช่วง 2.58-7.56 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 9) และมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.92 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยปริมาณออกซิเจนละลายน้ำในตู้เลี้ยงทดลองทุกกลุ่มการทดลองอยู่ ในช่วงใกล้เคียงกันและอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน ปริมาณออกซิเจนละลายอยู่ในน้ำอยู่ในเกณฑ์คุณภาพน้ำที่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของสัตว์น้ำ ซึ่งมีค่าออกซิเจนละลายน้ำอยู่ในน้ำมากกว่า 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (กรมประมง, ม.ม.ป.) Boyd (1982) กล่าวว่า ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำที่เหมาะสมคือ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร หากปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำต่ำกว่า 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สัตว์น้ำอาจตายได้ถ้าเกิดขึ้นนานหลายชั่วโมง ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำช่วง 1-5 มิลลิกรัมต่อลิตร สัตว์น้ำจะมีชีวิตอยู่ได้ แต่หากเกิดขึ้นต่อเนื่องจะทำให้เจริญเติบโตช้าและไม่สามารถขยายพันธุ์ได้ดี และปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำมากกว่า 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นปริมาณที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการขยายพันธุ์ (มั่นสิน, 2540)

2.2.2 แอมโมเนีย

ตู้เลี้ยงกุ้งก้ามกรามที่ได้รับอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติก และกลุ่มควบคุม มีปริมาณแอมโมเนียในน้ำเฉลี่ยอยู่ในช่วง 0-0.97 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 9) และมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.10 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยปริมาณแอมโมเนียในน้ำตู้เลี้ยงทดลองของทุกกลุ่มการทดลองอยู่ในช่วงใกล้เคียงกันและอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน ซึ่งปริมาณแอมโมเนียที่ได้จากการทดลองอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานที่ไม่เป็นอันตรายต่อสัตว์น้ำคือ ไม่เกิน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (โชคชัย, 2548)

2.2.3 ไนไตรท์

ตู้เลี้ยงกุ้งก้ามกรามที่ได้รับอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติก และกลุ่มควบคุม มีปริมาณไนไตรท์ในน้ำเฉลี่ยอยู่ในช่วง 0-0.45 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 9) และมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.10 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งปริมาณไนไตรท์ที่ได้จากการทดลองอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โดยเกณฑ์มาตรฐานของไนไตรท์ที่ไม่เป็นอันตรายต่อสัตว์น้ำคือ ไม่เกิน 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (โชคชัย, 2548)

2.2.4 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)

ตู้เลี้ยงกุ้งก้ามกรามที่ได้รับอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติก และกลุ่มควบคุม มีค่าความเป็นกรด-ด่างในน้ำเฉลี่ยอยู่ในช่วง 7.16-7.88 (ตารางที่ 9) และมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 7.37 โดยค่าความเป็นกรด-ด่างในน้ำตู้เลี้ยงทดลองทุกกลุ่มการทดลองอยู่ในช่วงใกล้เคียงกันกันและอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน ซึ่งค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของกุ้งก้ามกรามมีค่าอยู่ในช่วง 6.5-8.9 ถ้ามีค่าต่ำกว่า 4 จะทำให้กุ้งตายได้ (ชูศักดิ์, 2544) ค่าความเป็นกรด-ด่างนั้นมีความสำคัญมาก เนื่องจากมีผลโดยตรงต่อการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำ หากค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำกว่า 4 และสูงกว่า 11 จะทำให้สัตว์น้ำตาย ค่าความเป็นกรด-ด่างช่วง 4-6 และ 9.5-11 สัตว์น้ำจะไม่มีการสืบพันธุ์ เจริญเติบโตช้า สอดคล้องกับกรมประมง (ม.ม.ป.) กล่าวว่า เกณฑ์คุณภาพน้ำที่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของสัตว์น้ำ ค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง 5-9

2.2.5 อุณหภูมิของน้ำ

ตู้เลี้ยงกุ้งก้ามกรามที่ได้รับอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติก และกลุ่มควบคุม มีอุณหภูมิของน้ำเฉลี่ยอยู่ในช่วง 23.4-28.0 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 9) และมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 25.4 องศาเซลเซียส โดยอุณหภูมิของน้ำตู้เลี้ยงทดลองทุกกลุ่มการทดลองอยู่ในช่วงใกล้เคียงกันและอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน กรมประมง (ม.ม.ป.) กล่าวว่า เกณฑ์คุณภาพน้ำที่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของสัตว์น้ำ มีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 23-32 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเลี้ยงกุ้งอยู่ในช่วง 25-30 องศาเซลเซียส เมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 30 องศาเซลเซียส จะทำให้กุ้งกินอาหารลดลง (ชะลอ, 2534)

สามารถสรุปได้ว่าการผสมโปรไบโอติกในอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปในอัตราการส่วน 0.5:3, 1.5:3 และ 1.5:3 ปริมาตร/น้ำหนักอาหาร มีผลต่อค่าพารามิเตอร์ที่บ่งบอกถึงคุณภาพ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ของน้ำ ได้แก่ ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ ปริมาณแอมโมเนีย ปริมาณไนไตรท์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิ มีค่าอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานทั้งหมด

ตารางที่ 9 ปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำ แอมโมเนีย ไนไตรท์ ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำ และอุณหภูมิเฉลี่ยตลอดระยะเวลาการเลี้ยง 60 วัน (ค่าต่ำสุด - ค่าสูงสุด)

คุณภาพน้ำ	อัตราส่วนของโปรไบโอติกต่ออาหาร (ปริมาตร/น้ำหนัก)			
	กลุ่มควบคุม	0.5:3	1:3	1.5:3
ออกซิเจนที่ละลายน้ำ (มก./ล.)	3.06 - 7.56	2.58 - 7.36	3.37 - 7.34	3.48 - 7.27
แอมโมเนีย (มก./ล.)	0 - 0.56	0 - 0.41	0 - 0.46	0 - 0.97
ไนไตรท์ (มก./ล.)	0 - 0.45	0 - 0.44	0.01 - 0.44	0 - 0.36
ความเป็นกรด-ด่าง	7.18 - 7.53	7.17 - 7.88	7.17 - 7.82	7.16 - 7.80
อุณหภูมิของน้ำ(^{0}ซ)	23.4 - 27.8	23.5 - 27.8	23.6 - 28.0	23.4 - 27.6

2.2.6 จำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมด

จากการเก็บตัวอย่างน้ำในตู้เลี้ยงทดลองมาตรวจปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมดโดยวิธี spread plate บน PCA agar และตรวจปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกโดยวิธี spread plate บน MRS agar ที่มีบรอมครีซอลเพอเพิลเป็นอินดิเคเตอร์ กุ้งก้ามกรามที่ได้รับอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติกและกลุ่มควบคุมในตู้เลี้ยงทดลอง มีจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมด อยู่ในช่วง 4.90×10^7–2.96×10^9 CFU/ml (ตารางที่ 10) และปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมดคงที่ตลอดการทดลอง เนื่องจากมีการดูดตะกอนออกทุกวันและเปลี่ยนน้ำทุก 3 วัน จึงไม่เกิดการสะสมของสารอินทรีย์ซึ่งเกิดจากอาหารกุ้งและของเสียจากการขับถ่ายของกุ้ง ส่วนการตรวจปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกในน้ำตรวจไม่พบแบคทีเรียกรดแลคติกเลย สอดคล้องกับ Ringo and Gatesoupe (1998) รายงานว่า โดยปกติมักไม่พบแบคทีเรียกรดแลคติกในน้ำ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 10 ปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมดในน้ำเฉลี่ยตลอดระยะเวลาการเลี้ยง 60 วัน (ค่าต่ำสุด - ค่าสูงสุด)

อัตราส่วนของโปรไบโอติกต่ออาหาร	PCA (CFU/ml)	MRS (CFU/ml)
กลุ่มควบคุม	1.98×10^{9} - 2.96×10^{9}	-
0.5 : 3	4.90×10^{7} – 8.30×10^{7}	-
1 : 3	4.37×10^{8} – 7.97×10^{8}	-
1.5 : 3	4.53×10^{8} – 9.20×10^{8}	-

การทอดลองที่ 3 อัตราส่วนและระยะเวลาการให้โปรไบโอติกที่เหมาะสมในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งก้ามกราม

การศึกษาการเสริมโปรไบโอติกในอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปที่อัตราส่วนต่างๆกัน 3 ระดับ ได้แก่ อาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสม *L. plantarum* LP64 อัตราส่วน 0.5:3, 1:3 และ1.5:3 (ปริมาตร/น้ำหนักอาหาร) และกลุ่มควบคุม นาน 60 วัน เพื่อศึกษาการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งก้ามกราม กิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ ปริมาณเม็ดเลือดรวม กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส กิจกรรมของเม็ดเลือดในการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม และกิจกรรมในการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือด ทำการดูดเลือดจากกุ้งก้ามกรามเพื่อวิเคราะห์กิจกรรมต่างๆ ทางระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งก้ามกรามได้ผลดังนี้

