ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ)

ปริญญา

เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ
สาขา	**ภาควิชา**

เรื่อง การใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius)

Application of Microorganism as Probiotic in Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius) Culture

นามผู้วิจัย นางสาวนิตยา ยิ้มเจริญ

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ .....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์นนทวิทย์ อารีย์ชน, Ph.D.)

กรรมการ .....
(อาจารย์ชุมพล ศรีทอง, วท.ม.)

กรรมการ .....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์นิติ ชูเชิด, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา .....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์วราห์ เทพาหุดี, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....
(รองศาสตราจารย์วินัย อาจคงหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 20 **เดือน** มิ.ย. **พ.ศ.** 2549

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius)

Application of Microorganism as Probiotic in Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius) Culture

โดย

นางสาวนิตยา ยิ้มเจริญ

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ)
พ.ศ. 2549

ISBN 974-16-1520-5

นิตยา ยิ้มเจริญ 2549: การใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius) ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ) สาขาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ประธานกรรมการที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นนทวิทย์ อารีย์ชน, Ph.D. 82 หน้า

ISBN 974-16-1520-5

การทดลองใช้โปรไบโอติกชนิด *Bacillus subtilis* และ *B. licheniformis* ซึ่งแยกได้จากลำไส้กุ้งกุลาดำ ผสมอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำเป็นเวลา 1 เดือน พบว่าการใช้ *B. subtilis* ร่วมกับ *B. licheniformis* ในอัตราส่วน 1:1 ที่ 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีผลทำให้ระดับภูมิคุ้มกันสูงขึ้นกว่ากลุ่มอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติกทุกกลุ่มทดลองมีจำนวนเชื้อ *Vibrio* spp. ในลำไส้น้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมพบว่า กุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกชนิด *B. subtilis* และ *B. licheniformis* ที่ 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ทุกวันเป็นระยะเวลา 1 เดือน มีระดับภูมิคุ้มกันสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับวันเว้นวัน และกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติกทุกกลุ่มทดลองมีจำนวนเชื้อ *Vibrio* spp. ในลำไส้น้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และพบว่าระดับภูมิคุ้มกันสูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัดหลังจากหยุดให้ 1 สัปดาห์แล้วค่อย ๆ ลดลงเท่ากับกลุ่มควบคุมในสัปดาห์ที่ 2 และเมื่อให้อาหารผสมโปรไบโอติกอีกครั้งพบว่ากุ้งมีระดับภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ และจำนวนเชื้อ *Vibrio* spp. ในลำไส้มีจำนวนลดลง จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าการใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกชนิด *B. subtilis* และ *B. licheniformis* ที่ 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีผลในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันและลดปริมาณเชื้อก่อโรคสกุล *Vibrio* ในลำไส้ของกุ้งกุลาดำได้เป็นอย่างดี โดยควรให้จุลินทรีย์ดังกล่าวอย่างต่อเนื่องในระหว่างการเลี้ยง

นิตยา ยิ้มเจริญ
ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อประธานกรรมการ

10 / เม.ย / 2549

Nittaya Yimjaroen 2006: Application of Microorganism as Probiotic in Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius) Culture. Master of Science (Aquaculture), Major Field: Aquaculture, Department of Aquaculture. Thesis Advisor: Assistant Professor Nontawith Areechon, Ph.D. 82 pages.
ISBN 974-16-1520-5

Application of *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis*, isolated from the intestine of black tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius), as probiotic was investigated. After feeding with probiotic, it was found that black tiger shrimp that were raised with the combination of *B. subtilis* and *B. licheniformis* (1:1) at 3 g/kg diet had significantly enhanced immune functions compared to other treatments and control ($P<0.05$). All treatment groups fed with probiotic supplemented feed showed significantly fewer number of *Vibrio* spp. in the intestine when compared to the control ($P<0.05$). In addition, the optimum time of probiotic application as every day and once in two days was investigated during the one month period. It was found that every day application showed significantly higher immune levels than once in two days application and the control ($P<0.05$). Again, *Vibrio* spp. were significantly reduced in all probiotic group compared to the control. It is quite interesting to notice that after one month of probiotic application for every day, most immune parameters would reach the peak after one week of normal feed and would drop to the same level of the control after the second week. And when the application of probiotic was repeated, the immune parameters would be enhanced again. The results from this research promptly suggest that the application of *B. subtilis* and *B. licheniformis* as probiotic could significantly enhance the immunity and reduce the amount of pathogenic *Vibrio* in the intestine of black tiger shrimp with continuous usage during the cultivation.

Nittaya Yimjaroen — Student's signature

Thesis Advisor's signature — 10 / 01 / 2006

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์นนทวิทย์ อารีย์ชน, Ph.D. ประธานกรรมการที่ปรึกษา ที่ได้ช่วยเหลือในการวางแผนงานวิจัย ตลอดจนให้คำปรึกษาและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ชุมพล ศรีทอง, วท.ม. กรรมการวิชาเอก ผู้ช่วยศาสตราจารย์นิติ ชูเชิด, Ph.D. กรรมการวิชารอง และ อาจารย์ศรัณย์ เพ็ชร์พิรุณ, Ph.D. ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่ให้ความกรุณาแนะนำตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้เสร็จสมบูรณ์ยิ่งขึ้น และขอขอบพระคุณ อาจารย์วัชริยา ภูรีวิโรจน์กุล และ อาจารย์ประพันธ์ศักดิ์ ศิรษะภูมิ, Ph.D. ที่กรุณาให้คำปรึกษาและความรู้เกี่ยวกับการทำงานวิจัยในครั้งนี้เป็นอย่างดี พร้อมทั้งคำแนะนำที่ดีในเรื่องอื่น ๆ นอกเหนือจากเรื่องงานวิจัย

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ และสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่สนับสนุนทุนในการทำงานวิจัยในครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ทำให้มีวันนี้ รวมทั้งสิ่งดี ๆ และกำลังใจที่มอบให้ตลอดมา ขอบพระคุณน้าชัยวัฒน์ น้าไพศาล ลิมปนะวรรณกุล คุณวสันต์ ทองนพคุณ ตลอดจนเพื่อน ๆ และพี่ ๆ ห้องปฏิบัติการสุขภาพสัตว์น้ำ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำในการทำงานวิจัยในครั้งนี้ จนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์

นิตยา ยิ้มเจริญ

เมษายน 2549

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
กุ้งกุลาดำ	4
ระบบภูมิคุ้มกันโรคของกุ้ง	6
โรคที่เกิดกับกุ้งกุลาดำ	12
โปรไบโอติก	15
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	23
อุปกรณ์และสารเคมี	23
วิธีการทดลอง	26
สถานที่ ระยะเวลา และแหล่งเงินทุนสนับสนุนในการทำวิจัย	34
ผลการทดลอง	35
วิจารณ์ผลการทดลอง	60
สรุปผลการทดลอง	65
ข้อเสนอแนะ	66
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	67
ภาคผนวก	76

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	17
2	น้ำหนักของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติกตามชนิดและระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 1 เดือน	35
3	ปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมด (Total Haemocytes Count) ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติกตามชนิดและระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 1 เดือน	37
4	กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase Activity) ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติกตามชนิดและระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 1 เดือน	38
5	Percent Phagocytosis ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติกตามชนิดและระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 1 เดือน	39
6	Phagocytic Index ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติกตามชนิดและระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 1 เดือน	40
7	Bactericidal Activity ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติกตามชนิดและระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 1 เดือน	41
8	Total *Vibrio* Count ของลำไส้กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติกตามชนิดและระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 1 เดือน	42
9	Total *Bacillus* Count ของลำไส้กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติกตามชนิดและระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 1 เดือน	44
10	น้ำหนักของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติก(*B. subtilis* ร่วมกับ *B. licheniformis* 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม) เป็นระยะเวลา 1 เดือน แล้วให้อาหารปกติเป็นเวลา 2 สัปดาห์ จึงให้อาหารผสมโปรไบโอติกครั้งที่ 2	47
11	Total Haemocytes Count ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติก (*B. subtilis* ร่วมกับ *B. licheniformis* 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม) เป็นระยะเวลา 1 เดือน แล้วให้อาหารปกติเป็นเวลา 2 อาทิตย์จึงให้อาหารผสมโปรไบโอติกครั้งที่ 2	48

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

12 Phenoloxidase Activity ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติก (*B. subtilis* ร่วมกับ *B. licheniformis* 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม) เป็นระยะเวลา 1 เดือน แล้วให้อาหารปกติเป็นเวลา 2 อาทิตย์จึงให้อาหารผสมโปรไบโอติกครั้งที่ 2 50

13 Percent Phagocytosis ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติก (*B. subtilis* ร่วมกับ *B. licheniformis* 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม) เป็นระยะเวลา 1 เดือน แล้วให้อาหารปกติเป็นเวลา 2 อาทิตย์จึงให้อาหารผสมโปรไบโอติกครั้งที่ 2 52

14 Phagocytic Index ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติก (*B. subtilis* ร่วมกับ *B. licheniformis* 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม) เป็นระยะเวลา 1 เดือน แล้วให้อาหารปกติเป็นเวลา 2 อาทิตย์จึงให้อาหารผสมโปรไบโอติกครั้งที่ 2 53

15 Bactericidal Activity ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติก (*B. subtilis* ร่วมกับ *B. licheniformis* 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม) เป็นระยะเวลา 1 เดือน แล้วให้อาหารปกติเป็นเวลา 2 อาทิตย์จึงให้อาหารผสมโปรไบโอติกครั้งที่ 2 54

16 Total *Vibrio* Count ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติก (*B. subtilis* ร่วมกับ *B. licheniformis* 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม) เป็นระยะเวลา 1 เดือน แล้วให้อาหารปกติเป็นเวลา 2 อาทิตย์จึงให้อาหารผสมโปรไบโอติกครั้งที่ 2 55

17 Total *Bacillus* Count ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติก (*B. subtilis* ร่วมกับ *B. licheniformis* 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม) เป็นระยะเวลา 1 เดือน แล้วให้อาหารปกติเป็นเวลา 2 อาทิตย์จึงให้อาหารผสมโปรไบโอติกครั้งที่ 2 57

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ความสัมพันธ์ระหว่างกุ้งกุลาดำ สิ่งแวดล้อมในบ่อเลี้ยงกุ้ง และเชื้อโรค รวมทั้งวิธีการที่ใช้ในการจัดการของแต่ละปัจจัย	14
2	ปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมด (Total Haemocytes Count) ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติกตามชนิดและระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 1 เดือน	37
3	กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส(P henoloxidase Activity) ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติกตามชนิดและระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 1 เดือน	38
4	Percent Phagocytosis ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติกตามชนิดและระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 1 เดือน	39
5	Phagocytic Index ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติกตามชนิดและระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 1 เดือน	40
6	Total *Vibrio* Count ของลำไส้กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติกตามชนิดและระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 1 เดือน	43
7	Total *Bacillus* Count ของลำไส้กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติกตามชนิดและระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 1 เดือน	44
8	ลำไส้ของกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม B. *subtilis* ร่วมกับ B. *licheniformis* 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เป็นระยะเวลา 1 เดือน ที่ส่องภายใต้กล้อง Scanning Electron Microscope (SEM)	45
9	ลำไส้ของกุ้งกลุ่มควบคุมที่ส่องภายใต้กล้อง Scanning Electron Microscope (SEM)	46
10	Total Haemocytes Count ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติก (*B. subtilis* ร่วมกับ *B. licheniformis* 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม) เป็นระยะเวลา 1 เดือน แล้วให้อาหารปกติเป็นเวลา 2 อาทิตย์จึงให้อาหารผสมโปรไบโอติกครั้งที่ 2	49

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

11 Phenoloxidase Activity ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติก (*B. subtilis* ร่วมกับ *B. licheniformis* 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม) เป็นระยะเวลา 1 เดือน แล้วให้อาหารปกติเป็นเวลา 2 อาทิตย์จึงให้อาหารผสมโปรไบโอติกครั้งที่ 2 50

12 Percent Phagocytosis ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติก (*B. subtilis* ร่วมกับ *B. licheniformis* 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม) เป็นระยะเวลา 1 เดือน แล้วให้อาหารปกติเป็นเวลา 2 อาทิตย์จึงให้อาหารผสมโปรไบโอติกครั้งที่ 2 52

13 Phagocytic Index ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติก(*B. subtilis* ร่วมกับ *B. licheniformis* 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม) เป็นระยะเวลา 1 เดือน แล้วให้อาหารปกติเป็นเวลา 2 อาทิตย์จึงให้อาหารผสมโปรไบโอติกครั้งที่ 2 53

14 Total *Vibrio* Count ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติก (*B. subtilis* ร่วมกับ *B. licheniformis* 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม) เป็นระยะเวลา 1 เดือน แล้วให้อาหารปกติเป็นเวลา 2 อาทิตย์จึงให้อาหารผสมโปรไบโอติกครั้งที่ 2 56

15 Total *Bacillus* Count ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติก (*B. subtilis* ร่วมกับ *B. licheniformis* 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม) เป็นระยะเวลา 1 เดือน แล้วให้อาหารปกติเป็นเวลา 2 อาทิตย์จึงให้อาหารผสมโปรไบโอติกครั้งที่ 2 57

16 ลำไส้ของกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม B. *subtilis* ร่วมกับ B. *licheniformis* 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ทุกวันเป็นระยะเวลา 1 เดือน ที่ส่องภายใต้กล้อง Scanning Electron Microscope (SEM) 58

17 ลำไส้ของกุ้งกลุ่มควบคุมที่ส่องภายใต้กล้อง Scanning Electron Microscope (SEM) 59

18 ลำไส้ของกุ้งกลุ่มควบคุมที่ส่องภายใต้กล้อง Scanning Electron Microscope (SEM) 59

ภาพผนวกที่

1 มาตรฐานโปรตีน (Bovine serum albumin) 82

การใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius)

Application of Microorganism as Probiotic in Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius) Culture

คำนำ

ปัจจุบันการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius) ของประเทศไทยประสบกับปัญหาหลายประการตั้งแต่การขาดแคลนพ่อแม่พันธุ์กุ้งที่มีคุณภาพ ปัญหากุ้งโตช้า ขนาดไม่สม่ำเสมอ อัตราการรอดตายต่ำ ปัญหาการเกิดโรคทั้งที่เกิดจากเชื้อไวรัส และเชื้อแบคทีเรีย เกษตรกรส่วนใหญ่จึงหันไปเลี้ยงกุ้งขาวแทน (*Litopenaeus vannamei*) เพราะเป็นกุ้งที่ผ่านการพัฒนาทางสายพันธุ์เป็นเวลานาน ทำให้ใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงสั้น อัตราการรอดสูง อย่างไรก็ตามยังมีเกษตรบางส่วนยังคงเลี้ยงกุ้งกุลาดำอยู่ โดยปล่อยกุ้งในอัตราต่ำลง โดยหวังว่าเมื่อทำให้สภาพแวดล้อมในบ่อดี กุ้งไม่เครียด และแข็งแรง แต่ผลที่ได้กลับไม่แน่นอน เกษตรกรส่วนใหญ่ยังคงประสบปัญหากุ้งโตช้าและอัตรารอดตายต่ำอย่างต่อเนื่อง เกษตรกรจึงพยายามแก้ปัญหาโดยใช้ยาปฏิชีวนะโดยไม่มีการควบคุมชนิดและปริมาณของยาให้เหมาะสม ส่งผลโดยตรงกับกุ้งคือ การที่กุ้งได้รับยาปฏิชีวนะเป็นเวลานาน ส่งผลให้เชื้อเกิดการดื้อยา ทำให้มีการใช้ยาปฏิชีวนะในปริมาณเท่าเดิมไม่ได้ผลเท่าที่ควร นอกจากยังทำให้เกิดปัญหาการตกค้างของยาปฏิชีวนะในกุ้งส่งออก ซึ่งปัจจุบันประเทศผู้ซื้อกุ้งเพิ่มความเข้มงวดในการตรวจสอบ และพัฒนาวิธีการตรวจสอบให้ทันสมัย สามารถตรวจสอบปริมาณสารตกค้างได้ แม้ในระดับความเข้มข้นที่ต่ำมาก ซึ่งการตกค้างของยาปฏิชีวนะในเนื้อกุ้งนั้นอาจทำให้ผู้บริโภคมีการสะสมสารปฏิชีวนะนั้น ๆ ในระยะยาว ซึ่งสารบางชนิดเมื่อเข้าสู่ร่างกายแล้วอาจถูกเปลี่ยนเป็นสารที่มีความเป็นพิษสูงกว่าสารตั้งต้น หรืออาจเป็นสารก่อมะเร็งได้ (วลัยพร, 2544)

การแก้ไขปัญหาดังกล่าวข้างต้นนอกจากการจัดการระหว่างการเลี้ยงให้ถูกต้องแล้ว การใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกจะเป็นทางเลือกหนึ่ง โดยการเลือกใช้แบคทีเรียกลุ่มที่มีประโยชน์ต่อกุ้งเช่น *Lactobacillus* spp., *Bacillus* spp. และ *Pseudomonas fluorescens* (Smith and Davey, 1993; Byun *et al.,* 1997; Moriarty, 1998) เป็นต้น ในการช่วยลดปริมาณเชื้อก่อโรค โดยสร้างความสมดุลย์ของจุลินทรีย์รอบตัวกุ้งและจุลินทรีย์ประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหาร ซึ่งจุลินทรีย์ที่นำมาใช้เป็น

โปรไบโอติกต้องมีประสิทธิภาพหลายประการด้วยกัน คือเป็นสายพันธุ์ที่ทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม เจริญได้ทุกสภาวะ มีความสามารถในการต่อต้านแบคทีเรียก่อโรค เมื่อเข้าสู่ตัวกุ้งสามารถเจริญและยึดเกาะในลำไส้ได้ ทำให้กุ้งมีความต้านทานโรค โดยที่ผ่านมามีการใช้โปรไบโอติกกันมากในสัตว์บก โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อการเพิ่มน้ำหนักและการกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้ทำงานดีขึ้น ส่วนในการเลี้ยงสัตว์น้ำโดยเฉพาะในกุ้งมีการใช้กันอย่างแพร่หลาย แต่ยังขาดการศึกษาในเชิงวิชาการในการประยุกต์ใช้ ดั้งนั้นจึงศึกษาการใช้โปรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาชนิด ระดับความเข้มข้น และระยะเวลาที่เหมาะสมต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาชนิดและระดับความเข้มข้นของจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่เหมาะสมในการผสมอาหารเพื่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ

2. เพื่อศึกษาระยะเวลาการให้จุลินทรีย์โปรไบโอติกที่เหมาะสมในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ

3. เพื่อศึกษาผลของจุลินทรีย์โปรไบโอติกต่อปริมาณเชื้อ *Vibrio* spp. ในทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำ

การตรวจเอกสาร

กุ้งกุลาดำ

อนุกรมวิธานของกุ้งกุลาดำ

กุ้งกุลาดำมีชื่อสามัญที่แตกต่างกันไปตามแต่ละท้องถิ่น เช่น กุ้งกุลาดำ กุ้งกุลา กุ้งกะลา กุ้งเสือดำ กุ้งเสือ กุ้งลาย เป็นต้น มีชื่อภาษาอังกฤษว่า Giant black tiger prawn และมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Penaeus monodon* Fabricius, 1798 เป็นกุ้งที่อยู่ในอนุกรมวิธานดังนี้

Phylum Arthropoda
Class Crustacea
Subclass Malacostraca
Order Decapoda
Suborder Dendrobranchiae
Superfamily Penaeoidea
Family Penaeidae
Genus *Penaeus*
Species *monodon* (ประจวบ, 2530)

ลักษณะทั่วไป

บุญรัตน์ (2545) อธิบายว่ากุ้งกุลาดำ มีกรียาวเรียวโค้งขึ้น ปลายกรีสิ้นสุดบริเวณปลายก้านหนวดคู่ที่ 1 ขอบด้านบนมีฟัน 7 ถึง 8 ซี่ ขอบด้านล่างมีฟัน 3 ซี่ สันหลังกรียาวเกือบถึงด้านหลังเปลือกคลุมหัว ลำตัวมีสีซึ่งอาจเปลี่ยนแปลงได้ ตามขนาดหรือสภาพแวดล้อม เช่น สีน้ำตาลเข้มแถบน้ำเงิน สีแดงคล้ำ บริเวณปล้องท้อง จะมีแถบสีดำหรือเทาเข้มพาดขวางสลับกับสีขาว ขาว่ายน้ำมีสีน้ำตาลปนน้ำเงินส่วนโคนมีแต้มสีขาว ส่วนปลายมีขนสีแดงอยู่โดยรอบ ขาเดินมีสีแดงดำ มีสีขาวอยู่ปลายแพนหางและหางมีสีเดียวกับลำตัว หนวดคู่ที่ 2 มีสีดำ มีลายแต่เห็นไม่ชัดเจน

การแพร่กระจายของกุ้งกุลาดำ

กุ้งกุลาดำเป็นสัตว์น้ำที่สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมที่ดี กล่าวกันว่ากุ้งกุลาดำสามารถเจริญเติบโตได้ดีในแหล่งน้ำกร่อย ในธรรมชาติพบแพร่กระจายอยู่ทั่วไปในทวีปเอเชียโดยมีชุกชุมในประเทศอินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ ไทย มาเลเซีย อินเดีย ออสเตรเลีย และไต้หวัน ประเทศไทยพบแพร่กระจายอยู่ทั่วอ่าวไทย โดยเฉพาะบริเวณนอกฝั่งจังหวัดชุมพรถึงจังหวัดนครศรีธรรมราช บริเวณเกาะช้าง ส่วนทางฝั่งมหาสมุทรอินเดีย (ทะเลอันดามัน) พบมากบริเวณจังหวัดภูเก็ต และระนอง (สุวิทย์, 2531)

อาหารและการกินอาหารของกุ้งกุลาดำ

กุ้งกุลาดำจัดเป็นสัตว์ประเภทที่กินอาหารได้ทั้งพืชและสัตว์หลายประเภท เช่น เนื้อปลา เนื้อหอย กากถั่ว แต่การเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบพัฒนา จำเป็นต้องใช้อาหารเม็ดที่มีธาตุอาหารและคุณค่าที่พอเหมาะกับการเจริญเติบโตของกุ้งเป็นหลัก เพื่อให้กุ้งมีอัตราการเจริญเติบโต อัตราการแลกเนื้อและผลผลิตสูงสุด อาหารต้องมีกลิ่นและรสชาติที่กุ้งชอบ มีลักษณะจม มีขนาดพอเหมาะที่กุ้งจะคีบกัดกินแทะได้สะดวก มีความแข็งคงทนในน้ำได้อย่างน้อย 2-4 ชั่วโมงเนื่องจากกุ้งมีพฤติ-กรรมแย่งอาหารและครอบครองอาหาร ดังนั้นในการให้อาหารกุ้งต้องหว่านให้กระจายทั่วบ่อ เพื่อป้องกันการไม่ได้รับอาหารอย่างทั่วถึง และโดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อกุ้งบางตัวลอกคราบจะมีโอกาสถูกกุ้งที่แข็งแรงกว่ากัดกินเป็นอาหารได้หากไม่ได้รับอาหารที่ให้ (บุญรัตน์, 2545)

นิพนธ์ (2522) อธิบายว่าอาหารกุ้งที่ดีควรมีเนื้อละเอียดเพื่อให้กุ้งย่อยและดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้ง่าย ควรมีองค์ประกอบโปรตีน 35-45 เปอร์เซ็นต์ จากหัวกุ้ง ปลาหมึกป่น เนื้อหอย ปลาป่น คาร์โบไฮเดรต 30-40 เปอร์เซ็นต์ จากรำ กากถั่วเหลือง ปลายข้าว ไขมัน 6-9 เปอร์เซ็นต์ จากน้ำมันปลา น้ำมันหัวกุ้ง เยื่อใย 3-4 เปอร์เซ็นต์จากวัตถุอาหารที่ผสม และวิตามินหรือวิตามินผสม 1 เปอร์เซ็นต์จากวัตถุอาหารที่ผสม นอกจากนี้ควรมีสารกันหืน และสารเหนียวในปริมาณที่พอเหมาะ

ระบบภูมิคุ้มกันโรคของกุ้ง

สิ่งมีชีวิตกลุ่มครัสเตเชี่ยน (Crustaceans) ไม่มีระบบภูมิคุ้มกันโรคแบบเฉพาะเจาะจง ซึ่งทำงานโดยแอนติบอดี้ (antibody) แต่การป้องกันตัวของสัตว์น้ำกลุ่มนี้เป็นแบบไม่จำเพาะเจาะจง (non-specific immune response) ซึ่งส่วนใหญ่เกิดจากกิจกรรมของเม็ดเลือด น้ำเลือด และเนื้อเยื่อต่าง ๆ ในร่างกาย (Soderhall and Cerenius, 1992) ระบบภูมิคุ้มกันโรคของกุ้งสามารถแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ

1. ระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์ (cellular immunity) เซลล์ที่มีบทบาทสำคัญคือเซลล์เม็ดเลือด 3 ชนิด คือ ไฮยาลีนเซลล์ (hyaline cell) เซมิกรานูลาร์ (semi granular) ลาร์จกรานูลาร์ (large granular) ที่เป็นอิสระและเซลล์จับกินที่อยู่กับที่ (fix phagocyte) กระจายอยู่ตามเนื้อเยื่อ เหงือก ต่อมน้ำเหลือง หัวใจ และเนื้อเยื่อเกี่ยวพันต่าง ๆ ซึ่งมีหน้าที่ในการจับกินเชื้อโรค (phagocytic activity) และ การห้อมล้อมและกำจัดสิ่งแปลกปลอม (nodule formation and encapsulation) (Sindermann, 1971; Rabin, 1970)

2. ระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด (humoral immunity) ระบบนี้เกิดจากการทำงานของหลาย ๆ ปฏิกิริยา เช่น การเกิดการแข็งตัวของเลือด (blood clotting) การเกิดเมลานิน (melanin formation) และ opsonization ระบบที่สำคัญคือโปรฟีนอลออกซิเดสแอกติเวติ้งซิสเตม (prophenol oxidase activating system)และเลคติน (lectin) ซึ่งคอยดักจับสิ่งแปลกปลอม (Sindermann, 1971 ; Rabin, 1970)

ชนิดและหน้าที่ของเซลล์เม็ดเลือดในกุ้งทะเล

เซลล์เม็ดเลือด (haemocytes) ของครัสเตเชี่ยนแบ่งออกเป็น 3 ชนิด ซึ่งแบ่งโดยใช้การมีหรือไม่มี จำนวน ขนาด การย้อมสีและโครงสร้างของกรานูลภายในเซลล์เป็นหลัก คือ

1. ไฮยาลินเซลล์ (hyaline cell)

เป็นเซลล์เม็ดเลือดที่มีขนาดเล็กที่สุด รูปร่างแบน กลม ผิวเรียบ บางครั้งอาจพบคล้ายรูปกระสวย หรือพระจันทร์เสี้ยว ขนาดของเซลล์มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 6.4-8.3 ไมครอน (ในกรณีที่เป็นเซลล์กลม) หรือมีความกว้าง 2.5-3.6 ไมครอน ยาว 6.8-13.9 ไมครอน (ในกรณีที่เป็นเซลล์รูปรีหรือรูปกระสวย) (กิจการ และคณะ, 2543ข) มีนิวเคลียสขนาดใหญ่อยู่ตรงกลางเซลล์ มี mitochondria,

smooth endoplasmic reticulum (SER) และ rough endoplasmic reticulum (RER) น้อย พบ cytoplasmic granules เพียงเล็กน้อยหรือไม่มีเลย (Sternshein and Burton, 1980 ; Bauchau, 1981 ; Tsing *et al.*, 1989) มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการจับกินสิ่งแปลกปลอม หรือ phagocytosis (Soderhall and Cerenius, 1992)

2. เซลล์เซมิกรานูลาร์ (semigranular cell)

เซลล์มีรูปร่างเป็นรูปไข่หรือรูปกระสวย ขนาดของเซลล์มีความกว้าง 4.2-6.8 ไมครอน และยาว 9.0-14.2 ไมครอน (กิจการ และคณะ, 2543ข) นิวเคลียสอยู่ตรงกลางหรือขอบ พบ SER และ RER ได้มาก มีไซโตพลาสมิกกรานูลมากขึ้น บริเวณผิวเซลล์อาจพบไมโครวิลไลได้เล็กน้อย ลักษณะของกรานูลภายในไซโตพลาสซึม มีขนาดเล็กและพบจำนวนน้อย สังเกตเห็นได้ไม่ชัดเจนจากผิวภายนอก (Sternshein and Burton, 1980 ; Bauchau, 1981 ; Tsing *et al.*, 1989) ทำหน้าที่โดยตรงในการสร้าง nodule formation และ encapsulation รวมทั้งในระบบ Prophenoloxidase (Soderhall and Cerenius, 1992)

3. เซลล์ลาร์จกรานูลาร์ (large granular cell)

เซลล์มีขนาดใหญ่ที่สุด รูปร่างเป็นรูปไข่ คล้ายกับเซลล์เซมิกรานูล แต่ขนาดของเซลล์จะโตกว่า ขนาดของเซลล์มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 8-10 ไมครอน ความยาว 12.2-14.6 ไมครอน และความกว้าง 7.2-7.8 ไมครอน (กิจการ และคณะ, 2543ข) นิวเคลียสอยู่บริเวณขอบ มี SER และ RER ปานกลาง และพบไซโตพลาสมิกกรานูลมาก ขนาดของกรานูลในไซโตพลาสซึมมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7-1.0 ไมครอนซึ่งใหญ่กว่ากรานูลในเซมิกรานูล (Sternshein and Burton, 1980 ; Bauchau, 1981 ; Tsing *et al.*, 1989) มีหน้าที่หลักในการทำงานในระบบโปรฟีนอลออกซิเดส (Soderhall and Cerenius, 1992)

ระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์ (cellular immunity)

Phagocytosis

กระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม เป็นกระบวนการที่สำคัญของเม็ดเลือดในการทำลายหรือลบล้างสิ่งแปลกปลอมทั้งที่มีชีวิต และไม่มีชีวิตที่บุกรุกเข้าไปในร่างกายซึ่งเป็นแบบไม่เฉพาะเจาะจง (McKay and Jenkin, 1970) ขั้นตอนในการกลืนกินจะมีลักษณะเช่นเดียวกับสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง (Ratcliffe *et al.*, 1985) เริ่มจากการยึดกันระหว่างสิ่งแปลกปลอมกับผิวของเซลล์ หลังจากนั้นผิวของเซลล์จะเว้าเข้าไป เกิดเป็นฟาโกโซม (phagosome) และจะสัมผัสกับไลโซโซม (lysosome) ที่อยู่ภายในเซลล์ ภายในไลโซโซมบรรจุเอนไซม์หลายชนิดที่เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายเรียกว่า acid hydrolases ซึ่งรวมถึงเอนไซม์ DNases, RNases, proteases, phosphatases และ lipases ที่สามารถไปลดขนาดของโมเลกุลสิ่งแปลกปลอมทั้งหลายให้เหลือเป็นหน่วยย่อย ๆ เมื่อเซลล์ฟาโกไซท์รวมกับไลโซโซม จะเกิดเป็นฟาโกไลโซโซม (phagolysosome) และมีการแตกตัวของออกซิเจน (oxygen burst) น้ำตาลที่ถูกเก็บสะสมไว้ ที่ใช้ในการสร้าง NADPH จะรวมเข้ากับออกซิเจน เกิดเป็น superoxide (O_2^-) และ toxic peroxide (H_2O_2) การแตกตัวของออกซิเจนสามารถที่จะผลิตออกซิเจนในรูปแบบที่เป็นพิษ จำนวนโมเลกุลทั้งหมดจะมีความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาสูง และมีการทำลายอนุภาคภายในฟาโกไลโซโซม โดยกลไกทางเคมีอย่างไม่เฉพาะเจาะจง หลังจากทำการย่อยสลายแล้วก็จะปล่อยส่วนที่ถูกทำลายแล้วออกมาจากเซลล์ (Klein, 1982; Pick and Keisari, 1980)

การเพิ่มจำนวนอิเล็กตรอนโดยมี NADPH เป็นตัวให้อิเล็กตรอนทำให้เกิดอนุภาคต่าง ๆ

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

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

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

ภายในไลโซโซม จะมีค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) เป็นกรด เพราะเยื่อบุผิวของไลโซโซมจะปั๊มไฮโดรเจนไอออน (H^+) เข้าไปในไลโซโซม เพื่อที่จะรักษาระดับค่าความเป็นกรดเป็นด่างให้ได้ 4.8 ซึ่งเป็นค่าความเป็นกรดเป็นด่างที่โปรตีนหลายชนิดเสื่อมสภาพไป (denature) และง่ายต่อการทำให้แตกออก การเป็นกรดนี้จะเป็นการเร่งให้เกิดการสร้างสารประกอบออกซิเจนบางชนิดที่เป็นพิษเช่น peroxide (Pick and Keisari, 1980)

ระยะเวลาในการเกิดกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมสำหรับการแตกตัวของอนุภาคสิ่งแปลกปลอมจะแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่นชนิดของสิ่งแปลกปลอมที่เข้าไป ระดับของการกระตุ้นเซลล์ที่ทำหน้าที่กลืนกินสิ่งแปลกปลอม กระบวนการนี้บางครั้งสามารถเกิดได้ในเวลาไม่กี่ชั่วโมง หรือบางครั้งอาจใช้เวลาเป็นวัน (Sung *et al.*, 1996)

เซลล์และเนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมในกุ้งกุลาดำ

เนื้อเยื่อที่สามารถกำจัดสิ่งแปลกปลอมได้ดีคือ เหงือก ต่อมน้ำเหลือง หัวใจ และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ส่วนกล้ามเนื้อและระบบประสาทกำจัดได้เพียงเล็กน้อย โดยพบเซลล์เม็ดเลือด และเซลล์ที่จับกินอยู่กับที่ทำหน้าที่ในการดักจับสิ่งแปลกปลอมในเนื้อเยื่อดังกล่าว กลไกการกำจัดสิ่งแปลกปลอมเกิดขึ้นโดยเริ่มจากมีเซลล์เดี่ยวเข้ามาล้อมจับแล้วมีเซลล์เม็ดเลือดเข้ามารายล้อมมากขึ้นจนกลายเป็นลักษณะที่เรียกว่า Nodule formation และ Encapsulation สุดท้ายมีการสร้าง melanin ขึ้นและถูกกำจัดออกนอกร่างกาย (กิจการ และคณะ, 2543ก)

Fontaine and Lightner (1974) พบว่าหลังจากฉีดอนุภาคของสีคาร์มีน (carmine) เข้าไปในเนื้อเยื่อกุ้งทะเล (*Penaeus setiferus*) ภายใน 1 ชั่วโมง จะมีการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดเข้ามาห้อมล้อมอนุภาคสี เซลล์ที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดอนุภาคสีก็จะมีทั้งเม็ดเลือด และเซลล์จับกินที่อยู่กับที่ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ โดยอนุภาคสีสามารถตรวจพบคงอยู่ในตัวกุ้งได้นาน 33 วัน

Nodule formation และ Encapsulation

Nodule formation และ Encapsulation เป็นการห้อมล้อมตัวเชื้อหรือสิ่งแปลกปลอม ซึ่งมีวิธีการที่ซับซ้อนมากกว่ากระบวนการ phagocytosis สามารถทำให้สิ่งแปลกปลอมที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคที่มีขนาดใหญ่ หรือมีจำนวนมากถูกกำจัดไป การเกิดโนดูลจะใช้เมื่อมีสิ่งแปลกปลอมเข้ามาเป็นจำนวนมาก ส่วนการห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอมโดยเอนแคปซูเลชั่น จะเกิดเมื่อสิ่งแปลกปลอมนั้นมีขนาดใหญ่ (Smith and Soderhall, 1986)