3.1 การศึกษาปริมาณเม็ดเลือดรวม (total hemocyte count : THC)

จากการทดลองพบว่าปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งก้ามกรามที่ได้รับอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสม *L. plantarum* LP64 อัตราส่วน 1.5:3 (ปริมาตร/น้ำหนักอาหาร) ทุกวัน มีค่าเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ $108.33\pm7.64\times10^{5}$ เซลล์/มิลลิลิตร ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$) กับกลุ่มการทดลองอื่นๆ ปริมาณเม็ดเลือดรวมจะแปรผันตามอัตราส่วนและระยะเวลาการให้โปรไบโอติก กล่าวคือ กุ้งที่ได้รับอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติกมีปริมาณเม็ดเลือดรวมสูงมากขึ้นตามอัตราส่วนของโปรไบโอติกที่ผสมในอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปและระยะเวลาการให้โปรไบโอติก ดังแสดงในตารางที่ 11 และภาพที่ 9 นิตยา (2549) กล่าวว่า กุ้งที่ได้รับโปรไบโอติกทุกวันมีปริมาณเม็ดเลือดรวมสูงกว่ากุ้งที่ได้รับโปรไบโอติกวันเว้นวันและกลุ่มควบคุมโดยแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เช่นเดียวกับทิพรัตน์และกิจการ (2548) พบว่า กุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหาร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

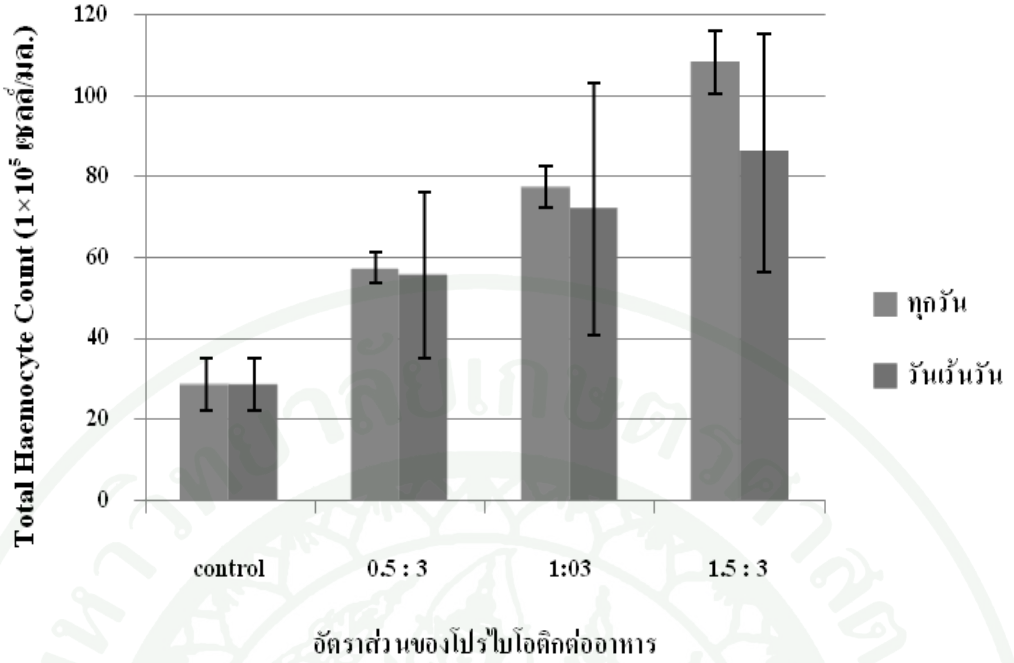
ที่ผสมยีสต์ที่แยกได้จากแหล่งทะเลธรรมชาติที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกและยีสต์ขนมปัง ได้แก่ *C. tropicalis* TH112, *P. antractica* TH9 และยีสต์ขนมปัง *S. cerevisiae* มีปริมาณเม็ดเลือดรวมสูงกว่ากุ้งกลุ่มควบคุมแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ตารางที่ 11 ปริมาณเม็ดเลือดรวม (1×10^5 เซลล์/มล.) ของกุ้งก้ามกรามที่ได้รับอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติกที่อัตราส่วนต่างๆกันเป็นระยะเวลา 60 วัน

อัตราส่วนของโปรไบโอติกต่ออาหาร	ความถี่การให้โปรไบโอติก		
	ทุกวัน	วันเว้นวัน	P-Value
กลุ่มควบคุม	28.67 ± 6.29^{f}	28.67 ± 6.29^{f}	0.0001
0.5 : 3	57.42 ± 3.81^{e}	55.67 ± 20.36^{e}	
1 : 3	77.58 ± 5.20^{c}	72.00 ± 31.32^{d}	
1.5 : 3	108.33 ± 7.64^{a}	86.00 ± 29.47^{b}	

หมายเหตุ ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ที่ตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 9 ปริมาณเม็ดเลือดรวม (1×10^5 เซลล์/มล.) ของกุ้งก้ามกรามที่ได้รับอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติกที่อัตราส่วนต่างๆกันเป็นระยะเวลา 60 วัน

3.2 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase) ในเลือดกุ้งก้ามกราม

จากการทดลองพบว่าปริมาณเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสของกุ้งก้ามกรามที่ได้รับอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสม *L. plantarum* LP64 อัตราส่วน 0.5:3 (ปริมาตร/น้ำหนักอาหาร) ทุกวัน มีค่าเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 598.62±180.56 unit/min/mg protein ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับกลุ่มการทดลองอื่นๆ โดยอัตราส่วนของโปรไบโอติกแต่ละระดับนั้นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ในขณะที่ระยะเวลาในการให้โปรไบโอติกนั้นไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) กล่าวคือ อัตราส่วนของโปรไบโอติกนั้นเป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่อปริมาณเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส โดยกุ้งที่ได้รับอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติกทุกวันมีปริมาณเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสลดลงตามอัตราส่วนของโปรไบโอติกที่ผสมในอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูป ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าอัตราส่วนของโปรไบโอติกที่สูงขึ้นมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ค่าเฉลี่ยปริมาณเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสของกุ้งก้ามกรามดังแสดงในตารางที่ 12 และภาพที่ 10 Rengpipat *et al*. (2000) รายงานว่า กุ้งกุลาดำระยะ postlarvae ที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปเสริมโปรไบโอติก *Bacillus* S11 นาน 90 วัน สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยเพิ่ม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

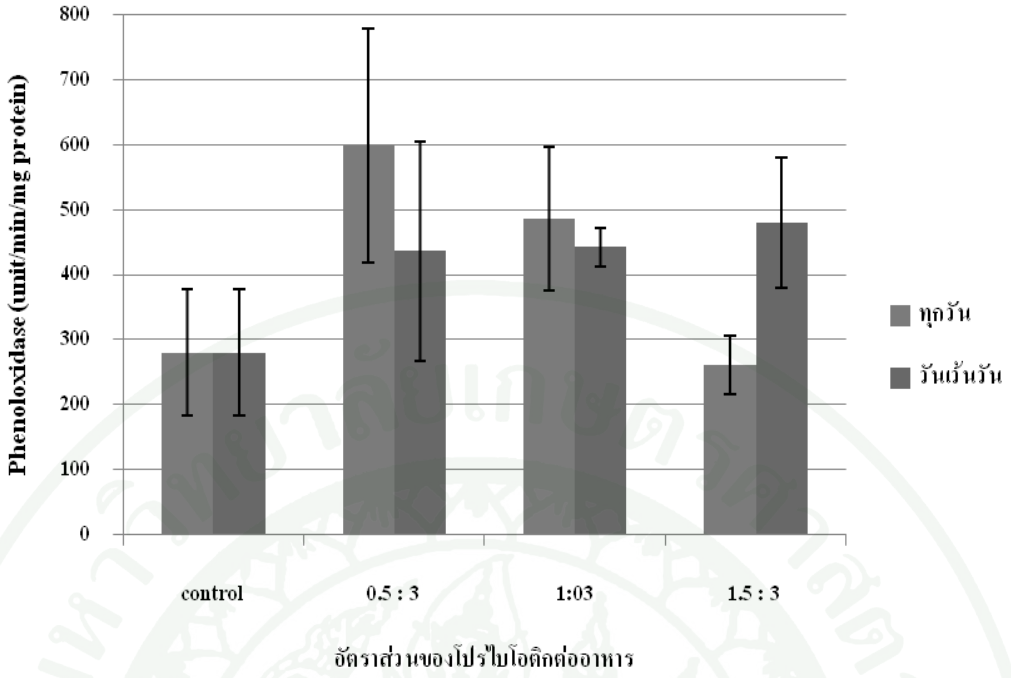
ปริมาณเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในเลือดกุ้งอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม หทัยรัตน์ (2550) ศึกษาการคัดเลือกจุลินทรีย์โปรไบโอติกจากน้ำกากส่าและผสมเชื้อสดในอาหารกุ้งสำเร็จรูป พบว่า *Bacillus* spp. และยีสต์สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งแวนนาไมได้ โดยมีปริมาณเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสสูงกว่ากลุ่มควบคุมแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และพบว่ายีสต์มีปริมาณเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสสูงที่สุด Li *et al*. (2009) รายงานว่า กุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก *Bacillus* OJ และอาหารผสมโปรไบโอติก *Bacillus* OJ กับ isomaltooligosaccharides (IMO) มีปริมาณเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสสูงกว่ากุ้งกลุ่มควบคุมแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และมีแนวโน้มว่าปริมาณเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสแปรผันกับระดับของโปรไบโอติก *Bacillus* OJ ที่สูงขึ้น

ตารางที่ 12 ปริมาณเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (unit/min/mg protein) ในเลือดกุ้งก้ามกรามที่ได้รับอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติกที่อัตราส่วนต่างๆกันเป็นระยะเวลา 60 วัน

อัตราส่วนของโปรไบโอติก	ความถี่การให้โปรไบโอติก		
ต่ออาหาร	ทุกวัน	วันเว้นวัน	P-Value
กลุ่มควบคุม	279.86±97.41^{b}	279.86±97.41^{b}	0.0487
0.5 : 3	598.62±180.56^{a}	436.15±168.80^{ab}	
1 : 3	486.68±110.08^{ab}	442.20±30.27^{ab}	
1.5 : 3	278.68±45.80^{b}	479.84±100.79^{ab}	

หมายเหตุ ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ที่ตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 10 ปริมาณเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (unit/min/mg protein) ในเลือดกุ้งก้ามกรามที่ได้รับอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติกที่อัตราส่วนต่างๆกันเป็นระยะเวลา 60 วัน

3.3 การศึกษากิจกรรมของเม็ดเลือดในการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม

จากการทดลองพบว่ากิจกรรมของเม็ดเลือดในการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม (% Phagocytosis) ของกุ้งก้ามกรามที่ได้รับอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสม *L. plantarum* LP64 อัตราส่วน 1.5:3 (ปริมาตร/น้ำหนักอาหาร) ทุกวัน มีค่าเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 63.48±5.29 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.05$) กับกลุ่มการทดลองอื่นๆ โดยอัตราส่วนของโปรไบโอติกแต่ละระดับนั้นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ในขณะที่ระยะเวลาในการให้โปรไบโอติกนั้นไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) โดยกิจกรรมของเม็ดเลือดในการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมจะแปรผันตามอัตราส่วนโปรไบโอติกและระยะเวลาการให้โปรไบโอติก กล่าวคือ กุ้งที่ได้รับอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติกมีกิจกรรมของเม็ดเลือดในการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมสูงมากขึ้นตามอัตราส่วนของโปรไบโอติกที่ผสมในอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปและระยะเวลาการให้โปรไบโอติก ค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเม็ดเลือดในการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมดังแสดงในตารางที่ 13 และภาพที่ 11 ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของมินตรา (2552) กล่าวว่า ชุดการทดลองที่เลี้ยงกุ้งกุลาดำด้วยอาหารผสม *Bacillus* spp. ทุกวัน นาน 20 วัน มีค่า % Phagocytosis สูง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

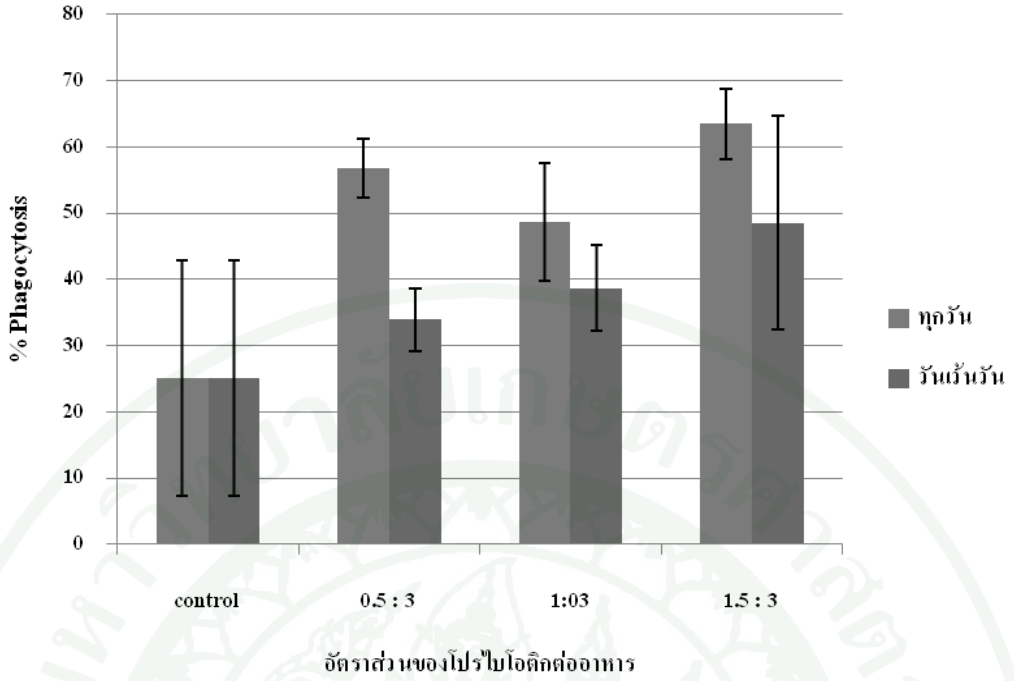
ที่สุด (21.72±1.82 เปอร์เซ็นต์) แตกต่างจากกลุ่มควบคุมและชุดที่ให้อาหารผสมโปรไบโอติกวันเว้นวันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.05$)

ตารางที่ 13 กิจกรรมของเม็ดเลือดในการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม (% Phagocytosis) ของกุ้งก้ามกรามที่ได้รับอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติกที่อัตราส่วนต่างๆกันเป็นระยะเวลา 60 วัน

อัตราส่วนของโปรไบโอติกต่ออาหาร	การให้โปรไบโอติก		
	ทุกวัน	วันเว้นวัน	P-Value
กลุ่มควบคุม	25.08±17.76^{d}	25.08±17.76^{d}	0.0366
0.5 : 3	56.81±4.48^{ab}	33.93±4.72^{cd}	
1 : 3	48.61±8.86^{abc}	38.70±6.54^{bcd}	
1.5 : 3	63.48±5.29^{a}	48.54±16.20^{abc}	

หมายเหตุ ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ที่ตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 11 กิจกรรมของเม็ดเลือดในการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม (% Phagocytosis) ของกุ้งก้ามกราม ที่ได้รับอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติกที่อัตราส่วนต่างๆกันเป็น ระยะเวลา 60 วัน

3.4 ศึกษากิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือด (bactericidal activity)

การศึกษากิจกรรมในการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้งก้ามกราม โดยใช้ซีรัมของกุ้งก้ามกรามที่ได้รับโปรไบโอติกที่อัตราส่วน โปรไบโอติกและระยะเวลาต่างๆ กันนาน 60 วัน เพื่อหาค่าเจือจางของซีรัมที่สามารถทำลาย *V. harveyi* ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ พบว่า กุ้งที่ได้รับอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติกที่อัตราส่วน 1:3 และ 1.5:3 ปริมาตร/น้ำหนักอาหาร ทุกวัน และที่อัตราส่วน 1.5:3 ปริมาตร/น้ำหนักอาหาร วันเว้นวัน มีค่าเจือจางของซีรัมต่ำที่สุดที่ทำให้ แบคทีเรียลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ เท่ากันอยู่ในช่วง 1:16-1:32 ขณะที่กุ้งก้ามกรามกลุ่มควบคุมมีค่าเจือจางของซีรัมสูงที่สุดที่ทำให้แบคทีเรียลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ ที่ค่าการเจือจาง 1:4 โดยค่าเจือจางของซีรัมที่สามารถทำลายเชื้อ *V. harveyi* ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่ากุ้งที่ได้รับอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติกมีกิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดสูงขึ้นตามอัตราส่วนของโปรไบโอติกที่ผสมในอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปและระยะเวลาการให้โปรไบโอติก ดังแสดงในตารางที่ 13 นิตยา (2549) รายงานว่า ในสัปดาห์ที่ 3 ของการทดลอง กุ้งที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก *B.*

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

subtilis กับ *B. licheniformis* 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ทุกวัน มีค่าเจือจางของซีรัมสูงที่สุดที่ทำให้แบคทีเรียลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ ที่ค่าการเจือจาง 1:32 ซึ่งแตกต่างจากกุ้งที่ได้รับโปรไบโอติกวันเว้นวัน และกลุ่มควบคุมที่มีค่าเจือจางของซีรัมสูงที่สุดที่ทำให้แบคทีเรียลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ ที่ค่าการเจือจาง 1:16 และ 1:8 ตามลำดับ

ตารางที่ 14 กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้งก้ามกรามที่ได้รับอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติกที่อัตราส่วนต่างๆกันเป็นระยะเวลา 60 วัน