การเกิดก้อนโนดูล แสดงให้เห็นการรวมตัวของเซลล์เม็ดเลือด เพื่อที่จะโอบล้อมสิ่งแปลกปลอม สิ่งแปลกปลอมจะถูกทำให้เกิดเป็นเมลานิน (melanin) โดยปฏิกิริยาของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส

กระบวนการเอนแคปซูเลชั่น จะคล้ายกับโนดูลฟอร์เมชั่น แต่เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นเพื่อต้านทานต่ออนุภาคที่มีขนาดใหญ่ เช่นเชื้อรา หนอนตัวกลม ไข่ของปรสิต และระยะตัวอ่อน จากการทดลองของ Persson *et al*. (1987) พบว่า เซลล์เม็ดเลือดชนิดเซมิกรานูลเป็นเม็ดเลือดชนิดแรกที่เข้าล้อมรอบสิ่งแปลกปลอมที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางใหญ่กว่า 10 ไมครอน ทำให้เกิดรูปร่างคล้ายแคปซูล

<u>ระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด (humoral immunity)</u>

Blood clotting

การแข็งตัวของเลือดเป็นปฏิกิริยาที่สำคัญทั้งในสัตว์มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลัง เพื่อที่จะป้องกันการสูญเสียเลือดจากบาดแผล เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นโดยเม็ดเลือดชนิดไฮยาลีนเซลล์ปลดปล่อยสารเคมีออกมาไปกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของโคแอคกลูโลเจน (coagulogen) ซึ่งเป็นสารที่ทำให้เกิดการจับตัวเป็นก้อน โดยเป็นโปรตีนหลักเกี่ยวกับการแข็งตัวของเลือดซึ่งอยู่ในน้ำเลือดของ ครัสเตเชี่ยนหลายชนิด ทำให้เกิดการแข็งตัวของเลือด การที่เลือดไม่สามารถแข็งตัวได้ อาจเกิดมาจากการที่เม็ดเลือดชนิดไฮยาลีนเซลล์มีปริมาณลดลงจากการติดเชื้อจุลินทรีย์ (Martin *et al*., 1993)

Prophenoloxidase activating system

Prophenoloxidase activating system เป็นระบบที่สำคัญมากในการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ที่สำคัญ คือ ฟีนอลออกซิเดส (PO) จะอยู่ในรูปของ pro-enzyme ที่เรียกว่า โปรฟีนอลออกซิเดส (proPO) และ เอนไซม์ในกลุ่มเซอรีนโปรติเอส โดยจะทำงานร่วมกันอย่างมีระบบ (Leonard *et al.*, 1985; Soderhall *et al.*, 1994)

กระบวนการที่สำคัญของระบบนี้เริ่มจาก Prophenoloxidase เปลี่ยนเป็น phenoloxidase จะไป oxidize สารกลุ่มฟีนอล (phenol) ให้เป็นสารประกอบควิโนน (uinone) แล้วเปลี่ยนไปเป็นเมลานินได้ในที่สุด หน้าที่ของเมลานินจะช่วยในการยับยั้งหรือป้องกันการเจริญเติบโตของ

เชื้อแบคทีเรีย สารต่อต้านแบคทีเรีย (antibacterial substances) เป็นสารประกอบขั้นสุดท้ายที่ได้จากกระบวนการของระบบโปรฟีนอลออกซิเดส เช่นเดียวกับเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส รวมทั้งคุณสมบัติในการป้องกันการเจริญเติบโตของพวกแบคทีเรียและเชื้อรา (Hose *et al.*, 1987)

Sung *et al.* (1996) พบว่า Prophenoloxidase ของกุ้งกุลาดำ กุ้งก้ามกรามและกุ้งขาว ส่วนใหญ่จะอยู่ในไซโตพลาสซึมของเม็ดเลือดทั้ง semigranulocyte และ granulocyte นอกจากนี้แล้วยังพบเอนไซม์ชนิดนี้มีการแพร่กระจายอยู่ในเนื้อเยื่อหลายส่วนของตัวกุ้ง จากการศึกษาของ กิจการ และคณะ (2543ก) พบว่าความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสที่วิเคราะห์ได้จากเม็ดเลือดและน้ำเลือดกุ้งมีค่าแตกต่างกัน โดยพบปริมาณเอนไซม์ดังกล่าว ค่อนข้างสูงในเม็ดเลือด และปริมาณต่ำในน้ำเลือดกุ้งกุลาดำ

สำหรับการกระตุ้นระบบ Prophenoloxidase activating system นี้สามารถกระตุ้นได้โดย lipopolysaccharide (LPS), peptidoglycan (PG) และ β-1,3-glucan ซึ่งเป็นส่วนประกอบผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย และยีสต์ (Soderhall and Hall, 1984)

Supamattaya *et al.* (1994) รายงานว่า หลังจากการติดเชื้อไวรัสดวงขาวและหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำจะทำให้ปริมาณเม็ดเลือดในระบบไหลเวียนลดลงอย่างมาก รวมทั้งค่าความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสก็ลดลงด้วย เนื่องจากจำนวนกรานูลในไซโตพลาสซึมของเซลล์เม็ดเลือดลดลง

Bactericidin

สารออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (bactericidin) เป็นสารต้านแบคทีเรียสามารถถูกชักนำให้สูงขึ้นเมื่อได้รับสารกระตุ้น ไม่ทนความร้อน และมีความจำเพาะต่อเชื้อบางชนิด ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียสามารถพบได้ทั้งส่วนพลาสมา ซีรั่ม และในสารละลาย HLS (hemocyte lysate supernatant) (ชัยชาญ, 2545)

Cytokine-like factors

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

โรคที่เกิดกับกุ้งกุลาดำ

โรคที่เกิดกับกุ้งกุลาดำในประเทศไทย ส่วนใหญ่จะมีสาเหตุมาจากปัญหาการติดเชื้อแบคทีเรีย ไวรัส เชื้อรา และปรสิตหลายชนิดดังนี้

1. สาเหตุเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย

โรคติดเชื้อแบคทีเรียเป็นสาเหตุการตายของกุ้งที่สำคัญและยังพบว่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคเกิดการดื้อยาสูงขึ้นเรื่อยๆ

วิบริโอซิส (Vibrisis) เป็นโรคติดเชื้อแบคทีเรียในกุ้งที่เกิดจากแบคทีเรียสกุล *Vibrio* ได้แก่

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

2. สาเหตุเกิดจากไวรัส

โรคติดเชื้อไวรัสเป็นโรคที่สำคัญและก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก ไวรัสที่ก่อโรคในประเทศไทยได้แก่

- *Penaeus monodon* baculovirus (MBV)
- Infectious Hematopoietic and Hypodermal Necrosis virus (IHHNV)
- Hepatopancreatic Parvo-like virus (HPV)
- Yellow Head virus (YHV)
- White spot syndrome virus (WSSV)

3. สาเหตุเกิดจากเชื้อรา

โรคติดเชื้อรามักจะเป็นโรคฉวยโอกาส ไม่ค่อยก่อความเสียหายทางเศรษฐกิจมากนัก เชื้อราที่ก่อโรคกุ้งได้แก่

- *Lagenidium* sp.
- *Fusarium* sp.

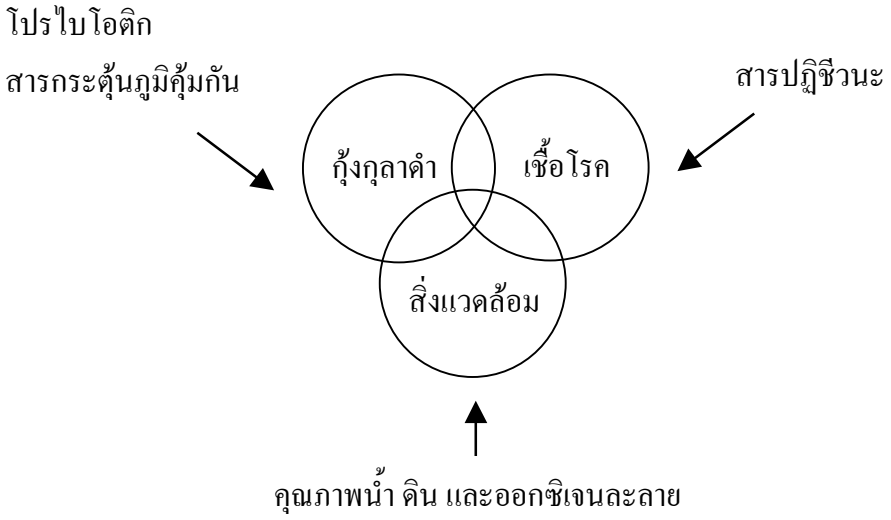
4. สาเหตุเกิดจากปรสิต

- ปรสิตภายนอก ได้แก่ *Zoothamnium* sp., *Epistylis* sp., *Vorticella* sp. และ *Acineta* sp.
- ปรสิตภายใน ได้แก่ *Agmasoma penaei* (microsporidian) และ re arine (Flegel *et al.,* 1992)

<u>กลไกในการเกิดโรคในบ่อกุ้งกุลาดำ</u>

กลไกในการเกิดโรคในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ เป็นดังภาพที่ 1 ถ้ามีการจัดการคุณภาพน้ำ คุณภาพดิน และออกซิเจนที่ละลายน้ำที่เหมาะสม และไม่มีเชื้อก่อโรคกุ้งในปริมาณมาก จะทำให้กุ้งมีการเจริญเติบโต และสุขภาพแข็งแรง ในทางตรงกันข้าม ถ้ามีการจัดการสิ่งแวดล้อมไม่ดี ประกอบกับการมีเชื้อก่อโรคในปริมาณสูง กุ้งก็จะมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคสูงและตายในที่สุด วิธีการที่สามารถจะนำไปใช้ในการจัดการแต่ละปัจจัย ได้แก่ โปรไบโอติก (probiotics) หรือสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันเพื่อทำให้กุ้งแข็งแรง การจัดการคุณภาพน้ำ ดิน และออกซิเจนที่ละลายน้ำที่เหมาะสมกับการเลี้ยงกุ้ง สำหรับการรักษาโรคติดเชื้อ ก็อาจยังมีความจำเป็นในการใช้สารปฏิชีวนะในปริมาณพอเหมาะแบบไม่เกินความจำเป็น เพื่อลดปัญหาการดื้อยาหรือมลภาวะที่เกิดบนผิวดิน ที่สามารถ

ส่งผลต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ตลอดจนสิ่งมีชีวิตบนหน้าดิน และในน้ำได้ (ศิริรัตน์, 2539)



ภาพที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างกุ้งกุลาดำ สิ่งแวดล้อมในบ่อเลี้ยงกุ้ง และเชื้อโรค รวมทั้งวิธีการที่ใช้ในการจัดการของแต่ละปัจจัย ที่มา : ศิริรัตน์ (2539)

การใช้สารปฏิชีวนะเพื่อป้องกันหรือรักษาโรคกุ้ง ถ้าผู้เลี้ยงกุ้งใช้ในอัตราสูงเกินความจำเป็นและใช้ในระยะเวลาที่ไม่เหมาะสม นอกจากจะเสียค่าใช้จ่ายสูงแล้วยังเกิดสารตกค้างในกุ้งเมื่อจับจำหน่าย(คมสัน, 2539) ทำให้เชื้อก่อโรคเกิดการดื้อยาสูงขึ้นเรื่อยๆ มีผลทำให้การรักษายากขึ้น (Flegel *et al.*, 1992) ประกอบกับปัจจุบันตลาดผู้นำเข้ากุ้งของประเทศไทยมีการกำหนดมาตรฐานสินค้าผลิตภัณฑ์กุ้งที่ต้องการกุ้งคุณภาพ ปราศจากสารตกค้าง ทำให้แนวทางการเลี้ยงกุ้งจำเป็นต้องลดการใช้ยาและสารเคม และใช้แนวทางชีวภาพ (probiotic) มากขึ้น

โปรไบโอติก

โปรไบโอติก(Probiotics) มาจากภาษากรีก แปลว่า “เพื่อชีวิต” (for life) (Fuller, 1992) Metchnikoff (1907) ถือว่าเป็นผู้กำเนิดโปรไบโอติก มีผลงานตีพิมพ์ในหนังสือ The Prolongation of Life หลังจากนั้นคำว่าโปรไบโอติกถูกนำไปใช้ในหลาย ๆ ทางด้วยกัน และมีผู้ให้คำจำกัดความต่าง ๆ กันคือ

Lilly and Stillwell (1965) หมายถึง สารที่สร้างโดยจุลินทรีย์ชนิดหนึ่ง และมีผลกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่ง

Parker (1974) หมายถึง จุลินทรีย์และสารที่ช่วยปรับความสมดุลย์ของจุลินทรีย์ในทางเดินอาหาร

Fuller (1989) หมายถึง จุลินทรีย์มีชีวิตที่เสริมในอาหาร และให้ผลประโยชน์แก่สัตว์เจ้าบ้าน (host) โดยช่วยเสริมจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารของสัตว์นั้น ๆ ให้อยู่ในสภาพที่สมดุลย์

Havenaar and Huis in’t Veld (1992) หมายถึง จุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่เพาะเลี้ยงเป็นจุลินทรีย์ชนิดเดียวหรือแบบผสม นำไปเสริมให้แก่สัตว์และคน แล้วมีผลประโยชน์ต่อสัตว์และคนนั้น ๆ โดยช่วยเสริมคุณสมบัติของจุลินทรีย์ประจำถิ่น

คุณสมบัติที่ดีของโปรไบโอติก

คุณสมบัติที่ดีของโปรไบโอติก (Fuller, 1989; Havenaar and Huis in’t Veld, 1992) มีดังนี้

1. เป็นสายพันธุ์ที่ให้ผลประโยชน์ต่อสัตว์ เช่น เพิ่มการเจริญเติบโต หรือต้านทานต่อโรค

2. ไม่เป็นสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรค จุลินทรีย์โปรไบโอติกและองค์ประกอบของเซลล์รวมทั้งผลิตภัณฑ์ของเซลล์ต้องไม่สร้างปฏิกิริยาที่เป็นพิษหรือก่อมะเร็งต่อตัวเจ้าบ้าน

3. สามารถควบคุมหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคได้

4. มีการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็วในลำไส้และสร้างตัวเองให้โดดเด่นเพื่อยึดผนังลำไส้ เป็นการป้องกันแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค

5. ทนต่อสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ได้ดี เช่น สภาพกรด และปริมาณสารอาหารน้อย หรือมีความทนทานต่อสารพิษ

6. มีความสามารถในการเจริญเติบโตได้ที่ช่วงอุณหภูมิกว้างระหว่าง 20-60°C

7. สามารถสร้างสารปฏิชีวนะเพื่อยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคได้

8. ผลิตง่าย สามารถทนต่อสภาพการเก็บรักษาก่อนมีการใช้งาน และมีจำนวนเซลล์ที่ออกฤทธิ์คงที่ เช่น ทนต่อสภาพแห้งแล้งในรูปผง ดังนั้นจุลินทรีย์ที่จะทำได้ดีในสภาพดังกล่าว จึงเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถปรับตัวได้ดี

9. เป็นสายพันธุ์ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมคงที่ ไม่มีการถ่ายทอดพลาสมิด

<u>โปรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ</u>

โปรไบโอติกมีการใช้กันอย่างแพร่หลาย ใช้ได้ทั้งในมนุษย์ (Holzapfel *et al.*, 1998) และสัตว์บก เช่น สุกร, วัว, แพะ และไก่ (Fuller, 1992) มานานแล้ว แต่ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีการใช้โปรไบโอติกไม่แพร่หลายนัก โดยวัตถุประสงค์การนำมาใช้ เพื่อลดการใช้สารปฏิชีวนะ จุลินทรีย์โปรไบโอติกที่มีการใช้ในการเลี้ยงสัตว์น้ำแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

ชนิดสัตว์น้ำ	จุลินทรีย์โปรไบโอติก	จุลินทรีย์ที่ใช้ในการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค	ผลการศึกษา	รายการอ้างอิง
ปลาซัลมอน	*Pseudomonas fluorescens* สายพันธุ์ F19/3	*Aeromonas salmonicida*	- ควบคุมโรคได้ดี	Smith and Davey (1993)
ปลาซัลมอน	*Vibrio alginolyticus*	*A. salmonicida* *Vibrio anguillarum* *Vibrio ordalii*	- ควบคุมโรคได้ดี	Austin *et al.* (1995)
ปลาซัลมอน	*Lactobacillus plantarum*	*A. salmonicida*	-ไม่สามารถควบคุมโรคได้ แต่สามารถอาศัยอยู่ที่ผนังลำไส้	Gildberg*et al.*(1995)
หอยนางรม (ระยะตัวอ่อน)	CA 2	ไม่ได้วิเคราะห์	- กระตุ้นการเจริญเติบโตและมีอัตราการรอดสูง	Douillet and Langdon (1994)
ปลา flounder	*Lactobacillus* สายพันธุ์ DS12	ไม่ได้วิเคราะห์	- กระตุ้นการเจริญเติบโต	Byun *et al.* (1997)
หอยนางรม (ระยะตัวอ่อน)	*Aeromonas media* สายพันธุ์ A199	*Vibrio tubiashii*	- ลดอัตราการตาย - ควบคุมโรคได้ดี	Gibson *et al.* (1998)
กุ้งสกุลพีเนียส	*Bacillus* sp.	Luminous *Vibrio*	- มีอัตราการรอดสูง - สามารถลดเชื้อได้ดี	Moriarty (1998)