อัตราส่วนของโปรไบโอติกต่ออาหาร	ความถี่การให้โปรไบโอติก	
	ทุกวัน	วันเว้นวัน
กลุ่มควบคุม	1 : 4	1 : 4
0.5 : 3	1 : 16	1:8-1:16
1 : 3	1:16 -1:32	1 : 16
1.5 : 3	1:16–1:32	1:16–1:32

การทดลองที่ 4 การศึกษาผลของโปรไบโอติกต่อปริมาณ *Vibrio* spp. และ Total Lactic Acid Bacteria ในทางเดินอาหารของกุ้งก้ามกราม

4.1 การศึกษาปริมาณ *Vibiro* spp. ทั้งหมดในลำไส้

เมื่อนำลำไส้กุ้งก้ามกรามที่ได้รับอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติกที่อัตราส่วนและระยะเวลาต่างๆ มาบดเพื่อนับปริมาณ *Vibrio* spp. ทั้งหมดในลำไส้ (Total *Vibrio* Count) ด้วยวิธี spread plate บน TCBS agar บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 48 ชั่วโมง พบว่า กุ้งก้ามกรามกลุ่มควบคุมและกลุ่มได้รับอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติก ตรวจไม่พบ *Vibrio* spp. ในลำไส้แต่อย่างใด จากการทดลองนี้ไม่พบ *Vibrio* spp. ในลำไส้กุ้งก้ามกรามทุกกลุ่มการทดลอง เนื่องมาจากการเลี้ยงในตู้กระจกซึ่งใช้น้ำประปาไล่คลอรีน *Vibrio* spp. ซึ่งเป็นเชื้อประจำถิ่นในลำไส้กุ้งก้ามกรามจะถูกปลดปล่อยออกกับของเสีย และสภาพแวดล้อมในการเลี้ยงนั้นเป็นน้ำจืดจึงไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *Vibrio* spp. และ Prayitno and Latchford (1995) รายงานว่า น้ำที่มีความเค็มต่ำ 10 และ 15 ppm และความเป็นกรด-ด่าง 5.5 จะทำให้กุ้งนั้นมีภูมิคุ้มกันต่ำลงและเสี่ยงต่อการเกิดโรค Vibriosis นอกจากนี้แล้วการไม่พบ *Vibrio* spp. อาจเกิดจากผลการยับยั้งของสารยับยั้งจุลชีพเนื่องจากวลัยพร (2544) รายงานว่า *L. plantarum* LP64 มีความสามารถในการผลิต

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารยับยั้งจุลชีพซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 10 kDa ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Messi *et al*. (2001), Navarro *et al*. (2000), Remiger *et al*. (1999), Reenen *et al*. (1998), Jimenez *et al*. (1993), Gonzalez *et al*. (1994), Rekhif *et al*. (1995) และ Kelly *et al*. (1996) รายงานเกี่ยวกับการผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ของ *L. plantarum* สายพันธุ์ต่างๆ และเมื่อทำให้บริสุทธิ์แล้วพบว่า สารยับยั้งจุลชีพที่ *L. plantarum* ผลิตขึ้นส่วนใหญ่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 10 kDa

4.2 การศึกษาปริมาณ Total Lactic Acid Bacteria ทั้งหมดในลำไส้

เมื่อนำลำไส้กุ้งก้ามกรามที่ได้รับอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติกที่อัตราส่วนและระยะเวลาต่างๆ มาบดเพื่อนับปริมาณ Total Lactic acid bacteria ทั้งหมดในลำไส้ (Total Lactic Acid Bacteria Count) ด้วยวิธี spread plate บน MRS agar ที่มีบรอมครีซอลเพอเพิลเป็นอินดิเคเตอร์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง พบว่า กุ้งก้ามกรามที่ได้รับอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติกที่อัตราส่วน 1.5:3 (ปริมาตร/น้ำหนักอาหาร) ทุกวัน มีปริมาณ Total Lactic acid bacteria ทั้งหมดในลำไส้เฉลี่ยสูงสุดคือ 5.40×10^{5} CFU/g แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$) จากกุ้งก้ามกรามในกลุ่มการทดลองอื่นๆและกลุ่มควบคุม แสดงให้เห็นว่า ปริมาณ Total Lactic Acid Bacteria ทั้งหมดในลำไส้แปรผันตามอัตราส่วนของโปรไบโอติกและระยะเวลาการให้ กล่าวคือ กุ้งที่ได้รับอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติกมีปริมาณ Total Lactic Acid Bacteria ทั้งหมดในลำไส้สูงขึ้นตามอัตราส่วนของโปรไบโอติกที่ผสมในอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปและระยะเวลาการให้โปรไบโอติก Vieira *et al*. (2008) กล่าวว่า กุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสม *Lactobacillus plantarum* นาน 20 วัน มีปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกในลำไส้สูงกว่ากลุ่มควบคุมแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) สอดคล้องกับนิตยา (2549) ซึ่งพบว่า กุ้งที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก *B. subtilis* กับ *B. licheniformis* 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ทุกวัน มีปริมาณ *Bacillus* spp. เฉลี่ยสูงที่สุดคือ $21.5\pm1.620\times10^{6}$ CFU/g แตกต่างจากกุ้งที่ได้รับอาหารผสม *B. subtilis* กับ *B. licheniformis* 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม วันเว้นวัน และกลุ่มกุ้งควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

แบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารของสัตว์น้ำส่วนใหญ่จะเป็นแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Vibrio*, *Pseudomonas* และ *Aeromonas* (Vine *et al*., 2006) โดยการเสริมโปรไบโอติกในสัตว์น้ำ นิยมผสมด้วยแบคทีเรียแกรมบวกผสมในอาหาร (Ziaei-Nejad *et al*., 2006; Vieira *et al*., 2008) หรือใส่ในน้ำที่เพาะเลี้ยง (Rengpipat *et al*., 1998a; 2000) เช่นเดียวกับการศึกษาการเสริม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

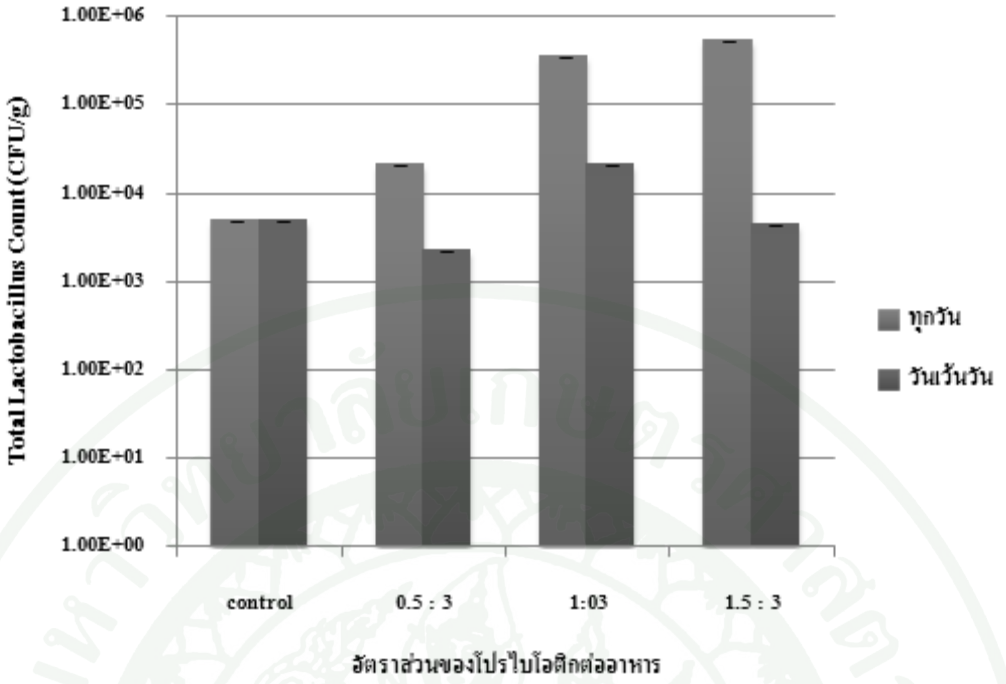
โปรไบโอติกในกุ้งก้ามกรามในครั้งนี้ที่มีการผสมโปรไบโอติก *L. plantarum* LP64 ในอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปซึ่งไม่พบ *Vibrio* spp. ในระบบทางเดินอาหาร และยังพบว่ามีปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกสูงกว่ากลุ่มควบคุม มีความเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียกรดแลคติกผลิตสารประกอบที่มีผลยับยั้งจุลินทรีย์ เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แบคเทอริโอซิน กรดแลคติก และกรดอินทรีย์เป็นต้น

ตารางที่ 15 Total Lactic Acid Bacteria (CFU/g) ของลำไส้กุ้งก้ามกรามที่ได้รับอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติกที่อัตราส่วนต่างๆกันเป็นระยะเวลา 60 วัน

อัตราส่วนของโปรไบโอติก	ความถี่การให้โปรไบโอติก		
ต่ออาหาร	ทุกวัน	วันเว้นวัน	P-Value
กลุ่มควบคุม	$4.88\times10^{3}\pm2.30^{d}$	$4.88\times10^{3}\pm2.30^{d}$	0.0001
0.5 : 3	$2.10\times10^{4}\pm8.07^{c}$	$2.24\times10^{3}\pm0.51^{d}$	
1 : 3	$3.44\times10^{5}\pm9.55^{b}$	$2.09\times10^{4}\pm1.14^{c}$	
1.5 : 3	$5.40\times10^{5}\pm10.01^{a}$	$4.37\times10^{3}\pm3.34^{d}$	

หมายเหตุ ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ที่ตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



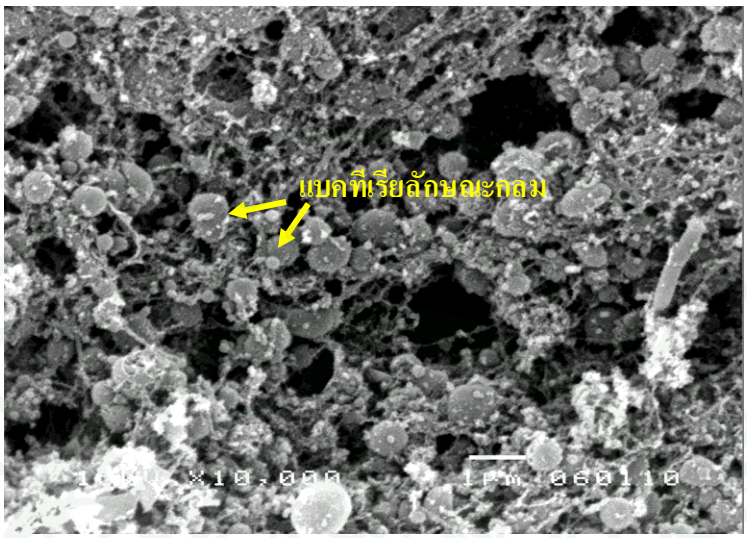
ภาพที่ 12 Total Lactic Acid Bacteria (CFU/g) ของลำไส้กุ้งก้ามกรามที่ได้รับอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติกที่อัตราส่วนต่างๆกันเป็นระยะเวลา 60 วัน

4.3 การตรวจสอบจุลินทรีย์โดยส่องภายใต้กล้อง Scanning Electron Microscope (SEM)

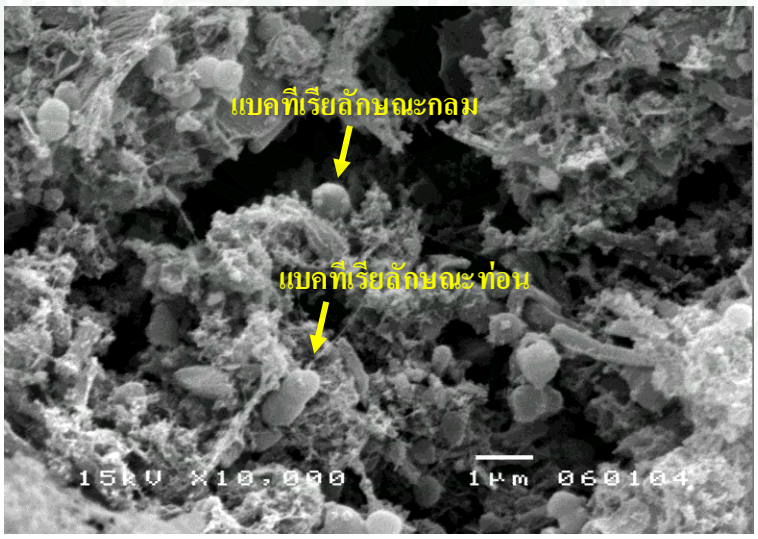
จากผลการศึกษาปริมาณ *Vibrio* spp. และ Lactic acid bacteria ทั้งหมดในลำไส้ พบว่ากุ้งก้ามกรามที่ได้รับอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติกที่อัตราส่วน 1.5:3 (ปริมาตร/น้ำหนักอาหาร) ทุกวัน นาน 60 วัน มีปริมาณ Total Lactic Acid Bacteria ทั้งหมดในลำไส้เฉลี่ยสูงสุด เมื่อนำลำไส้กุ้งก้ามกรามที่ได้รับอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติกที่อัตราส่วน 1.5:3 (ปริมาตร/น้ำหนักอาหาร) ทุกวัน และกุ้งที่ได้รับอาหารกลุ่มควบคุม ตรวจหาแบคทีเรียโดยส่องภายใต้กล้อง Scanning Electron Microscope (SEM) เพื่อประเมินการดำรงอยู่ของแบคทีเรียในลำไส้กุ้งก้ามกราม พบว่า บริเวณผนังลำไส้ของกุ้งก้ามกรามที่ได้รับอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติกพบแบคทีเรียสูงกว่ากลุ่มควบคุม ซึ่งแบคทีเรียที่พบส่วนมากมีลักษณะเป็นแท่งยาวประมาณ 1.5-2 ไมโครเมตร และลักษณะกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5-1 ไมโครเมตร (ภาพที่ 13) ขณะที่ภายในลำไส้กุ้งก้ามกรามกลุ่มควบคุมพบเพียงแบคทีเรียลักษณะกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5-1 ไมโครเมตร (ภาพที่ 14) จากลักษณะสัณฐานเหล่านี้คาดว่าแบคทีเรียลักษณะแท่งยาวคือ *Lactobacillus* spp. ซึ่งมีการเสริมในอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โปรไบโอติก ส่วนแบคทีเรียลักษณะกลมคือ *Enterococcus* spp. ซึ่งเป็นเชื้อประจำถิ่นที่พบได้ในลำไส้กุ้งก้ามกราม (วลัยพร, 2544)



ภาพที่ 13 ลำไส้ของกุ้งก้ามกรามกลุ่มควบคุมที่ได้รับอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูป เป็นระยะเวลา 60 วัน ที่ส่องภายใต้กล้อง Scanning Electron Microscope (SEM) กำลังขยาย 10,000 เท่า



ภาพที่ 14 ลำไส้ของกุ้งก้ามกรามที่ได้รับอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติกที่อัตราส่วน 1.5:3 (ปริมาตร/น้ำหนักอาหาร) เป็นระยะเวลา 60 วัน ที่ส่องภายใต้กล้อง Scanning Electron Microscope (SEM) กำลังขยาย 10,000 เท่า

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

การศึกษาการรอดชีวิต (viability) ของเชื้อโปรไบโอติกในรูปของเชื้อสดและอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติก พบว่า การเก็บรักษาเชื้อสดไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถเก็บได้นาน 30 วัน และเมื่อนำเชื้อสดผสมในอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปโดยวิธีการพ่นเชื้อ พบว่า สามารถเก็บอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติกที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้นาน 3 วัน

การศึกษาอัตราส่วนของโปรไบโอติกที่เหมาะสมในการผสมอาหารต่อการเจริญเติบโตและการรอดชีวิตของกุ้งก้ามกราม พบว่า กุ้งก้ามกรามที่ได้รับอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสม *L. plantarum* LP64 อัตราส่วน 1:3 (ปริมาตร/น้ำหนักอาหาร) นาน 60 วัน มีผลทำให้สมรรถภาพการผลิต ได้แก่ น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น น้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มต่อวัน อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนัก และอัตรารอดสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มการทดลองอื่นๆไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

เมื่อศึกษาอัตราส่วนและระยะเวลาการให้โปรไบโอติกที่เหมาะสมในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งก้ามกราม โดยประเมินจากองค์ประกอบพื้นฐานทางด้านภูมิคุ้มกัน ได้แก่ ปริมาณเม็ดเลือดรวม กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส กิจกรรมของเม็ดเลือดในการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม และกิจกรรมในการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือด พบว่า กุ้งก้ามกรามที่ได้รับอาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปผสม *L. plantarum* LP64 อัตราส่วน 1.5:3 (ปริมาตร/น้ำหนักอาหาร) ทุกวัน นาน 60 วัน มีแนวโน้มในการเพิ่มระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งก้ามกรามได้ดีที่สุด และยังพบว่าลำไส้กุ้งก้ามกรามในกลุ่มการทดลองดังกล่าวมีปริมาณ Lactic acid bacteria สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มการทดลองอื่นๆแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากกุ้งก้ามกรามนั้นเป็นสัตว์เลือดเย็น ซึ่งระบบกลไกทางชีวเคมีภายในร่างกายนั้นเปลี่ยนแปลงตามสภาพแวดล้อมที่อยู่อาศัย แม้ว่ากุ้งก้ามกรามสามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปในช่วงกว้างได้แต่ก็ส่งผลต่อการเจริญเติบโตและการดำรงชีวิตได้ กุ้งจะเจริญเติบโตได้ดีที่สุดในช่วงสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมในช่วงแคบเท่านั้น และส่งผลต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันอีกด้วย ดังนั้นสมควรศึกษาปัจจัยทางสภาพแวดล้อมที่ส่งผลต่อระบบภูมิคุ้มกันเพื่อเป็นแนวทางในการจัดระบบการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามควบคู่ไปกับการเสริมจุลินทรีย์โปรไบโอติกได้อย่างมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