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ชนิดสัตว์น้ำ	จุลินทรีย์โปรไบโอติก	จุลินทรีย์ที่ใช้ในการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค	ผลการศึกษา	รายการอ้างอิง
ปลา *Callionymus* sp.	*Bacillus* spp. สายพันธุ์ NM12	*Vibrio vulnificus*	- ควบคุมโรคได้ดี	Sugita *et al.* (1998)
หอยแครง (ระยะตัวอ่อน)	*Vibrio* sp.	*V. anguillarum* related (VAR) pathogen	- ควบคุมโรคได้ดี	Ri uelme *et al.*(1997)
กุ้งกุลาดำ	*Bacillus* สายพันธุ์ S11	*V. harveyi*	- กระตุ้นการเจริญเติบโต และมีอัตรารอดสูง - ควบคุมโรคได้ดี	Rengpipat *et al.* (1998)
ปลา Rainbow trout	*P. fluorescens* สายพันธุ์ AH 2	*V. anguillarum*	- ควบคุมโรคได้ดี	Gram *et al.* (1999)
กุ้งกุลาดำ	*Bacillus* sp.	*Vibrio* sp.	- ควบคุมโรคได้ดี - มีอัตราการรอดสูง	Moriarty (1999)
Oncorhynchus mykiss	*Carnobacterium* sp. สายพันธุ์ BA211	*A. salmonicida*	- ควบคุมโรคได้ดี	Irianto and Austin (2002)

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ชนิดสัตว์น้ำ	จุลินทรีย์โปรไบโอติก	จุลินทรีย์ที่ใช้ในการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค	ผลการศึกษา	รายการอ้างอิง
กุ้งขาว	-*Vibrio* สายพันธุ์ P62 -*Vibrio* สายพันธุ์ P63 -*Bacillus* สายพันธุ์ P64	*V. harveyi* (S2)	- ควบคุมโรคได้ดีทั้ง 3 สายพันธุ์ - *Bacillus* สายพันธุ์ P64 สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดี	Gullian (2004)
กุ้งกุลาดำ (ระยะ PL18)	*Pseudomonas* สายพันธุ์ I-2	*V. harveyi* *V. fluvialis* *V. parahaemolyticus* *V. damsela* *V. vulnificus*	- สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ดี	Chythanya *et al.* (2002)
ปลา Gilthead seabream	- *Lactobacillus delbrüeckii* - *B. subtilis*	-	- สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดี	Salinas *et al.* (2005)

การใช้โปรไบโอติกกับการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

การใช้โปรไบโอติกคือ การใช้จุลินทรีย์เพียงชนิดเดียว หรือการใช้จุลินทรีย์หลาย ๆ ชนิดที่ทำการคัดเลือกสายพันธุ์แล้วนำมาประยุกต์ใช้กับการเลี้ยงกุ้งเพื่อให้เกิดประโยชน์โดยเป็นจุลินทรีย์ที่พบทั่วไปในแหล่งน้ำ ตะกอนพื้นบ่อและสามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างมาก มีผลโดยตรงต่อการควบคุมและยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในกุ้งกุลาดำซึ่งอาจจะใช้ในลักษณะการผสมอาหารให้กุ้งกินหรือในสภาวะน้ำโดยตรง

นอกจากนี้โปรไบโอติกยังจัดเป็นจุลินทรีย์เพื่อเสริมการเจริญเติบโตและเสริมภูมิคุ้มกันแก่กุ้ง เพื่อให้เกิดความสมดุลย์ในทางเดินอาหาร ซึ่งปกติจุลินทรีย์ประจำถิ่นมีทั้งดีและไม่ดีต่อตัวกุ้ง เมื่อมีการเสียสมดุลย์และมีปริมาณแบคทีเรียก่อโรคมากกว่าจะทำให้กุ้งเกิดโรคและเป็นสาเหตุการตายในที่สุด

<u>กลไกการทำงานของโปรไบโอติกในกุ้งกุลาดำ</u>

1. การแก่งแย่ง

การใช้จุลินทรีย์ที่ไม่ก่อให้เกิดโทษแก่กุ้งกุลาดำและมีการเจริญอย่างรวดเร็วและเข้าไปแย่งพื้นที่ แย่งอาหารรวมทั้งปัจจัยอื่น ๆ จากแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค เพื่อสร้างตัวเองให้โดดเด่นขึ้นมา หรือมีปริมาณมากกว่าแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค ตลอดจนสามารถสร้างสารปฏิชีวนะเพื่อยับยั้งหรือทำลายแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคได้ การแย่งพื้นที่และอาหารบริเวณลำไส้เพื่อสร้างตัวเองให้โดดเด่น จึงเป็นสาเหตุให้แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคถูกกำจัดออกนอกร่างกายได้ สภาพสารบางอย่างที่จุลินทรีย์โปรไบโอติกผลิตขึ้น เช่นกรดแลกติก เกิดสภาพเป็นกรดทำให้แบคทีเรียก่อโรคอยู่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมไม่สามารถทำอันตรายต่อกุ้งได้

2. การสร้างสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน

เนื่องจากระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำเป็นแบบไม่จำเพาะ ไม่มีความทรงจำที่จะสามารถสร้างแอนติบอดี้ได้เหมือนคนหรือสัตว์ชั้นสูงชนิดอื่น ดังนั้นการทำงานจึงเป็นลักษณะชั่วคราว จำเป็นต้องได้รับการกระตุ้นตลอดเพื่อให้เกิดความพร้อม การกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายกุ้งกุลาดำส่วนใหญ่เป็นการทำงานของเม็ดเลือดซึ่งเป็นการทำงานร่วมกันเพื่อดักจับกินสิ่งแปลกปลอม โปรไบโอติกที่ผสมอาหารให้กุ้งกินอาจจะประกอบด้วยจุลินทรีย์หลายชนิด และเมื่อตายลงก็พร้อมที่จะเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันแก่กุ้งกุลาดำ หรือแม้แต่แบคทีเรียแกรมลบที่ก่อให้เกิดโรคบริเวณลำไส้เมื่อตายลงไปซากของแบคทีเรียก็เป็นประโยชน์ในการสร้างภูมิคุ้กันแก่กุ้งได้เช่นกัน

Rengpipat *et al.* (2000)ได้ทำการทดลองพบว่าการรอดตายและการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำที่ให้อาหารผสม *Bacillus* S11 จะดีกว่ากุ้งที่ไม่ได้รับอาหารผสม *Bacillus* S11 โดย *Bacillus* S11 มีประสิทธิภาพในการไปกระตุ้น และเพิ่มกระบวนการ Phagocytosis ซึ่งทราบได้จากการวัด Percent phagocytosis และ Phagocytic index (PI) ในเลือด Prophenoloxidase และกระบวนการกำจัดแบคทีเรีย (antibacterial activities) ซึ่งจะเพิ่มขึ้นตามอายุของกุ้ง แต่จะเพิ่มมากขึ้นโดยการใช้โปรไบโอติก หลังจากเลี้ยงกุ้ง 90 วัน โดยให้อาหารที่ผสมและไม่ผสม *Bacillus* S11 และใส่ *Vibrio harveyi* หลังจากนั้น 10 วัน กุ้งที่ให้อาหารผสมกับโปรไบโอติกมีอัตรารอดดีกว่ากลุ่มควบคุม และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำที่ได้รับเชื้อ เป็นเวลา 10 วัน ในกลุ่มที่ได้รับโปรไบโอติกกับกลุ่มควบคุมจะต่างกันอย่างมาก Phenoloxidase มีปริมาณสูงในกุ้งที่ได้รับโปรไบโอติกเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

Gullian *et al.* (2004) ทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกจาก hepatopancreas และลำไส้ ได้ 3 ชนิด คือ *Vibrio* P62, *Vibrio* P63 และ *Bacillus* P64 ซึ่งเชื้อทั้ง 3 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Vibrio harveyi* (S2) ได้เป็นอย่างดี แล้วนำมาผสมอาหารเลี้ยงกุ้งขาว *Penaeus vannamei* เพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้ง พบว่า กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมจุลินทรีย์ *Bacillus* P64 สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้สูงที่สุดโดยสูงกว่ากุ้งในกลุ่มอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

3. กระตุ้นการเจริญเติบโต

ในส่วนประกอบของสารประกอบจุลินทรีย์โปรไบโอติกส่วนมากมีการเสริมสารที่เป็นประโยชน์ต่อกุ้งทั้งกรดอะมิโน วิตามิน แร่ธาตุต่างๆ ซึ่งมีส่วนช่วยในการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำได้ และจุลินทรีย์บางชนิดสร้างน้ำย่อยทำให้การดูดซึมสารอาหารมีประสิทธิภาพสูงเนื่องจากสภาพความเป็นกรดในลำไส้กุ้ง

Rengpipat *et al.* (1998) รายงานการแยกเชื้อ *Bacillus* สายพันธุ์ S11 ซึ่งใช้เป็นโปรไบโอติก ใส่ลงในไรสีน้ำตาล (*Artemia* sp.) เป็นอาหารสำหรับเลี้ยงกุ้งกุลาดำ พบว่าการใช้โปรไบโอติก จาก *Bacillus* สายพันธุ์ S11 ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัว ความยาวของกุ้ง และอัตราการรอดตายสูงกว่ากลุ่มควบคุม เมื่อเหนี่ยวนำลูกกุ้งให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* พบว่าลูกกุ้งที่ได้รับโปรไบโอติกมีอัตราการรอดตาย สูงกว่ากลุ่มควบคุมเช่นกัน

Rengpipat *et al.* (1998)ได้ทำการแยก *Bacillus* S 11 ที่แยกมาจากกุ้งกุลาดำ ผสมในอาหารกุ้ง เพื่อใช้เป็นโปรไบโอติก ซึ่งมี 3 รูปแบบ คือ เซลล์สด เซลล์สดในสารละลายน้ำเกลือ และเซลล์ lyophilized ภายหลังจากที่ให้โปรไบโอติก เป็นเวลา 100 วัน พบว่าอัตราการรอดตายของกุ้งกุลาดำระยะ P 30 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ระหว่างกลุ่มที่ใช้โปรไบโอติกกับกลุ่มควบคุม หลังจากกุ้งได้รับเชื้อ *Vibrio harveyi* โดยการแช่เป็นเวลา 10 วัน กลุ่มที่ได้รับโปรไบโอติก ทั้ง 3 กลุ่มมีอัตราการรอดตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กลุ่มควบคุมรอดตาย 26 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนั้น กลุ่มควบคุมแสดงลักษณะภายนอกซึ่งระบุว่ามีสุขภาพไม่ดี เช่น hepatopancreas และลำไส้ไม่ปกติ ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับโปรไบโอติกกุ้งจะแข็งแรง hepatopancreas และ ลำไส้ปกติ

สิทธิ และลิลา (2541) ศึกษาประสิทธิภาพของโปรไบโอติกซึ่งเตรียมจาก *Bacillus* จำนวน 6 สายพันธุ์ที่แยกได้จากผิวดินพื้นบ่อเลี้ยงกุ้ง ได้ศึกษาโดยการเปรียบเทียบอัตราการรอดตาย น้ำหนัก-ความยาวที่เพิ่มขึ้นและอัตราการเจริญเติบโตของลูกกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* ระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มที่ได้รับโปรไบโอติกเป็นเวลา 15, 25, 35, 45 และ 55 วันติดต่อกัน พบว่า *Bacillus* PO27 เป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในด้านการให้อัตราการรอดตายได้สูงอย่างสม่ำเสมอเมื่อได้รับโปรไบโอติกตามระยะเวลาที่กำหนด ในขณะที่โปรไบโอติกสายพันธุ์ PO26และ PO25 ให้อัตราการรอดรองลงมา สำหรับประสิทธิภาพในด้านการเพิ่มน้ำหนักและการเจริญเติบโตนั้น พบว่าโปรไบโอติกสายพันธุ์ PO26และ PO27 จะให้ผลสูงกว่ากลุ่มอื่นๆ โดยอัตราเพิ่มของน้ำหนักจะมีค่าสูงในชุดการทดลองที่ได้รับโปรไบโอติกติดต่อกันเป็นเวลานาน

ศิริรัตน์ และคณะ (2547) ทำการคัดแยก *Bacillus* BP11 สายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกจากลำไส้กุ้งกุลาดำ ผสมลงในอาหารกุ้งกุลาดำประมาณ 2% (น้ำหนักเซลล์แห้งต่อน้ำหนักอาหารทั้งหมด) พบว่า กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริม *Bacillus* BP11 มีน้ำหนักตัวมากกว่ากุ้งในกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงด้วยอาหารปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และเมื่อทำการเหนี่ยวนำให้กุ้งเกิดโรคเรืองแสง กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริม *Bacillus* BP11 มีอัตราการรอดตาย 60% เมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งกลุ่มควบคุมตาย 100%

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์และสารเคมี

1. กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) น้ำหนักประมาณ 12-16 กรัม จากฟาร์มเอกชน
2. จุลินทรีย์โปรไบโอติก 2 ชนิด คือ *Bacillus subtilis* และ *B. licheniformis* ที่แยกจากลำไส้กุ้งปกติ ในรูปของสปอร์ผงแห้ง ที่มีจำนวนเชื้อ $1x10^{10}$ cfu/g (ขั้นตอนการเตรียมดังภาคผนวก)
3. อาหารกุ้งสำเร็จรูป
4. ถังไฟเบอร์กลาส ขนาดความจุ 1 ลูกบาศก์เมตร
5. ตู้กระจกขนาดความจุ 150 ลิตร
6. บ่อซีเมนต์ขนาดความจุ 1.5 ลูกบาศก์เมตร
7. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง
8. เครื่องให้อากาศพร้อมอุปกรณ์
9. Salino-Reflectometer
10. กระบอกฉีดยาขนาด 3 มิลลิลิตร
11. เข็มฉีดยาขนาด 26G x 1.0 นิ้ว
12. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge)
13. Microcentrifuge tube
14. Tri-Sodium Citrate Dihydrate ($C_6H_5Na_3.2H_2O$)
15. อาหารเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือด
    - อาหารเลี้ยงเซลล์ Medium-199
    - KCl
    - $MgCl_2.6H_2O$
    - $MgSO_4.7H_2O$
    - $NaH_2PO_4.2H_2O$
    - HCl
    - NaOH
    - L-glutamin
    - $CaCl_2.H_2O$
    - NaCl

- $NaHCO_3$
- Hepes
- น้ำกลั่น

16. อุปกรณ์และสารเคมีในการวิเคราะห์ Total Haemocytes Count
    - Haemacytometer
    - กล้องจุลทรรศน์ (Light microscope)
17. อุปกรณ์และสารเคมีในการวิเคราะห์ Phenoloxidase Activity
    - เครื่องวัดการดูดกลืนแสง Spectrophotometer
    - เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated Centrifuge)
    - สารละลาย cacodylate buffer pH 7.4
    - L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA)
    - trypsin
18. อุปกรณ์และสารเคมีในการวิเคราะห์ Percent Phagocytosis และ Phagocytic Index
    - ยีสต์
    - NaCl
    - $MgCl_2.6H_2O$
    - $MgSO_4.7H_2O$
    - $CaCl_2.H_2O$
    - KCl
    - Glucose
    - Hepes
    - กระดาษกรอง 0.22 μm
    - สีย้อม Wright and Giemsa
19. อุปกรณ์ในการทดสอบกิจกรรมของน้ำเลือดในการกำจัดเชื้อ *Vibrio harveyi* (Bactericidal Activity)
    - แบคทีเรีย *Vibrio harveyi* AQVH 001
    - เครื่องผสมสาร (Vortex mixer)
    - เครื่องเขย่าชนิดควบคุม (psychrotherm controlled)
    - ตะเกียงแอลกอฮอล์
    - แอลกอฮอล์

- จานเลี้ยงเชื้อ (petri dish)
- หลอดทดลอง (test tube)
- ไมโครปิเปตขนาด 100 ไมโครลิตรและ Tip
- หม้อนึ่งความดัน (Autoclave)
- แท่งแก้วสามเหลี่ยม
- เข็มเขี่ยเชื้อ
- 1.5% NaCl และ 2.6% NaCl ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
- ตู้บ่มเชื้อ
- อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Thiosulfate citrate bile sucrose agar (TCBS)
- อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Nutrient broth (NB)

20. สารเคมีในการวิเคราะห์โปรตีน
    - Na_2CO_3
    - 0.1 M NaOH
    - $CuSO_4$
    - Dipotassium tatrate
    - Folin
    - Albumin
21. อุปกรณ์และสารเคมีในการวิเคราะห์ Total *Bacillus* sp. และ Total *Vibrio* sp.
    - 1.5% NaCl
    - Hot plate
    - Homogenizer
    - จานเลี้ยงเชื้อ (petri dish)
    - หลอดทดลอง (test tube)
    - ไมโครปิเปตขนาด 100 ไมโครลิตรและ Tip
    - หม้อนึ่งความดัน (Autoclave)
    - แท่งแก้วสามเหลี่ยม
    - อาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulfate citrate bile sucrose agar (TCBS)
    - อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA)
    - ตะเกียงแอลกอฮอล์

วิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1 การศึกษาชนิดและระดับความเข้มข้นของโปรไบโอติกที่เหมาะสมในการผสมอาหารเพื่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ

1. การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) โดยมี 7 ชุดการทดลอง (Treatment) ในแต่ละชุดการทดลองมี 4 ซ้ำ (Replication) ชุดการทดลองที่ 1 คือ อาหารสำเร็จรูปปกติ เป็นกลุ่มควบคุม (control) ชุดการทดลองที่ 2-7 คือ อาหารสำเร็จรูปปกติผสม *Bacillus* ชนิดและระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน

2. การเตรียมสัตว์ทดลอง

นำกุ้งกุลาดำที่มีน้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 12-16 กรัม มาเลี้ยงในถังไฟเบอร์ขนาดความจุ 1 ลูกบาศก์เมตร เพื่อปรับสภาพก่อนเริ่มการทดลอง เลี้ยงในน้ำระดับความเค็ม 20 ppt ด้วยอาหารสำเร็จรูปปกติ โดยให้อาหาร 4 ครั้งต่อวัน ในเวลาประมาณ 07.00 น. 11.00 น. 15.00 น. และ 20.00 น.ให้อากาศอย่างเพียงพอ เปลี่ยนถ่ายน้ำและดูดตะกอนทุก ๆ 2 วัน เมื่อครบ 1 สัปดาห์ นำกุ้งกุลาดำใส่ในตู้ทดลองขนาดความจุน้ำประมาณ 150 ลิตร จำนวน 28 ตู้ ใส่กุ้งทดลองตู้ละ 10 ตัว ใช้ตาข่ายพรางแสงคลุมตู้เพื่อลดปริมาณแสง และให้อากาศตลอดการทดลอง เปลี่ยนถ่ายน้ำและดูดตะกอนทุก ๆ 2 วัน เลี้ยงกุ้งทดลองให้มีความคุ้นเคยกับสภาพการทดลองนาน 7 วัน ก่อนเริ่มการทดลอง