การศึกษานี้นำไปสู่การนำโปรไบโอติกนำไปใช้จริงในการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามแบบบ่อดินในการเพาะเลี้ยงเชิงการค้า สมควรศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับปริมาณโปรไบโอติก *L. plantarum* LP64 และการนำไปใช้จริงในการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามแบบบ่อดินเพื่อประสิทธิภาพสูงสุด และการศึกษาผลของการใช้โปรไบโอติก *L. plantarum* LP64 ต่อระบบภูมิคุ้มกันกุ้งก้ามกรามควบคู่กับการเลี้ยงต่อไปในอนาคต รวมถึงการพัฒนาการเก็บรักษาหรือการปกป้องเชื้อจากสภาพแวดล้อมของการอาหารกุ้งสำเร็จรูปเสริมโปรไบโอติกซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนารูปแบบของผลิตภัณฑ์และการนำไปใช้ในเชิงการค้าต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมประมง. ม.ม.ป. **คู่มือประชาชน : คุณภาพน้ำในฟาร์มเลี้ยงสัตว์น้ำ มาตรฐานปลอดภัย (Food Safety)**. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ

กิจการ ศุภมาตย์, จรีพร เรืองศรี, สุภฏา คีรีรัฐนิคม และ นเรศ ซ่วนยุก. 2543ก. ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ : VII. องค์ประกอบเลือดและระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำบนพื้นฐานของเพศ ขนาด และวงจรการลอกคราบ. **วารสารสงขลานครินทร์**. 22 (ฉบับพิเศษ): 623-632.

_____, สุภาพ เกียรติทับทิม และ R. Hoffmann. 2543ข. ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ : III. การศึกษาทางจุลทรรศน์อิเลคตรอนของเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำ. วารสารสงขลานครินทร์. 22 (ฉบับพิเศษ): 590-596.

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

กลุ่มบัณฑิตเกษตรอาสา สาขาประมง. 2539. **รวมเรื่องกุ้งก้ามกรามและกุ้งกุลาดำ.** กลุ่มบัณฑิตเกษตรอาสา สาขาประมง, นครปฐม.

ชะลอ ลิ้มสุวรรณ. 2534. **คัมภีร์การเลี้ยงกุ้งกุลาดำ**. บริษัท ฐานเศรษฐกิจ จำกัด, กรุงเทพฯ.

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

ชูศักดิ์ แสงธรรม. 2532. **กุ้งก้ามกราม**. ศูนย์ผลิตตำราเกษตรเพื่อชนบท, กรุงเทพฯ.

_____. 2544. **กุ้งก้ามกราม**. สำนักพิมพ์ฐานเกษตรกรรม, นนทบุรี.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โชคชัย เหลืองธุวปราณีต. 2548. **หลักการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ.** สำนักพิมพ์ โฟร์เพซ, กรุงเทพฯ.

ทิพรัตน์ หงภัทรคีรี และ กิจการ ศุภมาตย์. 2548. **การแยก การคัดเลือก และการผลิตยีสต์ที่แยกจากทะเลเพื่อนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ**. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.

บรรจง เทียนส่งรัศมี. 2535. **หลักการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม**. โรงพิมพ์ ที พี พรินท์, กรุงเทพฯ.

มั่นสิน ตัณฑุลเวศม์. 2540. **คู่มือวิเคราะห์คุณภาพน้ำ**. พิมพ์ครั้งที่ 2. โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

มินตรา ศีลอุดม. 2552. **การใช้ *Bacillus* spp. เป็นโปรไบโอติกในการยับยั้งเชื้อ *Vibrio harveyi* และการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*, Boone)**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นิตยา ลิ้มเจริญ. 2549. **การใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius)**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ยนต์ มุสิก. 2529. **การเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกราม**. ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน, กรุงเทพฯ.

วรรนิภา เพี้ยนภักตร์. 2539. **การใช้โพรไบโอติกเสริมในอาหารกุ้ง**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วลัยพร ทิมบุญธรรม. 2544. **การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์. 2539. จุลินทรีย์กับการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. **วารสารวิริชศาสตร์**. 3: 42-51.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สันนิภา สุรทัตต์. 2549. **วิทยาภูมิคุ้มกันทางสัตวแพทย์ภาคปฏิบัติ.** โรงพิมพ์ตีรณสาร, กรุงเทพฯ.

สมบัติ รักษ์ประทานพร. 2542. **การเสริมภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* ด้วย *Bacillus* สายพันธุ์ S11**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สายชล ชิวปรีชา. 2520. **การศึกษาการใช้น้ำมะพร้าวเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อและเก็บเชื้อบักเตรีที่ผลิตกรดแลคติก**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

หทัยรัตน์ ไปล่โสภณ. 2550. **การคัดเลือกจุลินทรีย์โปรไบโอติกจากน้ำกากส่าและการประยุกต์ใช้ในกุ้งขาว (*Penaeus vannamei*)**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อาจ แจ่มแมฆ. 2529. **สัตววิทยาทั่วไป**. สำนักพิมพ์บำรุงสาส์น, กรุงเทพฯ.

อาภัสสรา ชมิดท์. 2537. **คู่มือทางชีวเคมี**. คณะสัตวแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Adams, A. 1991. Response of penaeid shrimp to exposure to *Vibrio* species. **Fish & Shellfish Immunology**. 1: 59-70.

Ajitha, S., M. Sridhar, N. Sridhar, I.S.B. Singh and V. Varghese. 2004. Probiotic effects of lactic acid bacteria against *Vibrio alginolyticus* in *Penaeus* (Fenneropenaeus) *indicus* (H. Milne Edwards). **Asian Fish. Sci**. 17: 71-80.

Aspan, A. and K. Soderhall. 1995. The prophenoloxidase activating system in invertebrates : Assays of prophenoloxidase activating enzyme (a serine proteinase) and prophenoloxidase, pp. 161-171. *In* Stolen, J.R. *et al*.(eds). **Techniques in fish immunology-4**. SOS Publications, USA.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Baati, L., C. Fabre-Ga, D. Auriol and P.G. Blanc. 2000. Study of the cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus* : effect of the culture and freezing conditions on the viability and cellular protein levels. **Int. J. Food Microbiol**. 59: 241-247.

Boyd, C.E. 1982. **Water Quality Management for Pond Fish Culture**. Elseviser Sci. Pubi. Co., Amsterdam.

Brashears, M.M. and S.E. Gilliland. 1995. Survival during frozen and subsequent refrigerated storage of *Lactobacillus acidophilus* cells as influenced by growth phase. **J. Dairy Sci**. 78: 2326-2335.

Byun, J.W., S.C. Park, Y. Benno and T.K. Oh. Probiotic effect of *Lactobacillus* sp. DS-12 in flounder (*Parslinchthys olivacaceus*). **J. Gen Appl. Microbiol**. 43: 305-308.

Dall, W. and D.J.W. Moriarty. 1983. **Functional aspects of nutrition and digestion**. *In* Mantel. L. H. (Ed.), The Biology of Crustaces, vol. 5, Internal Anatomy and Physiological Regulation. Academic Press.

Dalmin, G., K. Kathiresan and A. Purushothaman. 2001. Effect of probiotics on bacteria; population and health status of shrimp in culture pond ecosystem. **Indain J. Exp. Biol**. 39: 939-942.

Deeseenthum, S., V. Leelavatcharamas and J.D. Brooks. 2007. Effect of feeding *Bacillus* sp. as probiotic bacteria on growth of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii* de Man). **Pak. J. Biol. Sci.** 10(9): 1481-1485.

Encarnacion A.B, F. Fagutao, J. Hirayama, M.Terayama , I. Hirono and T. Ohshima. 2010. Edible Mushroom (*Flammulina velutipes*) Extract Inhibits Melanosis in Kuruma Shrimp (*Marsupenaeus japonicus*). **J. Food Sci**. doi: 10.1111/j.1750-3841.2010.01890.x.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Fonseca, F., C. Beal and G. Corrieu. 2001. Operating conditions that the resistance of lactic acid bacteria to freezing and frozen storage. **Cryobiol**. 43: 189-198.

Foster, E.M. 1962. Symposium on lactic culture VI culture preservation. **J. Dairy Sci**. 45: 1290-1294.

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

Gonzalez, B., P. Arca, B. Mayo and J.E. Surez. 1994. Detection, purification and partial characterization of plantaricin C, a bacteriocin produced by a *Lactobacillus plantarum* strain of dairy origin. **Appl. Environ. Microbiol**. 60: 2158-2163.

Guillot J.F. 1998. Probiotics in animal nutrition. **Cahiers Agricultures**. 7(1): 49-54.

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.

Hammer, B.W. and F.J. Babel. 1943. Bacteriology of butter culture : A review. **J. Dairy Sci**. 26: 83.

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

Iijima, T. and T. Sakane. 1973. A method for preservation of bacteria and bacteriophages by drying *in* vacuo. **Cryobiol**. 10: 379-385.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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. 375-379. *In* Chou L.M., 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.