3. อาหารและการให้อาหาร

ใช้อาหารสำเร็จรูปไม่ผสมโปรไบโอติกเป็นกลุ่มควบคุม และใช้อาหารสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติก ตามชนิดและระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 อาหารสำเร็จรูปไม่ผสมโปรไบโอติก (control)
ชุดการทดลองที่ 2 ผสม *Bacillus subtilis* 3 กรัม ต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม
ชุดการทดลองที่ 3 ผสม *Bacillus subtilis* 5 กรัม ต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 4 ผสม *Bacillus licheniformis* 3 กรัม ต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 5 ผสม *Bacillus licheniformis* 5 กรัม ต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 6 ผสม *Bacillus subtilis* + *Bacillus licheniformis* (ในอัตราส่วน 1:1) 3 กรัม ต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 7 ผสม *Bacillus subtilis* + *Bacillus licheniformis* (ในอัตราส่วน 1:1) 5 กรัม ต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม

การเตรียมอาหารทดลองผสมโปรไบโอติกตามชนิดและระดับความเข้มข้นที่กำหนด เคลือบด้วยน้ำมันปลาหมึก แล้วผึ่งให้แห้ง ส่วนอาหารในชุดควบคุมจะเคลือบด้วยน้ำมันปลาหมึกเท่านั้น ให้อาหารทดลอง 4 ครั้งต่อวัน ในเวลาประมาณ 07.00 น. 11.00 น. 15.00 น. และ 20.00 น. ในอัตรา 5 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวกุ้งต่อวัน ให้อาหารทดลองเป็นเวลา 1 เดือน และทำการชั่งน้ำหนักกุ้งทุกชุดการทดลองก่อนทำการเก็บเลือดเพื่อศึกษาการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน

4. <u>การศึกษาระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ</u>

หลังจากให้อาหารทดลองเป็นเวลา 1 เดือน ทำการสุ่มกุ้งในแต่ละซ้ำซ้ำละ 5 ตัว เจาะเลือดบริเวณ ventral sinus ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ด้วยเข็มฉีดยา ซึ่งภายในบรรจุสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด(anticoaggulant) ในอัตราส่วน 1:2 นำเลือดที่ได้ไปวิเคราะห์ ปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมด กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส กิจกรรมของเม็ดเลือดในการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม กิจกรรมในการทำลายเชื้อแบคทีเรียของน้ำเลือด ตามขั้นตอนดังนี้

4.1 การศึกษาปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมด (Total Haemocytes Count)

เก็บตัวอย่างเลือดกุ้งกุลาดำจาก ventral sinus มานับจำนวนเม็ดเลือดทั้งหมด โดยใช้ Hemacytometer และคำนวณปริมาณเม็ดเลือดเป็นจำนวนเซลล์/ลบ.มล. ดังรายละเอียดในภาคผนวก

4.2 การศึกษา Phenoloxidase Activating

4.2.1 Haemocyte Lysate Supernatant (HLS)

เก็บตัวอย่างเลือดจากกุ้งกุลาดำแต่ละตัว มาแยกเซลล์เม็ดเลือด โดยหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,500 rpm เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใสไปวิเคราะห์

หาค่ากิจกรรมในการทำลายเชื้อแบคทีเรียของน้ำเลือด (Bactericidal Activity) ตามวิธีข้อ 4.5 ส่วนตะกอนที่ได้นำมาล้างใน K-199 และละลายในสารละลาย cacodylate buffer pH 7.4 แล้วนำสารละลายเซลล์เม็ดเลือดมา 0.2 มิลลิลิตร เพื่อนำไปวิเคราะห์ขบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม (Phagocytic Activity) ตามวิธีข้อ 4.4 ส่วนที่เหลือนำมาหมุนเหวี่ยงให้เซลล์เม็ดเลือดแตกและตกตะกอนที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส แยกส่วนใสซึ่งเป็น Hemocyte Lysate Supernatant (HLS) ไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ตามวิธีดัดแปลงจากรายงานของ Soderhall and Hall (1984)

4.2.2 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Phenoloxidase Activity)

1) นำ HLS 200 ไมโครลิตร ผสมรวมกับสารละลายทริปซิน (0.1 เปอร์เซ็นต์ทริปซินใน cacodylate buffer) 200 ไมโครลิตร ทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาประมาณ 30 นาที

2) เติมสารละลาย L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA, 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 200 ไมโครลิตร ปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง

3) นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร เป็นเวลา 2 นาที โดยเปรียบเทียบกับสารละลายควบคุม (blank) ซึ่งใช้ทริปซิน ผสมกับ L-DOPA และ cacodylate buffer แทน HLS

4) วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนใน HLS โดยวิธีของ Lowry *et al.* (1951) ตามวิธีข้อ 4.3 นำค่าที่ได้มาคำนวณหน่วย (unit) ของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ดังรายละเอียดในภาคผนวก

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

4.3.1 นำ HLS มา 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 0.9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำมา 0.1 มิลลิลิตร

4.3.2 เติม Reagent c (รายละเอียดในการเตรียมสารอยู่ในภาคผนวก) 1 มิลลิลิตร เขย่าแล้วทิ้งไว้ 10 นาที

4.3.3 เติม Reagent d (รายละเอียดในการเตรียมสารอยู่ในภาคผนวก) 0.1 มิลลิลิตร เขย่าแล้วทิ้งไว้ 10 นาที

4.3.4 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เทียบกับสารละลายมาตรฐานของ albumin โดย blank จะใช้สารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 0.9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำมา 0.1 มิลลิลิตร เติม Reagent c และ Reagent d ตามปริมาตรที่กำหนดไว้ข้างต้น

4.4 การศึกษาขบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม (Phagocytic Activity) ตามวิธีดัดแปลงจากรายงานของ Itami *et al.* (1994)

4.4.1 นำสารละลายเซลล์จากข้อ 4.2.1 จำนวน 0.2 มิลลิลิตร เลี้ยงบน cover slip โดย spread ให้ทั่ว ทิ้งไว้ 20 นาที

4.4.2 ล้างด้วย shrimp saline 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

4.4.3 หยดสารละลาย Heat-killed yeast ที่มีจำนวนเซลล์ประมาณ 5.0×10^8 2 มล. ลงไป ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

4.4.4 ล้างด้วย shrimp saline 5 ครั้ง

4.4.5 หยดน้ำยา fixative 1 มล. ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที

4.4.6 ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง

4.4.7 ทิ้งไว้ให้แห้ง 20-60 นาที

4.4.8 ย้อมสีด้วย Wright and Giemsa stain 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที

4.4.9 ล้างด้วยน้ำกลั่น

4.4.10 ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งข้ามคืน

4.4.11 mount ด้วย eukitt หรือน้ำยาอื่น

4.4.12 การนับจำนวนเม็ดเลือดกุ้งประมาณ 200 เซลล์ต่อตัวอย่างกุ้ง 1 ตัว โดยแยกเป็นจำนวนเม็ดเลือดกุ้งที่จับกินยีสต์ และจำนวนยีสต์ที่ถูกจับกินในเม็ดเลือดแต่ละเม็ด นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหา Percent Phagocytosis และ Phagocytic Index ดังรายละเอียดในภาคผนวก

4.5 การศึกษากิจกรรมของน้ำเลือดกุ้งกุลาดำในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย (Bactericidal Activity)

4.5.1 นำซีรั่มจากข้อ 4.2.1 มาเจือจางด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 2.6 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ระดับเจือจางที่ 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 และ 1:64 โดยปรับปริมาตรในการ เจือจางให้ได้หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร

4.5.2 นำเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* บริสุทธิ์ที่เลี้ยงในอาหาร TSB รวมกับโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ มาปั่นล้างด้วยโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเร็ว 3,000 rpm นาน 15 นาที 3 ครั้ง นำเชื้อที่ได้มาละลายในโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร ให้ได้ค่าประมาณ 0.1-0.15 จากนั้นนำมาเติมในซีรั่มแต่ละความเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

4.5.3 นำส่วนผสมในแต่ละหลอดมานับปริมาณเชื้อแบคทีเรีย โดยวิธี spread plate ใน TCBS agar

4.5.4 บันทึกค่าของการเจือจางซีรั่มที่สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียลงได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 3 ชั่วโมง

5. <u>การศึกษาปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในลำไส้</u>

หลังจากให้อาหารทดลองเป็นเวลา 1 เดือน นำกุ้งจากการสุ่มทั้งหมดในข้อ 4 มาผ่าหลังเพื่อนำลำไส้กุ้งไปวิเคราะห์หาจำนวนเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp และ *Bacillus* spp ทั้งหมดในลำไส้ และตรวจหาเชื้อแบคทีเรียโดยส่องใต้กล้อง Scanning Electron Microscope (SEM) เพื่อประเมินบทบาทและการดำรงอยู่ของโปรไบโอติกในลำไส้กุ้ง

5.1 จำนวนเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp ทั้งหมดในลำไส้

5.1.1 ผ่ากุ้ง แล้วนำลำไส้ของกุ้งมาชั่งน้ำหนัก

5.1.2 นำมาบดให้ละเอียดด้วย Homogenizer แล้วเติมน้ำกลั่นประมาณ 1 มิลลิลิตร

5.1.3 นำสารละลายมา 0.1 มิลลิลิตร เพื่อนับปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. โดยวิธี spread plate บน TCBS agar

5.2 จำนวนเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ทั้งหมดในลำไส้

5.2.1 นำสารละลายที่เหลือจากข้อ 5.1.3 มา 0.1 มิลลิลิตร เพื่อนับปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp โดยวิธี spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA

5.2.2 ในการนับจำนวนของเชื้อ *Bacillus* spp. จะดูลักษณะโคโลนีซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้คือ โคโลนีจะกลมฟู และย้อมแกรมดูลักษณะของตัวเซลล์แบคทีเรีย

5.3 การตรวจหาเชื้อแบคทีเรียโดย Scanning Electron Microscope (SEM)

นำลำไส้กุ้งมาตรวจหาเชื้อแบคทีเรียโดยส่องใต้กล้อง Scanning Electron Microscope (SEM) เพื่อประเมินบทบาทและการดำรงอยู่ของโปรไบโอติกในลำไส้กุ้ง

6. <u>การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ</u>

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

<u>การทดลองที่ 2 การศึกษาระยะเวลาการให้โปรไบโอติกที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ</u>

1. <u>การวางแผนการทดลอง</u>

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) โดยมี 3 ชุดการทดลอง (Treatment) ในแต่ละชุดการทดลองมี 4 ซ้ำ (Replication) โดยแต่ละชุดการทดลองให้อาหารผสมโปรไบโอติกในระยะเวลาที่แตกต่างกัน

2. <u>การเตรียมสัตว์ทดลอง</u>

นำกุ้งกุลาดำที่มีน้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 12-16 กรัม มาเลี้ยงในบ่อซีเมนต์ขนาดความจุ 1.5 ลูกบาศก์เมตร เพื่อปรับสภาพก่อนเริ่มการทดลอง เลี้ยงในน้ำระดับความเค็ม 20 ppt ด้วยอาหารสำเร็จรูปปกติ โดยให้อาหาร 4 ครั้งต่อวัน ในเวลาประมาณ 07.00 น. 11.00 น. 15.00 น. และ 20.00 น.ให้อากาศอย่างเพียงพอ เปลี่ยนถ่ายน้ำและดูดตะกอนทุก ๆ 2 วัน เมื่อครบ 1 สัปดาห์ นำกุ้งกุลาดำใส่บ่อซีเมนต์ขนาด 1.5 ลูกบาศก์เมตร จำนวน 12 บ่อ ใส่กุ้งทดลองบ่อละ 30 ตัว ใช้พลาสติกคลุมบ่อเพื่อลดปริมาณแสง และให้อากาศตลอดการทดลอง เปลี่ยนถ่ายน้ำและดูดตะกอนทุก ๆ 2 วัน เลี้ยงกุ้งทดลองให้มีความคุ้นเคยกับสภาพการทดลองนาน 7 วัน ก่อนเริ่มการทดลอง

3. <u>อาหารและการให้อาหาร</u>

ใช้อาหารสำเร็จรูปไม่ผสมโปรไบโอติกเป็นกลุ่มควบคุม และใช้อาหารสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติก โดยเลือกชนิดและระดับความเข้มข้นที่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำที่ได้จากการทดลองที่ 1 และให้อาหารนี้ในระยะเวลาที่แตกต่างกัน ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 ให้อาหารสำเร็จรูปไม่ผสมโปรไบโอติก (control) ทุกวัน
ชุดการทดลองที่ 2 ให้อาหารสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติกทุกวัน
ชุดการทดลองที่ 3 ให้อาหารสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติกวันเว้นวัน

การเตรียมอาหารทดลองผสมโปรไบโอติกตามชนิดและระดับความเข้มข้นที่ได้จากการทดลองที่ 1 เคลือบด้วยน้ำมันปลาหมึก แล้วผึ่งให้แห้ง ส่วนอาหารในชุดควบคุมจะเคลือบด้วยน้ำมันปลาหมึกเท่านั้น ให้อาหารทดลอง 4 ครั้งต่อวัน ในเวลาประมาณ 07.00 น. 11.00 น. 15.00 น. และ 20.00 น. ในอัตรา 5 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวกุ้งต่อวัน ให้อาหารทดลองเป็นเวลา 1 เดือน และทำการชั่งน้ำหนักกุ้งทุกชุดการทดลองก่อนทำการเก็บเลือดเพื่อศึกษาการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน

4. <u>การศึกษาระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ</u>

หลังจากให้อาหารทดลองเป็นเวลา 1 เดือน ทำการสุ่มกุ้งในแต่ละซ้ำซ้ำละ 5 ตัว เจาะเลือดบริเวณ ventral sinus ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ด้วยเข็มฉีดยา ซึ่งภายในบรรจุสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด นำเลือดที่ได้ไปวิเคราะห์ ปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมด กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส กิจกรรมของเม็ดเลือดในการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม กิจกรรมในการทำลายเชื้อแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้ง ตามขั้นตอนของการทดลองที่ 1 เมื่อครบ 1 เดือนแล้วจะให้อาหารปกติที่ไม่ผสมโปรไบโอติกเหมือนกับกลุ่มควบคุม และตรวจระดับภูมิคุ้มกันทุก ๆ 7 วัน จนกระทั่งภูมิคุ้มกันลดลง แล้วให้อาหารสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติกเพื่อเป็นการกระตุ้นภูมิอีกครั้ง โดยทำการตรวจระดับภูมิคุ้มกันทุก 7 วัน เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์

5. <u>การศึกษาปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในลำไส้</u>

หลังจากให้อาหารทดลองเป็นเวลา 1 เดือน นำกุ้งจากการสุ่มทั้งหมดในข้อ 4 มาผ่าหลังเพื่อนำลำไส้กุ้งไปวิเคราะห์หาจำนวนเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* sp. ทั้งหมดในลำไส้ จำนวนเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ทั้งหมดในลำไส้ และตรวจหาเชื้อแบคทีเรียโดยส่องใต้กล้อง Scanning Electron Microscope (SEM) ตามขั้นตอนของการทดลองที่ 1 เมื่อครบ 1 เดือนแล้วจะให้อาหารปกติที่ไม่ผสมโปรไบโอติกเหมือนกับกลุ่มควบคุม และวิเคราะห์หาจำนวนเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* sp. และ*Bacillus* sp. ทั้งหมดในลำไส้ทุก ๆ 7 วัน เพื่อประเมินบทบาทและการดำรงอยู่ของโปรไบโอติกในลำไส้กุ้ง จนจำนวนโปรไบโอติกลดลง

6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

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

สถานที่ ระยะเวลา และแหล่งเงินทุนสนับสนุนในการทำวิจัย

สถานที่ทำการวิจัย

ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ระยะเวลาทำการวิจัย

ดำเนินการทดลองระหว่างเดือนพฤษภาคม-สิงหาคม 2548

แหล่งทุนสนับสนุน

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ และสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลการทดลอง

<u>การทดลองที่ 1 การศึกษาชนิดและระดับความเข้มข้นของโปรไบโอติกที่เหมาะสมในการผสมอาหารเพื่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ</u>

หลังจากให้อาหารทดลองเป็นระยะเวลา 1 เดือน พบว่า ไม่มีความแตกต่างของน้ำหนักกุ้งระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) (ตารางที่ 2)

<u>ตารางที่ 2</u> น้ำหนักของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติกตามชนิดและระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 1 เดือน

ชนิดและความเข้มข้นของโปรไบโอติก	น้ำหนักกุ้งกุลาดำ (กรัม)	
	เริ่มต้นการทดลอง	สิ้นสุดการทดลอง
กลุ่มควบคุม	17.815 ± 5.041^{a}	19.065 ± 3.641^{a}
B. subtilis 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม	17.280 ± 3.846^{a}	18.700 ± 1.824^{a}
B. subtilis 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม	17.605 ± 3.387^{a}	19.245 ± 2.298^{a}
B. licheniformis 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม	17.260 ± 0.353^{a}	18.605 ± 0.530^{a}
B. licheniformis 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม	17.890 ± 4.398^{a}	18.730 ± 3.196^{a}
B. subtilis + *B. licheniformis* 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม	17.390 ± 3.691^{a}	19.215 ± 0.954^{a}
B. subtilis + *B. licheniformis* 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม	17.605 ± 3.387^{a}	18.480 ± 1.371^{a}

<u>หมายเหตุ</u> อักษรที่ต่างกันตามแนวตั้งแสดงถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *($P<0.05$)*

1. การศึกษาระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ

เมื่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำด้วยอาหารสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติกตามชนิดและระดับความเข้มข้นที่กำหนดไว้ เป็นระยะเวลา 1 เดือน แล้วทำการดูดเลือดจากกุ้งกุลาดำเพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบต่างๆ ทางระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งได้ผลดังนี้

1.1 การศึกษาปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมด (Total Haemocytes Count)

เมื่อพิจารณาทั้งชนิดและระดับความเข้มข้นของโปรไบโอติกพบว่า กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปผสม *B. subtilis* ร่วมกับ *B. licheniformis* 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีปริมาณเม็ดเลือดรวมเฉลี่ยสูงที่สุดคือ $2.670 \pm 0.959 \times 10^7$ cells/ml โดยสูงกว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *B. licheniformis* 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม, *B. subtilis* ร่วมกับ *B. licheniformis* 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม และกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ในขณะที่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกุ้งชุดการทดลองที่เหลือ ($P>0.05$) (ตารางที่ 3 และภาพที่ 2)

1.2 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส(P henoloxidase Activity)

จากการทดลองพบว่า Phenoloxidase Activity ของกุ้งทุกกลุ่มทดลองไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) (ตารางที่ 4 และภาพที่ 3)

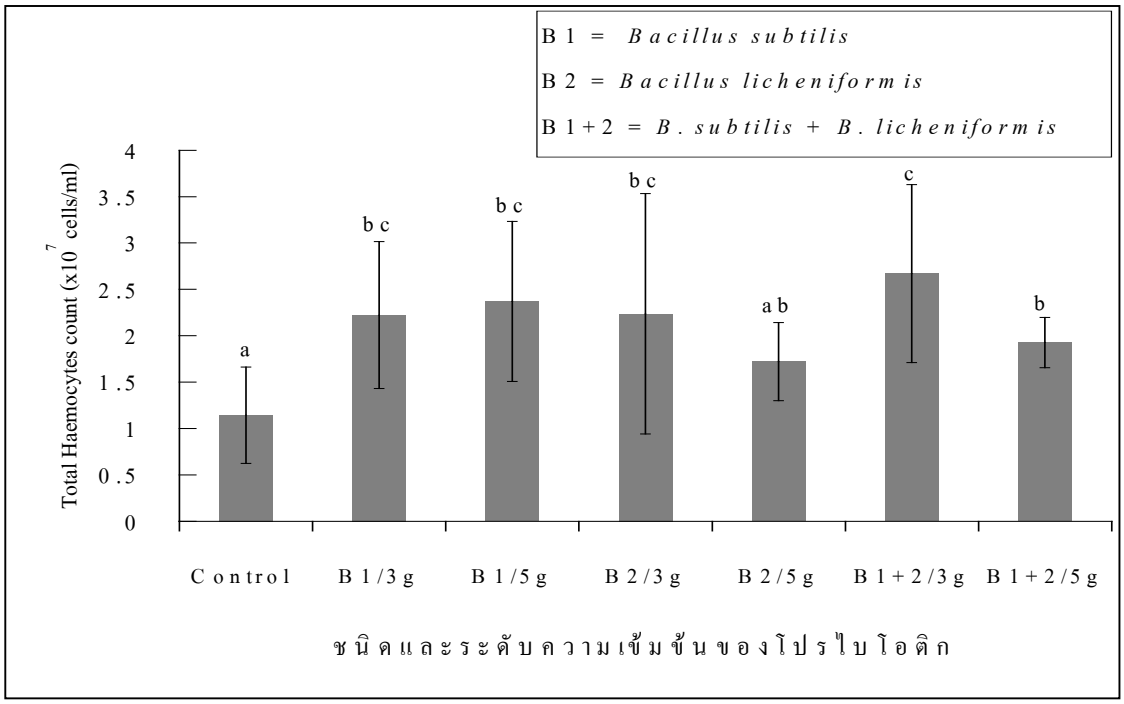
1.3 การศึกษาขบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม (Phagocytic Activity)

เมื่อพิจารณาจากค่า Percent Phagocytosis ของกุ้งทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติกชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *B. subtilis* ร่วมกับ *B. licheniformis* 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม สามารถกำจัดสิ่งแปลกปลอมได้สูงสุด คือ 27.248 ± 3.732 เปอร์เซ็นต์ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) จากกุ้งที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกในชุดการทดลองอื่น ๆ แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) จากกลุ่มควบคุมซึ่งมีค่าเฉลี่ย 18.113 ± 5.330 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 5 และภาพที่ 4) และเมื่อพิจารณาจากค่า Phagocytic Index พบว่า การใช้โปรไบโอติกชนิดและระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ผสมในอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำไม่มีผลทำให้ค่า Phagocytic Index มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) (ตารางที่ 6 และภาพที่ 5)

ตารางที่ 3 ปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมด (Total Haemocytes Count) ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติกตามชนิดและระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 1 เดือน

ชนิดและความเข้มข้นของโปรไบโอติก	Total Haemocytes Count ($x10^7$ cells/ml)
กลุ่มควบคุม	1.143 ± 0.520^{a}
B. subtilis 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม	2.223 ± 0.792^{bc}
B. subtilis 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม	2.370 ± 0.861^{bc}
B. licheniformis 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม	2.237 ± 1.298^{bc}
B. licheniformis 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม	1.720 ± 0.421^{ab}
B. subtilis + *B. licheniformis* 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม	2.670 ± 0.959^{c}
B. subtilis+ *B. licheniformis* 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม	1.926 ± 0.272^{b}

หมายเหตุ อักษรที่ต่างกันตามแนวตั้งแสดงถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *(P*<0.05*)*

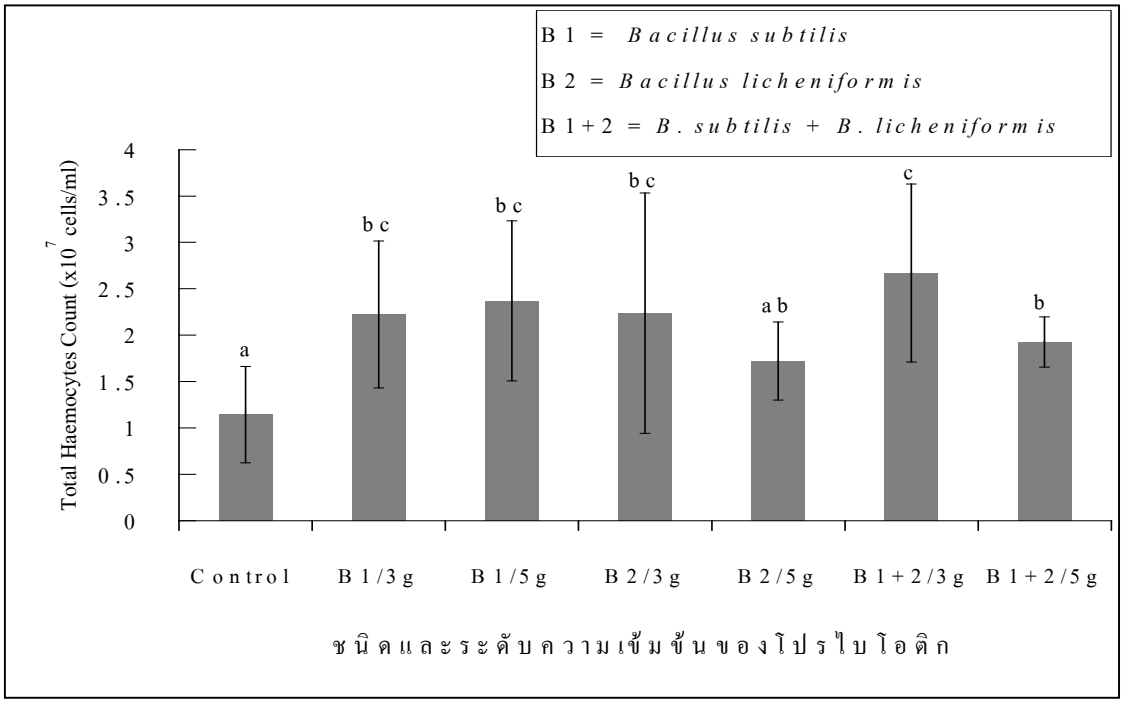


ภาพที่ 2 ปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมด (Total Haemocytes Count) ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติกตามชนิดและระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 1 เดือน

ตารางที่ 4 กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Phenoloxidase Activity) ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วย อาหารผสมโปรไบโอติกตามชนิดและระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 1 เดือน

ชนิดและความเข้มข้นของโปรไบโอติก	**Phenoloxidase Activity (unit/min/mg protein)**
กลุ่มควบคุม	134.068 ± 79.691^{a}
B. subtilis 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม	199.177 ± 133.563^{a}
B. subtilis 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม	186.110 ± 169.844^{a}
B. licheniformis 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม	169.932 ± 155.197^{a}
B. licheniformis 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม	140.180 ± 58.214^{a}
B. subtilis + *B. licheniformis* 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม	191.845 ± 124.048^{a}
B. subtilis + *B. licheniformis* 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม	141.674 ± 89.257^{a}

หมายเหตุ อักษรที่ต่างกันตามแนวตั้งแสดงถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *(P*<0.05*)*

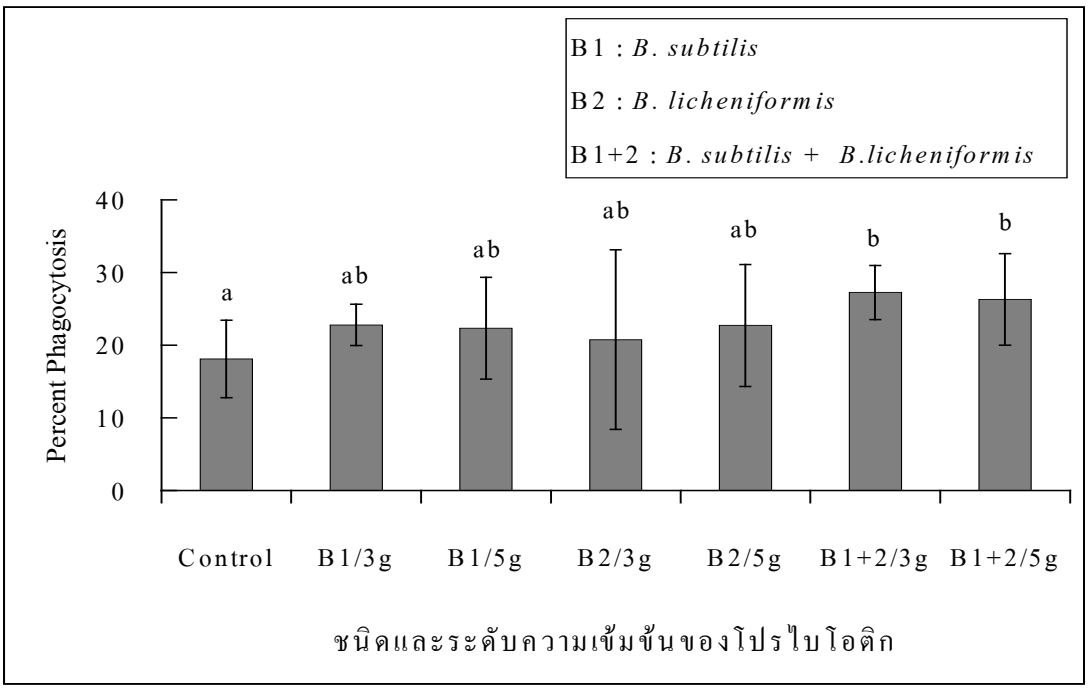


ภาพที่ 3 กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส(P henoloxidase Activity) ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วย อาหารผสมโปรไบโอติกตามชนิดและระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 1 เดือน

ตารางที่ 5 Percent Phagocytosis ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติกตามชนิดและระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 1 เดือน

ชนิดและความเข้มข้นของโปรไบโอติก	**Percent Phagocytosis**
กลุ่มควบคุม	18.113 ± 5.330^{a}
B. subtilis 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม	22.801 ± 2.857^{ab}
B. subtilis 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม	22.341 ± 7.001^{ab}
B. licheniformis 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม	20.762 ± 12.348^{ab}
B. licheniformis 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม	22.727 ± 8.389^{ab}
B. subtilis + *B. licheniformis* 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม	27.248 ± 3.732^{b}
B. subtilis+ *B. licheniformis* 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม	26.307 ± 6.273^{b}

หมายเหตุ อักษรที่ต่างกันตามแนวตั้งแสดงถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *(P*<0.05*)*

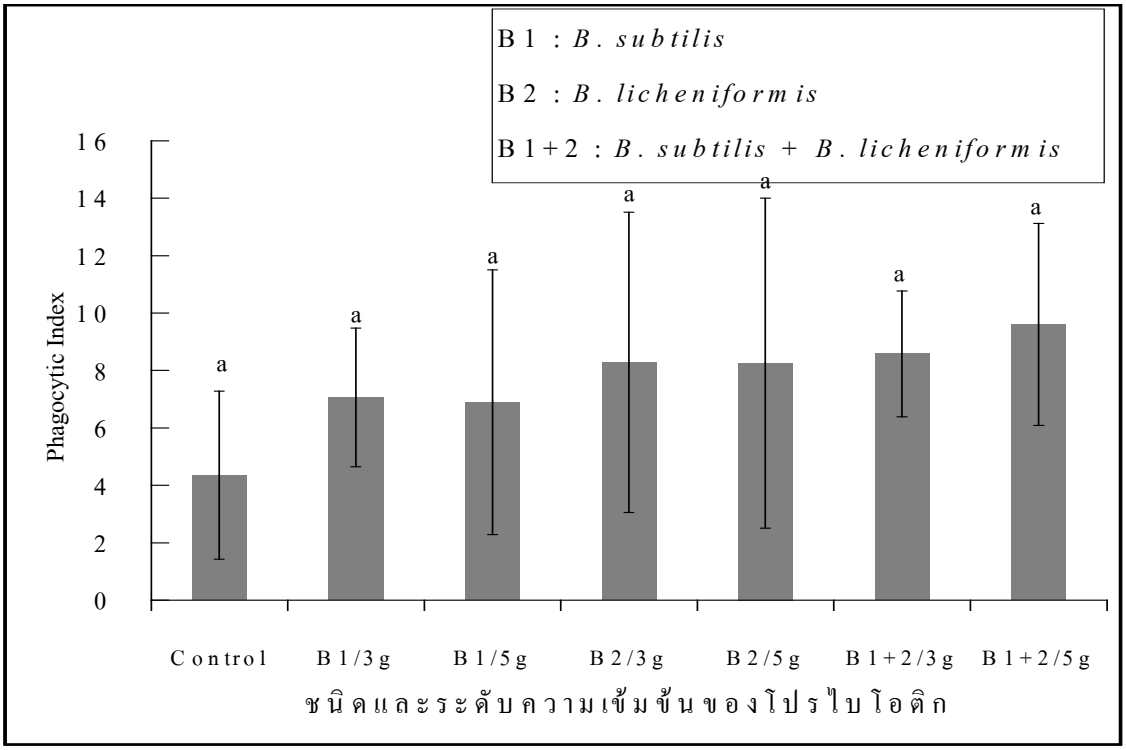


ภาพที่ 4 Percent Phagocytosis ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติกตามชนิดและระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 1 เดือน

ตารางที่ 6 Phagocytic Index ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติกตามชนิดและระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 1 เดือน

ชนิดและความเข้มข้นของโปรไบโอติก	Phagocytic Index
กลุ่มควบคุม	4.350 ± 2.928^{a}
B. subtilis 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม	7.062 ± 2.413^{a}
B. subtilis 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม	6.893 ± 4.610^{a}
B. licheniformis 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม	8.284 ± 5.224^{a}
B. licheniformis 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม	8.255 ± 5.745^{a}
B. subtilis + *B. licheniformis* 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม	8.577 ± 2.186^{a}
B. subtilis+ *B. licheniformis* 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม	9.601 ± 3.516^{a}

หมายเหตุ อักษรที่ต่างกันตามแนวตั้งแสดงถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *(P*<0.05*)*



ภาพที่ 5 Phagocytic Index ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติกตามชนิดและระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 1 เดือน

1.4 การศึกษากิจกรรมของน้ำเลือดกุ้งกุลาดำในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย (Bactericidal Activity)

เมื่อนำซีรั่มของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองผสมโปรไบโอติกชนิดและระดับความเข้มข้นต่าง ๆ มาเจือจางด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 2.6 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 และ 1:64 โดยปรับปริมาตรการเจือจางให้ได้หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร และใส่เชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ที่เลี้ยงใน TSB ผสมโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ที่มีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตรเท่ากับ 0.107 ซึ่งมีเชื้อ *V. harveyi* ประมาณ $1X10^6$ cfu/mlโดยใส่เชื้อในแต่ละหลอดที่เจือจาง ซีรั่มไว้แล้วหลอดละ 0.1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมานับปริมาณเชื้อแบคทีเรียโดยวิธีการ spread plate บนTCBS agar เพื่อหาอัตราส่วนการเจือจางของซีรั่มที่สามารถทำให้ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ลดลงได้ 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับ control (ละลายโซเดียมคลอไรด์ 2.6 เปอร์เซ็นต์ 0.5 มิลลิลิตร กับแบคทีเรีย *V. harveyi* 0.1 มิลลิลิตร) พบว่า Bactericidal Activity ของกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *B. subtilis* ร่วมกับ *B. licheniformis* 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีค่าเจือจางของซีรั่มมากที่สุดที่ทำให้เชื้อแบคทีเรียลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ ที่ 1:64 ซึ่งแตกต่างจากกุ้งที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกในชุดการทดลองอื่น ๆ รวมทั้งกุ้งในกลุ่มควบคุมด้วย (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 Bactericidal Activity ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติกตามชนิดและระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 1 เดือน

ชนิดและความเข้มข้นของโปรไบโอติก	**Bactericidal activity**
กลุ่มควบคุม	1:4
B. subtilis 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม	1:8
B. subtilis 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม	1:16
B. licheniformis 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม	1:16
B. licheniformis 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม	1:16
B. subtilis + *B. licheniformis* 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม	1:64
B. subtilis + *B. licheniformis* 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม	1:16

2. การศึกษาปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในลำไส้

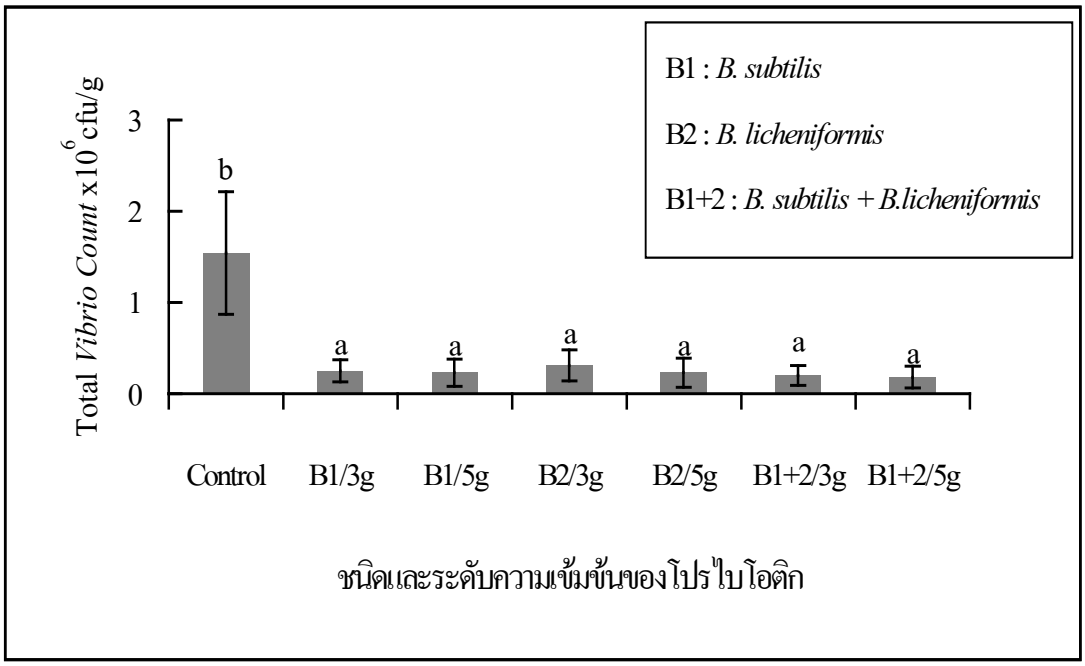
2.1 จำนวนเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ทั้งหมดในลำไส้ (Total *Vibrio* Count)

เมื่อนำลำไส้กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติกชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ มาบดเพื่อนับปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp โดยวิธี spread plate บนTCBS agar พบว่า กุ้งในกลุ่มควบคุมมีจำนวนเชื้อ *Vibrio* spp ทั้งหมดในลำไส้เฉลี่ยสูงที่สุดคือ $1.54 \pm 0.67 \times 10^{6}$ cfu/g ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) จากกุ้งที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกทุกชุดการทดลอง (ตารางที่ 8 และภาพที่ 6)

ตารางที่ 8 Total *Vibrio* Count ของลำไส้กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติกตามชนิดและระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 1 เดือน

ชนิดและความเข้มข้นของโปรไบโอติก	**Total *Vibrio* Count ($x10^{6}$ cfu/g)**
กลุ่มควบคุม	1.54 ± 0.67^{b}
B. subtilis 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม	0.25 ± 0.12^{a}
B. subtilis 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม	0.23 ± 0.15^{a}
B. licheniformis 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม	0.31 ± 0.17^{a}
B. licheniformis 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม	0.23 ± 0.16^{a}
B. subtilis + *B. licheniformis* 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม	0.20 ± 0.11^{a}
B. subtilis + *B. licheniformis* 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม	0.18 ± 0.12^{a}

หมายเหตุ อักษรที่ต่างกันตามแนวตั้งแสดงถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *($P<0.05$)*



ภาพที่ 6 Total *Vibrio* Count ของลำไส้กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติกตามชนิดและระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 1 เดือน

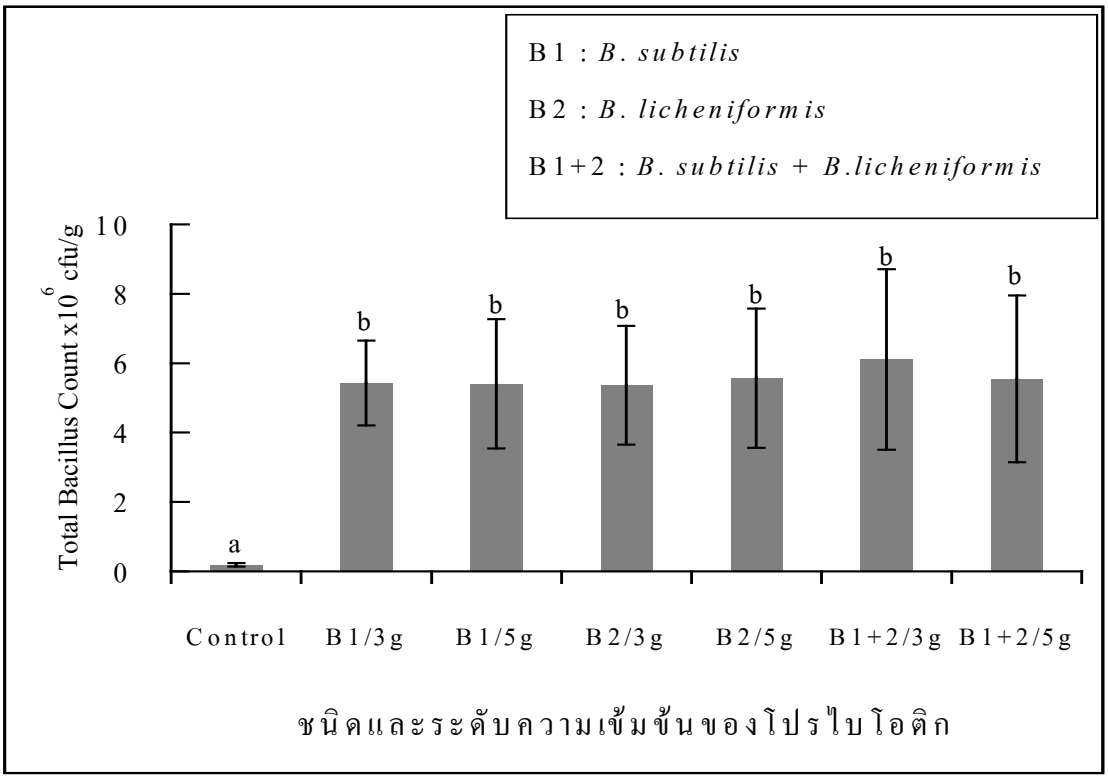
2.2 จำนวนเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ทั้งหมดในลำไส้ (Total *Bacillus* Count)

เมื่อนำลำไส้กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติกชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ มาบดเพื่อนับปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ด้วยวิธี spread plate บนNA agar (โดยพิจารณาจากขนาด รูปร่างของเชื้อจากการย้อมแกรมและลักษณะเฉพาะของโคโลนี) พบว่า กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *B. subtilis* ร่วมกับ *B. licheniformis* 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีจำนวนเชื้อ *Bacillus* spp. ทั้งหมดในลำไส้เฉลี่ยสูงสุดคือ $6.11 \pm 2.60 \times 10^6$ cfu/g ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) จากกุ้งที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกในชุดการทดลองอื่น ๆ แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) จากกลุ่มควบคุมซึ่งมีค่าเฉลี่ย $0.19 \pm 0.05 \times 10^6$ cfu/g (ตารางที่ 9 และภาพที่ 7)

ตารางที่ 9 Total *Bacillus* Count ของลำไส้กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติกตามชนิดและระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 1 เดือน

ชนิดและความเข้มข้นของโปรไบโอติก	**Total *Bacillus* Count (x10^6 cfu/g)**
กลุ่มควบคุม	0.19 ± 0.05^a
B. subtilis 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม	5.34 ± 1.22^b
B. subtilis 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม	5.41 ± 1.86^b
B. licheniformis 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม	5.37 ± 1.74^b
B. licheniformis 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม	5.77 ± 2.01^b
B. subtilis + *B. licheniformis* 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม	6.11 ± 2.60^b
B. subtilis + *B. licheniformis* 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม	5.55 ± 2.40^b

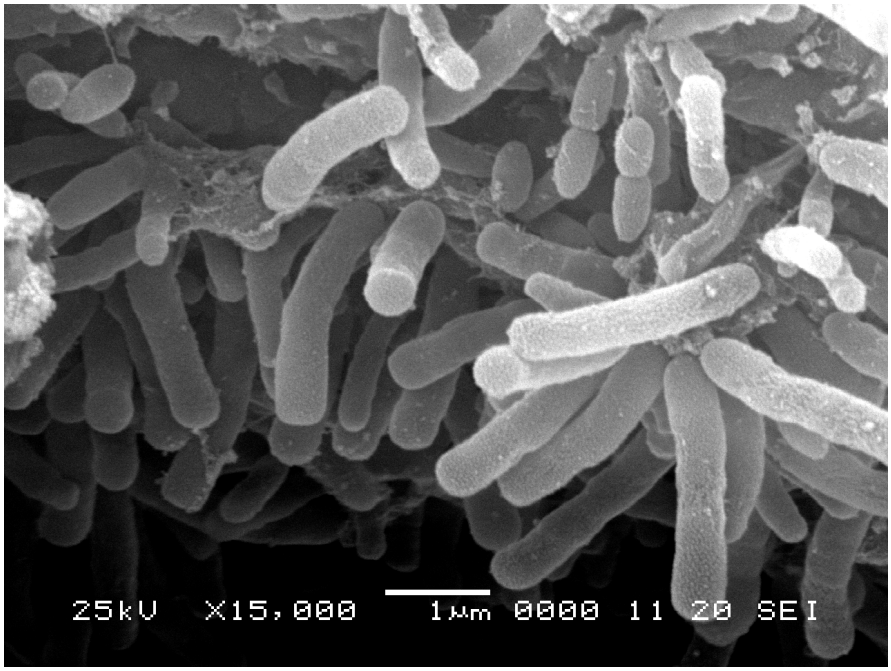
หมายเหตุ อักษรที่ต่างกันตามแนวตั้งแสดงถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *(P*<0.05*)*



ภาพที่ 7 Total *Bacillus* Count ของลำไส้กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติกตามชนิดและระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 1 เดือน

2.3 การตรวจหาเชื้อแบคทีเรียโดย Scanning Electron Microscope (SEM)

เมื่อนำลำไส้กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *B. subtilis* ร่วมกับ *B. licheniformis* 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เป็นระยะเวลา 1 เดือน และกุ้งกลุ่มควบคุมมาตรวจหาเชื้อแบคทีเรียโดยส่องภายใต้กล้อง Scanning Electron Microscope (SEM) เพื่อประเมินการดำรงอยู่ของโปรไบโอติกในลำไส้กุ้ง พบว่า บริเวณผนังลำไส้ของกุ้งที่ได้รับโปรไบโอติกผสมในอาหารมีจำนวนเชื้อแบคทีเรียมากกว่าในกลุ่มควบคุม ซึ่งเชื้อที่พบส่วนมากจะมีลักษณะเป็นแท่งยาว ขนาดยาวประมาณ 1.5-3 ไมครอน (ภาพที่ 8) แต่เชื้อแบคทีเรียที่พบในลำไส้กุ้งกลุ่มควบคุมจะมี 2 ชนิด ซึ่งลักษณะเป็นแท่งยาวประมาณ 2 ไมครอน และเป็นแท่งงอยาวประมาณ 1 ไมครอน (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 8 ลำไส้ของกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *B. subtilis* ร่วมกับ *B. licheniformis* 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เป็นระยะเวลา 1 เดือน ที่ส่องภายใต้กล้อง Scanning Electron Microscope (SEM)

ภาพที่ 9 ลำไส้ของกุ้งกลุ่มควบคุมที่ส่องภายใต้กล้อง Scanning Electron Microscope (SEM)

<u>การทดลองที่ 2 การศึกษาระยะเวลาการให้โปรไบโอติกที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ</u>

หลังจากให้อาหารทดลองเป็นระยะเวลา 1 เดือน แล้วให้อาหารปกติเป็นเวลา 2 สัปดาห์จึงให้อาหารผสมโปรไบโอติกครั้งที่ 2 อีก 2 สัปดาห์ พบว่า ไม่มีความแตกต่างของน้ำหนักกุ้งระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) (ตารางที่ 10)

<u>ตารางที่ 10</u> น้ำหนักของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติก(*B. subtilis* ร่วมกับ *B. licheniformis* 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม) เป็นระยะเวลา 1 เดือน แล้วให้อาหารปกติเป็นเวลา 2 สัปดาห์ จึงให้อาหารผสมโปรไบโอติกครั้งที่ 2

สัปดาห์ที่	**น้ำหนักกุ้งกุลาดำ (กรัม)**		
	กลุ่มควบคุม	วันเว้นวัน	ทุกวัน
เริ่มต้นการทดลอง	14.975 ± 2.835[a]	15.095 ± 4.080[a]	15.05 ± 3.521[a]
ครบ 1 เดือน	17.98 ± 4.808[a]	17.39 ± 3.691[a]	18.505 ± 4.659[a]
1	18.77 ± 1.018[a]	19.25 ± 0.410[a]	18.94 ± 1.032[a]
2	18.41 ± 1.470[a]	20.28 ± 1.555[a]	20.33 ± 2.177[a]
3	18.795 ± 1.902[a]	20.395 ± 2.906[a]	21.315 ±1.873[a]
4	19.25 ± 2.474[a]	21.74 ±5.996[a]	21.95 ± 1.165[a]

<u>หมายเหตุ</u> อักษรที่ต่างกันตามแนวนอนแสดงถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P< 0.05)

1. การศึกษาระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ

เมื่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำด้วยอาหารสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติกโดยเลือกชนิดและระดับความเข้มข้นที่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำที่ได้จากการทดลองที่ 1 คือ อาหารสำเร็จรูปผสม *B. subtilis* ร่วมกับ *B. licheniformis* 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม โดยให้อาหารในระยะเวลาที่แตกต่างกันดังนี้ ให้อาหารสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติกทุกวัน ให้อาหารสำเร็จรูปผสมโปรไบโอติกวันเว้นวันสลับกับอาหารที่ไม่ได้ผสมโปรไบโอติก และให้อาหารสำเร็จรูปไม่ผสมโปรไบโอติก (control) ทุก

วันซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม เมื่อครบ 1 เดือนแล้วจะให้อาหารปกติที่ไม่ผสมโปรไบโอติกเหมือนกับกลุ่มควบคุม และตรวจระดับภูมิคุ้มกันทุก ๆ 7 วัน จนกระทั่งภูมิคุ้มกันลดลง แล้วให้อาหารผสมโปรไบโอติกเพื่อเป็นการกระตุ้นภูมิอีกครั้ง โดยทำการตรวจระดับภูมิคุ้มกันทุก 7 วัน เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ซึ่งผลวิเคราะห์องค์ประกอบต่างๆ ทางระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งได้ผลดังนี้

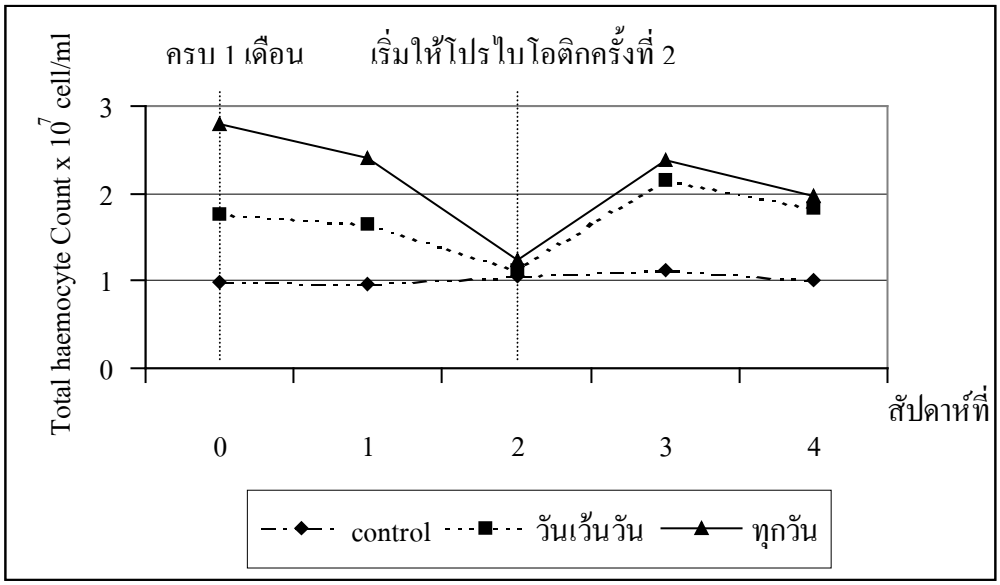
1.1 การศึกษาปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมด (Total Haemocytes Count)

หลังจากกุ้งกุลาดำได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกเป็นระยะเวลา 1 เดือน พบว่า กุ้งที่ได้รับโปรไบโอติกทุกวันมีปริมาณเม็ดเลือดรวมเฉลี่ยสูงที่สุดคือ $2.791 \pm 0.975 \times 10^7$ cell/ml ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) จากกุ้งที่ได้รับโปรไบโอติกวันเว้นวันและกลุ่มควบคุมซึ่งมีค่าเฉลี่ย 1.766 ± 0.712 และ $0.976 \pm 0.538 \times 10^7$ cell/ml ตามลำดับ เมื่อหยุดให้อาหารผสมโปรไบโอติกก็ยังคงมีปริมาณเม็ดเลือดรวมสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แต่ไม่แตกต่าง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) กับกุ้งที่เลี้ยงวันเว้นวัน แล้วค่อย ๆ ลดลงเรื่อย ๆ ในสัปดาห์ที่ 2 ซึ่งไม่แตกต่าง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) จากกุ้งกลุ่มควบคุม และเมื่อให้อาหารผสมโปรไบโอติกอีกครั้งในสัปดาห์ที่ 3 และ 4 พบว่ากุ้งที่ได้รับโปรไบโอติกมีปริมาณเม็ดเลือดรวมสูงขึ้นเรื่อย ๆ โดยสูงกว่ากุ้งในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 11 และภาพที่ 10)