Jariyawaranukul, U. 2005. Probiotic viability and its application. **University of the Thai Chamber of Commerce J**. 1: 84-94.

Jimenez, D., R.M. Sanchez, M. Desmazeaud, J.L. Ruiz and J.C. Pirad. 1993. Plantaricin S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO010 isolated from agreen olive fermentation. **Appl. Environ. Microbiol**. 59: 1416-1424.

Johansson, M.W. and Soderhall K. 1989. Cellular immunity in crustaceans and the proPO system. **Parasiol. Today**. 5: 171-176.

Kelly, W.J., R.V. Asmundson and C.M. Huang. 1996. Characterization of plantaricin KW30, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. **J. Appl. Bacteriol**. 81: 657-662.

Klein, J. 1982. **Immunology : The Science of Shelf-Nonself Discrimination**. A Wiley Interscience Publication., USA.

Kuo, M.J. and M. Alexander. 1967. Inhibition of the Lysis of Fungi by Melanins. **Bacteriol**. 94(3): 624-629.

Lackie, A.M. 1980. Invertebrate immunity. **Parasitology**. 80: 393-412.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Lapage, S.P., J. E. Shelton, T.G. Mitchell and A.R. Mackenzie. 1970. Chapter II Culture Collections and The Preservation of Bacteria. **Methods in Microbiology**. 3(1): 135-228.

Leonard, C., N.A. Ratcliffe and A.F. Rowley. 1985. The role of prophenoloxidase activation in non-self recognition and phagocytosis by insect blood cells. **J. Insect Physiol**. 31: 780-799.

Li, J., B. Tan and K. Mai. 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.

Lightner, D.V. and R. Redman. 1977. Histochemical Demonstration of Melanin in Cellular Inflammatory Process of Penaeid Shrimp. **J. Invertebr. Pathol**. 30: 298-302.

Lilly, D.M. and R.H. Stillwell. 1965. Probiotic : growth promoting factor produced by microorganisms. **Science**. 147: 747-748.

Lin, H.Z., Z.X. Guo, Y.Y. Yang, W.H. Zheng and Z.J. Li. 2004. Effect of dietary probiotics on apparent digestibility coefficients of nutrients of white shrimp *Litopenaeus vannamei* Boone. **Aquac. Res.** 35: 1441–1447.

Liu, K.F., C.H. Chiu, Y.L. Shiu, W. Cheng and C.H. Liu. 2010. Effects of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, on the survival, development, stress tolerance, and immune status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae. **Fish Shellfish Immunol**. 28: 837-844.

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 Penaeid shrimp, *Sicyonia ingentis*. **J. Inver. Pathol**. 62: 308-315.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Matias, H.B., F.M. Yusoff, M. Shariff and O. Azhar. 2002. Effects of commercial microbial products on water quality in tropical shrimp culture ponds. **Asian Fish. Sci**. 15: 239-248.

McKay, D. and C.R. Jenkin. 1970. Immunity in the invertebrates. The role of serum factors in phagocytosis of erythrocytes by haemocytes of the freshwater crayfish (*Parachaeraps bicarinatus*). **Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci**. 48: 139-150.

Messi, P., M. Bondi, C. Sabia, R. Battini and G. Manicardi. 2001. Detection and preliminary characterization of bacteriocin (plantaricin 35d) produced by a *Lactobacillus plantarum* strain. **Inter. J. of Food Micro**. 64: 193-198.

Meunpol, O., K. Lopinyosiri and P. Menasveta. 2003. The effects of ozone and probiotics on the survival of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Aquaculture**. 220: 437-448.

Moriarty, D.J.W. 1998. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. **Aquaculture**. 164: 351-358.

Morice, M., P. Bracquart and G. Linden. 1992. Colonial variation and freeze–thaw resistance of *Streptococcus thermophilus.* **J. Dairy Sci**. 75: 1197–1203.

Nappi, A.J. 1973. The role of melanization in the immune reaction of larvae of *Drosophila algonquin* against *Pseudeucoila bochei*. **Parasitology**. 66:23-32.

Navarro, L., M. Zarazaga, J. Saenz, F. Ruiz-Larrea and C. Torres. 2000. Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from RioJa red wines. **J. Appl. Microbiol**. 88: 44-51.

Parker, R.B. 1974. Probiotic, the other half of the antibiotic story. **Anim. Nutr. and Health**. 29: 4-8.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Pawelek, J.M. and A.B. Lerner. 1978. 5,6-Dihydroxyindole is a melanin precursor showing potent cytotoxicity. **Nature**. 276: 627-628.

_____. and A.M. Korner. 1982. The biosynthesis of mammalian melanin. **American Scientist**. 70: 136-145.

Phianphak W, S. Rengpipat, S. Piyatiratitivorakul and P. Menasveta. 1999. Probiotic Use of *Lactobacillus* spp. for Black Tiger Shrimp, *Penaeus monodon*. **J. Sci. Res. Chula. Univ.** 24(1): 41-58.

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.

Prayitno, S.B. and J.W. Latchford. 1995. Experimental infections of crustaceans with luminous bacteria related to *Photobacterium* and *Vibrio*. Effect of salinity and pH on infectiosity. **Aquaculture**. 132: 105-112.

Prieur, G., J.L. Nicolas, A. Pludquellec and M. Vigneulle. 1990. Interactions between bivalves mollusks and bacteria in the marine environment. **Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev**. 28: 227-352.

Purivirojkul, W., M. Maketon and N. Areechon. 2005. Probiotic Properties of *Bacillus pumilus*, *Bacillus sphaericus* and *Bacillus subtilis* in Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius) Culture. **Kasetsart J. (Nat. Sci.)**. 39: 262-273.

Rabin, H. 1970. Hemocyte, hemolymph and the defense reaction of crustaceans. **J. Reticuloendothel. Soc**. 7: 195-207.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Ratchliffe, N.A., A.F. Rowley, S.W. Fitzgerald and C.P. Rhodes. 1985. Invertebrate immunity : basic concepts and recent advances. **Inter. Rev. Cytology**. 97: 183-350.

Reenen, C.A., L.M.T. Dicks and M.L. Chikindas. 1998. Isolation, purification and partial characterization of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. **J. Appl. Microbiol**. 84: 1131-1137.

Rekhif, N., A. Atrih and G. Lefebvre. 1995. Activity of plantaricin SA6, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* SA6 isolated from fermented sausage. **J. Appl. Bacteriol**. 78: 349-358.

Remiger, A., V.G.H.Eijsink, M.A. Ehrmann, K. Sletten, I.F. Nes and R.F. Vogel. 1999. Purification and partial amino acid sequence of plantaricin 1.25α and 1.25β, two bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* TMW 1.25. **J. Appl. Microbiol**. 86: 1053-1058.

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

_____, W. Phianphak, S. Piyatiratitivorakul and P. Menasveta. 1998b. **Probiotics in aquaculture: a case study of probiotics for larvae of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)**. In Flegel TW(ed) Advances in shrimp biotechnology. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology.

_____, S. Rukpratanporn, S. Piyatiratitivorakul and P. Menasaveta. 2000. Immunity enhance in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by probiont bacterium (*Bacillus* S11). **Aquaculture.** 191: 271-288.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Rengpipat, S., A. Tunyanun, A.W. Fast, S. Piyatiratitivorakul, P. Menasveta. 2003. Enhance growth and resistance to *Vibrio* Challenge for pond-reared black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) fed *Bacillus* probiotic. **Dis. Aqua. Org**. 55: 169-173.

Ringo, E. and F.J. Gatesoupe. 1998. Lactic acid bacteria in Fish : A review. **Aquaculture**. 160: 177-203.

Shortt, C. 1999. The probiotic century : historical and current perspectives. **Trends in Food Sci. & Technol**. 10: 411-417.

Sindermann, C. J. 1971. Internal defense of crustacia : a review. **Fish. Bull**. 69: 455-489.

Smith, P. and S. Davey. 1993. Evidence for the competitive exclusion of *Aeromonas salmonicida* from fish with stress-inducible furunculosis by fluorescent pseudomonad. **J. Fish Dis**. 16: 521-524.

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

Smith, V.J. and K. Soderhall. 1991. A comparison of phenoloxidase activity in the blood of marine invertebrates. **Developmental & Comparative Immunology**. 15(4): 251-261.

Soderhall, K., 1983. β-1,3-glucan enhancement of protease activity in crayfish hemocyte lysate. **Comp. Biochem. Physiol**. 74(2): 221-224.

_____, and L. Hall. 1984. Lipopolysaccharide induced activation of prophenoloxidase activating system in crayfish heamocyte lysate. **Biochem. Biophys. Acta.** 797: 99-104.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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

_____, L. Cerenius and M.W. Johansson. 1994. The prophenoloxidase activating system and its role in invertebrate defense. **Ann. N. Y. Acad. Sci**. 712: 155-161.

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

Tornqvist, P.O. and K. Soderhall. 1997. Crustacean immune reaction, a short review, pp 203-218 *In* Fegal, T.W. and MacRae, I.H. (eds). **Diseases in aquaculture III**. Asian Fisheries Society. Manila, Philippines.

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.

Uno, Y. and K.C. Soo. 1969. Larval development of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) reared in the laboratory. **J. Tokyo Univ. Fish**. 55(2): 179–190.

Vaseeharan, B. and P. Ramasam. 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): 83-87.

Verschuere, L., G. Rombaut, P. Sorgeloos and W. Verstraete. 2000. Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. **Microbiol. Mol. Biol. Rev**. 64: 655-671.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Vieira, F.N., C.C. Buglione, J.L.P. Mourino, A. Jatoba, C. Ramirez, M.L. Martins, M.A.A. Barracco and L.A. Vinatea. 2008. Time-related action of *Lactobacillus plantarum* in the bacterial microbiota of shrimp digestive tract and its action as immunostimulant. **Pesq. Agropec. Bras.** 43: 763-769.

_____, C.C. Buglione, J.P.L. Mourino, A. Jatoba, M.L. Martins, D.D. Schleder, E.R. Andreatta, M.A. Barraco and L.A. Vinatea. 2010. Effect of probiotic supplemented diet on marine shrimp survival after challenge with *Vibrio harveyi*. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**. 62(3): 631-638.

Vine, N.G., W.D. Leukes and H. Kaiser. 2006. Probiotics in marine larviculture. **FEMS Microbiol. Rev.** 30: 404–427.

Wang, Y.B., Z.R. Xu and M.S. Xia. 2005. The effectiveness of commercial probiotics in northern white shrimp *Penaeus vannamei* ponds. **Fish. Sci**. 71: 1036-1041.

Ziaei-Nejad, S., M.H. Rezaei, G.A. Takami, D.L. Lovett, A.R. Mirvaghefi and M. Sakouri. 2006. The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. **Aquaculture**. 252: 516-524.

Zlotkin, E., M. Gurevitz and A. Shulov. 1973. The toxic effect of prophenoloxidase from the haemolymph of tenebrionid beetles. **J. Insect Physiol**. 19: 1057-1065.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ de Man, Rogosa and Sharpe (MRS)

Glucose	20	กรัม
Peptone	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Beef extract	10	กรัม
Tween 80	1	กรัม
K_2HPO_4	2	กรัม
Sodium acetate	5	กรัม
Triammoniumcitrate	2	กรัม
$MgSO_4$	0.2	กรัม
$MnSO_4$	0.2	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร
Agar	15	กรัม

หมายเหตุ : นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Thio-sulphate Citrate Bile Salt Sucrose (TCBS)

TCBS agar	88	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

หมายเหตุ : ต้มอาหารเลี้ยงเชื้อในน้ำเดือด เป็นเวลา 1-2 นาที

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar (PCA)

Plate count agar	23.5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

หมายเหตุ : นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

อาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปที่ใช้ในการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม

อาหารกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูปชนิดเม็ดจม สำหรับกุ้งก้ามกรามน้ำหนัก 12 กรัมขึ้นไป มีส่วนประกอบดังนี้ ปลาป่น ปลาหมึกป่น ไส้ปลาหมึกป่น เปลือกกุ้งป่น กากถั่วเหลือง ปลายข้าว แป้งสาลี โมโนแคลเซียมฟอสเฟต เกลือ วิตามิน แร่ธาตุ กรดอะมิโน และสารถนอมคุณภาพอาหารสัตว์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

คุณภาพของอาหารทางเคมี

โปรตีน	ไม่น้อยกว่า	25%
ไขมัน	ไม่น้อยกว่า	3%
กาก	ไม่มากกว่า	6%
ความชื้น	ไม่มากกว่า	12%

หมายเหตุ : อบแห้งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นอบอาหารให้แห้ง

การเตรียมสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด

1. 10% sodium citrate in RPMI

เตรียมจาก sodium citrate 10 กรัม ละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 100 มิลลิลิตร

การเตรียมสารเคมีในการวิเคราะห์ Prophenoloxidase activity

1. สารละลาย L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA)

เตรียมจาก L-dihydroxyphenylalanine 4 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร

2. สารละลาย 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES)

เตรียมจาก HEPES 238.30 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร และปรับสารละลายเป็น pH 7.5 ด้วย potassium hydroxide pellets

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การเตรียมสารเคมีในการวิเคราะห์โปรตีน

1. Reagent a (1% Na_2CO_3 ใน 0.5% NaOH)

เตรียมจาก NaOH 2 กรัม ละลายในน้ำ deionize sterilized 100 มิลลิลิตร จากนั้นเติม Na_2CO_3 1 กรัม คนให้ละลายจนหมด

2. Reagent b (0.5% $CuSO_4.5H_2O$)

เตรียมจาก $CuSO_4$ 0.015 กรัม ละลายในน้ำ deionize sterilized 3 มิลลิลิตร

3. Reagent c (1% NaKtatrate)

เตรียมจาก NaKtatrate 0.03 กรัม ละลายในน้ำ deionize sterilized 3 มิลลิลิตร

4. Reagent d (Solution I)

Reagent a 50 มิลลิลิตร ผสมกับ Reagent b 500 ไมโครลิตร และ Reagent c 500 ไมโครลิตร

4. Folin reagent (Solution II)

เตรียมจาก Folin 1 ส่วน ผสมกับน้ำกลั่น 10 ส่วน เก็บในตู้เย็น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

<u>การเตรียมสารเคมีในการวิเคราะห์ Phagocytotic index activity</u>

1. สารละลาย Shrimp saline

NaCl	28.40	กรัม
$MgCl_2.6H_20$	10.00	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	2.00	กรัม
$CaCl_2.H_2O$	2.25	กรัม
KCl	0.70	กรัม
Glucose	1.00	กรัม
HEPES	2.38	กรัม

ผสมสารละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร และกรองด้วยกระดาษกรอง 0.22 ไมโครเมตร บรรจุในขวดสีชาที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. Heat – Killed yeast

2.1 นำ Baker's yeast 0.5 กรัม ละลายใน 0.9 % NaCl 250 มิลลิลิตร แล้วต้มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ระหว่างต้มคนตลอดเวลาเพื่อไม่ให้ยีสต์ไหม้ ทิ้งให้เย็น ตกตะกอน เทน้ำส่วนบนทิ้ง

2.2 หลังจากนั้นทำการล้างด้วย Shrimp saline 5 มิลลิลิตร เหวี่ยงให้ตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายส่วนบนทิ้ง ทำการล้างทั้งสิ้น 5 ครั้ง

2.3 นำเซลล์ยีสต์ที่ได้ละลายด้วย Shrimp saline อัตราส่วน 1:1 แล้วนับปริมาณเซลล์ยีสต์ด้วย Hemacytometer เพื่อให้ได้สายละลายที่มีเซลล์ยีสต์ปริมาณ 5×10^8 CFU/ml จากนั้นเก็บในตู้เย็น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การคำนวณปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมด (Total Haemocytes Count)

ปริมาณของ Hemacytometer = กว้าง x ยาว x สูง

= 1 mm x 1 mm x 0.1 mm

= 0.1 mm^3

จำนวนเซลล์เม็ดเลือด / mm^3 = เซลล์เม็ดเลือดที่นับได้

จำนวนเซลล์เม็ดเลือด / ml^3 = เซลล์เม็ดเลือดที่นับได้ x 10^4 x ค่า dilution

การคำนวณหน่วยของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส

Phenoloxidase activity = unit/min/mg protein

กำหนดให้ ค่า OD ที่เปลี่ยนแปลงไป 0.001 เท่ากับ 1 หน่วย (unit)

การคำนวณ Percent phagocytosis

$$\% \text{ Phagocytosis} = \frac{\text{เซลล์ทั้งหมดที่กลืนกินเซลล์ยีสต์}}{\text{จำนวนเซลล์เม็ดเลือดทั้งหมด}} \times 100$$

การคำนวณสมรรถภาพการผลิต

1. น้ำหนักเพิ่มเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (weight gain, WG)

WG (กรัม) = น้ำหนักกุ้งเมื่อสิ้นสุดการทดลอง – น้ำหนักกุ้งเริ่มต้นการทดลอง

2. อัตราการเจริญเติบโต (average daily gain, ADG)

$$\text{ADG} = \frac{\text{น้ำหนักกุ้งที่เพิ่มขึ้น}}{\text{ระยะเวลาที่เลี้ยง}}$$

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนัก (feed conversion ratio, FCR)

$$FCR = \frac{\text{น้ำหนักอาหาร (แห้ง) ที่กุ้งกิน}}{\text{น้ำหนักกุ้งที่เพิ่มขึ้น}}$$

4. อัตรารอด (survival rate : % SR)

$$\%\ SR = \frac{\text{จำนวนกุ้งเมื่อสิ้นสุดการทดลอง}}{\text{จำนวนกุ้งเมื่อเริ่มต้นทดลอง}} \times 100$$

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวชมพูนุท แก้วใจรักษ์
วัน เดือน ปี ที่เกิด	8 ตุลาคม 2528
สถานที่เกิด	อ. เมือง จ. นนทบุรี
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (สัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร) มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตสารสนเทศเพชรบุรี จ. เพชรบุรี (2551)
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์