ตารางที่ 11 Total Haemocytes Count ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติก (*B. subtilis* ร่วมกับ *B. licheniformis* 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม) เป็นระยะเวลา 1 เดือน แล้วให้อาหารปกติเป็นเวลา 2 สัปดาห์ จึงให้อาหารผสมโปรไบโอติกครั้งที่ 2

ชุดการทดลอง / สัปดาห์ที่	Total Haemocytes Count ($x10^7$ cell/ml)		
	กลุ่มควบคุม	วันเว้นวัน	ทุกวัน
ครบ 1 เดือน	0.976 ± 0.538^{a}	1.766 ± 0.712^{a}	2.791 ± 0.975^{b}
1	0.973 ± 0.485^{a}	1.638 ± 1.005^{ab}	2.407 ± 0.629^{b}
2	1.046 ± 0.609^{a}	1.125 ± 0.310^{a}	1.241 ± 0.137^{a}
3	1.121 ± 0.138^{a}	2.148 ± 0.357^{b}	2.388 ± 0.181^{b}
4	1.001 ± 0.487^{a}	1.826 ± 0.393^{b}	1.965 ± 0.151^{b}

หมายเหตุ อักษรที่ต่างกันตามแนวนอนแสดงถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P< 0.05$)



ภาพที่ 10 Total Haemocytes Count ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติก (*B. subtilis* ร่วมกับ *B. licheniformis* 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม) เป็นระยะเวลา 1 เดือน แล้วให้อาหารปกติเป็นเวลา 2 สัปดาห์ จึงให้อาหารผสมโปรไบโอติกครั้งที่ 2

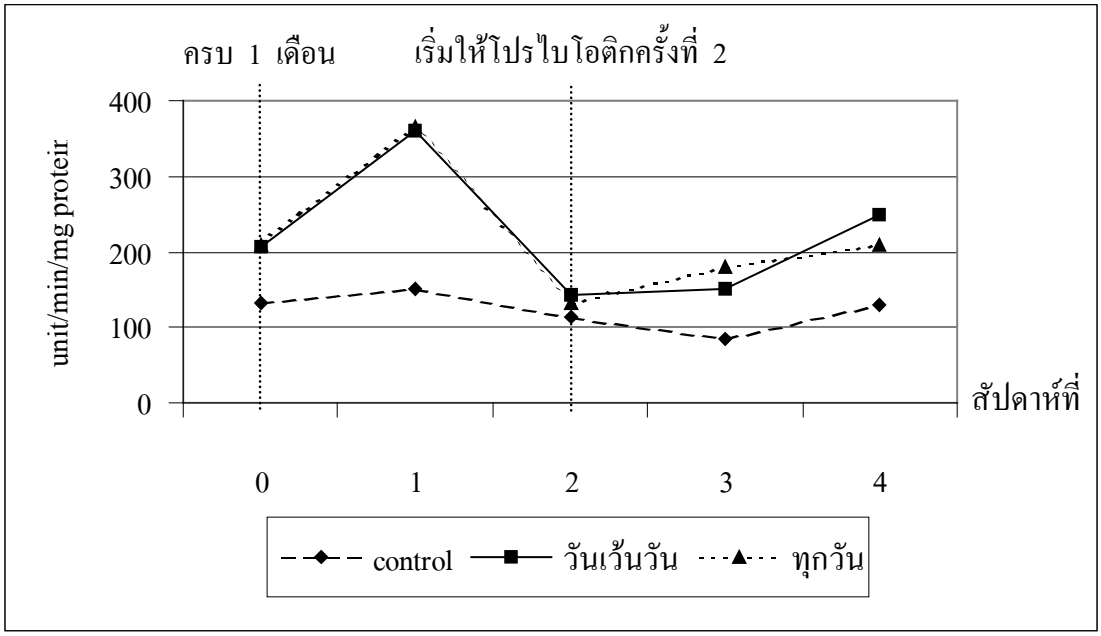
1.2 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส(P henoloxidase Activity)

หลังจากกุ้งกุลาดำได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกเป็นระยะเวลา 1 เดือน พบว่า ไม่มีผลทำให้ค่า Phenoloxidase Activity มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) แต่ในสัปดาห์ที่ 1 ที่หยุดให้อาหารผสมโปรไบโอติกพบว่า Phenoloxidase Activity ของกุ้งที่ได้รับโปรไบโอติกทุกวัน และวันเว้นวันมีค่าสูงขึ้นซึ่งต่างจากกุ้งกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P < 0.05) แล้วลดลงในสัปดาห์ที่ 2 ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) จากกุ้งกลุ่มควบคุม และเมื่อให้อาหารผสมโปรไบโอติกอีกครั้งในสัปดาห์ที่ 3 และ 4 พบว่า Phenoloxidase Activity ของกุ้งที่ได้รับโปรไบโอติกสูงขึ้นเรื่อย ๆ แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) จากกุ้งกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 12 และภาพที่ 11)

ตารางที่ 12 Phenoloxidase Activity ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติก (*B. subtilis* ร่วมกับ *B. licheniformis* 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม) เป็นระยะเวลา 1 เดือน แล้วให้อาหารปกติเป็นเวลา 2 สัปดาห์ จึงให้อาหารผสมโปรไบโอติกครั้งที่ 2

ชุดการทดลอง / สัปดาห์ที่	Phenoloxidase Activity (unit/min/mg protein)		
	กลุ่มควบคุม	วันเว้นวัน	ทุกวัน
ครบ 1 เดือน	132.796 ± 34.134[a]	207.726 ± 93.304[a]	209.963 120.288[a]
1	150.307 ± 100.436[a]	360.549 151.644[b]	366.478 ± 125.080[b]
2	114.156 ± 48.730[a]	141.878 ± 58.347[a]	132.620 ± 107.882[a]
3	83.638 ± 11.156[a]	151.638 ± 15.703[a]	180.563 ± 144.120[a]
4	130.917 ± 68.993[a]	249.527 ± 87.574[a]	210.530 ± 121.236[a]

หมายเหตุ อักษรที่ต่างกันตามแนวนอนแสดงถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *(P*<0.05*)*



ภาพที่ 11 Phenoloxidase Activity ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติก (*B. subtilis* ร่วมกับ *B. licheniformis* 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม) เป็นระยะเวลา 1 เดือน แล้วให้อาหารปกติเป็นเวลา 2 สัปดาห์ จึงให้อาหารผสมโปรไบโอติกครั้งที่ 2

1.3 การศึกษากิจกรรมการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม (Phagocytic Activity)

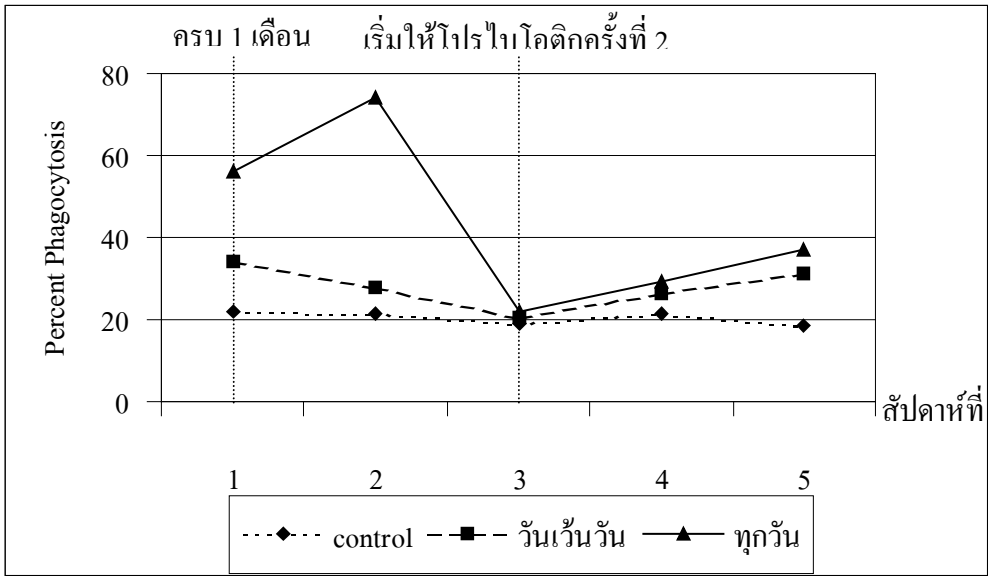
หลังจากกุ้งกุลาดำได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกเป็นระยะเวลา 1 เดือน พบว่า Percent Phagocytosis ของกุ้งที่ได้รับโปรไบโอติกทุกวันมีค่าเฉลี่ยสูงสุด 56.20 ± 18.772 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) จากกุ้งที่ได้รับโปรไบโอติกวันเว้นวัน และกลุ่มควบคุมซึ่งมีค่าเฉลี่ย 34.307 ± 7.629 และ 22 ± 3.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อหยุดให้อาหารผสมโปรไบโอติกก็ยังคงสูงกว่ากุ้งที่เลี้ยงวันเว้นวันและกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) แล้วค่อย ๆ ลดลงเรื่อย ๆ ในสัปดาห์ที่ 2 ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) จากกุ้งกลุ่มควบคุม และเมื่อให้อาหารผสมโปรไบโอติกอีกครั้งในสัปดาห์ที่ 3 และ 4 พบว่าในสัปดาห์ที่ 3 กุ้งที่ได้รับโปรไบโอติกมี Percent Phagocytosis สูงขึ้นเรื่อย ๆ แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) และในสัปดาห์ที่ 4 กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติกทุกวัน และวันเว้นวันมี Percent Phagocytosis สูงขึ้นโดยสูงกว่ากุ้งในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) (ตารางที่ 13 และภาพที่ 12)

เมื่อพิจารณาค่า Phagocytic Index พบว่ากุ้งที่ได้รับโปรไบโอติกทุกวันมีค่าเฉลี่ยสูงสุด 57.158 ± 42.888 ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) จากกุ้งที่ได้รับโปรไบโอติกวันเว้นวันและกลุ่มควบคุม ซึ่งมีค่าเฉลี่ย 14.454 ± 7.155 และ 5.666 ± 1.010 ตามลำดับ เมื่อหยุดให้อาหารผสมโปรไบโอติกก็ยังคงสูงกว่ากุ้งที่เลี้ยงวันเว้นวันและกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) แล้วค่อย ๆ ลดลงเรื่อย ๆ ในสัปดาห์ที่ 2 ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) จากกุ้งกลุ่มควบคุม และเมื่อให้อาหารผสมโปรไบโอติกอีกครั้งในสัปดาห์ที่ 3 และ 4 พบว่า กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติกทุกวัน และวันเว้นวันมี Phagocytic Index สูงขึ้นโดยสูงกว่ากุ้งในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) (ตารางที่ 14 และภาพที่ 13)

ตารางที่ 13 Percent Phagocytosis ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติก (*B. subtilis* ร่วมกับ *B. licheniformis* 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม) เป็นระยะเวลา 1 เดือน แล้วให้อาหารปกติเป็นเวลา 2 สัปดาห์ จึงให้อาหารผสมโปรไบโอติกครั้งที่ 2

ชุดการทดลอง / สัปดาห์ที่	Percent Phagocytosis		
	กลุ่มควบคุม	วันเว้นวัน	ทุกวัน
ครบ 1 เดือน	22.000 ± 3.000[a]	34.307 ± 7.629[a]	56.20 ± 18.772[b]
1	21.500 ± 13.435[a]	27.750 ± 4.991[a]	74.00 ± 8.485[b]
2	19.141 ± 6.740[a]	20.513 ± 6.850[a]	22.017 ± 7.641[a]
3	21.670 ± 8.687[a]	26.390 ± 8.724[a]	29.310 ± 5.862[a]
4	18.750 ± 7.495[a]	31.250 ± 11.124[b]	37.120 ± 9.519[b]

หมายเหตุ อักษรที่ต่างกันตามแนวนอนแสดงถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *(P*<0.05*)*

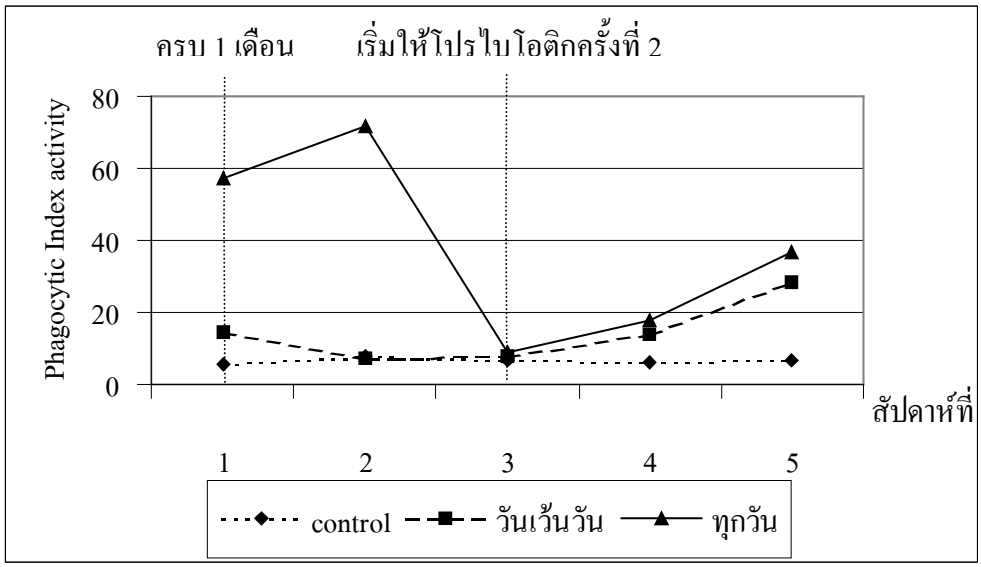


ภาพที่ 12 Percent Phagocytosis ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติก (*B. subtilis* ร่วมกับ *B. licheniformis* 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม) เป็นระยะเวลา 1 เดือน แล้วให้อาหารปกติเป็นเวลา 2 สัปดาห์ จึงให้อาหารผสมโปรไบโอติกครั้งที่ 2

ตารางที่ 14 Phagocytic Index ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติก (*B. subtilis* ร่วมกับ *B. licheniformis* 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม) เป็นระยะเวลา 1 เดือนแล้วให้อาหารปกติเป็นเวลา 2 สัปดาห์ จึงให้อาหารผสมโปรไบโอติกครั้งที่ 2

ชุดการทดลอง / สัปดาห์ที่	Phagocytic Index		
	กลุ่มควบคุม	วันเว้นวัน	ทุกวัน
ครบ 1 เดือน	5.666 ± 1.010^{a}	14.454 ± 7.155^{a}	57.158 ± 42.888^{b}
1	7.685 ± 6.01^{a}	7.115 ± 3.237^{a}	71.673 ± 4.233^{b}
2	6.891 ± 1.457^{a}	7.854 ± 2.981^{a}	9.153 ± 2.546^{a}
3	5.980 ± 2.340^{a}	13.930 ± 4.550^{b}	17.778 ± 7.642^{b}
4	6.547 ± 4.712^{a}	28.379 ± 16.84^{b}	36.630 ± 13.490^{b}

หมายเหตุ อักษรที่ต่างกันตามแนวนอนแสดงถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *(P*<0.05*)*



ภาพที่ 13 Phagocytic Index ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติก (*B. subtilis* ร่วมกับ *B. licheniformis* 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม) เป็นระยะเวลา 1 เดือน แล้วให้อาหารปกติเป็นเวลา 2 สัปดาห์ จึงให้อาหารผสมโปรไบโอติกครั้งที่ 2

1.4 การศึกษากิจกรรมของน้ำเลือดกุ้งกุลาดำในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย (bactericidal activity)

เมื่อนำซีรั่มของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติกเป็นระยะเวลา 1 เดือน เพื่อหาค่าเจือจางของซีรั่มที่สามารถทำลายเชื้อ *V. harveyi* ลดลงได้ 50 เปอร์เซ็นต์ พบว่า Bactericidal Activity ของกุ้งที่เลี้ยงด้วยโปรไบโอติกทุกวัน มีค่าเจือจางของซีรั่มต่ำที่สุดที่ทำให้เชื้อแบคทีเรียลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ ที่ 1:64 ซึ่งแตกต่างจากกุ้งที่เลี้ยงวันเว้นวัน และกลุ่มควบคุม แล้วค่อย ๆ ลดลงเรื่อย ๆ จนเท่ากับกลุ่มควบคุมในสัปดาห์ที่ 2 และเมื่อให้อาหารผสมโปรไบโอติกอีกครั้งในสัปดาห์ที่ 3 และ 4 พบว่า ในสัปดาห์ที่ 3 กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติกทุกวันค่า Bactericidal Activity ที่ 1:32 ซึ่งแตกต่างจากกุ้งที่เลี้ยงวันเว้นวัน และกลุ่มควบคุม และในสัปดาห์ที่ 4 พบว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติกทุกวันค่า และวันเว้นวันมีค่า Bactericidal Activity ที่ 1:32 ซึ่งแตกต่างจากกุ้งกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 15)

ตารางที่ 15 Bactericidal Activity ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติก(*B. subtilis* ร่วมกับ *B. licheniformis* 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม) เป็นระยะเวลา 1 เดือน แล้วให้อาหารปกติเป็นเวลา 2 สัปดาห์ จึงให้อาหารผสมโปรไบโอติกครั้งที่ 2

ชุดการทดลอง / สัปดาห์ที่	Bactericidal Activity		
	กลุ่มควบคุม	วันเว้นวัน	ทุกวัน
ครบ 1 เดือน	1:8	1:32	1:64
1	1:16	1:32	1:32
2	1:8	1:8	1:8
3	1:8	1:16	1:32
4	1:8	1:32	1:32

2. การศึกษาปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในลำไส้

2.1 จำนวนเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ทั้งหมดในลำไส้ (Total *Vibrio* Count)

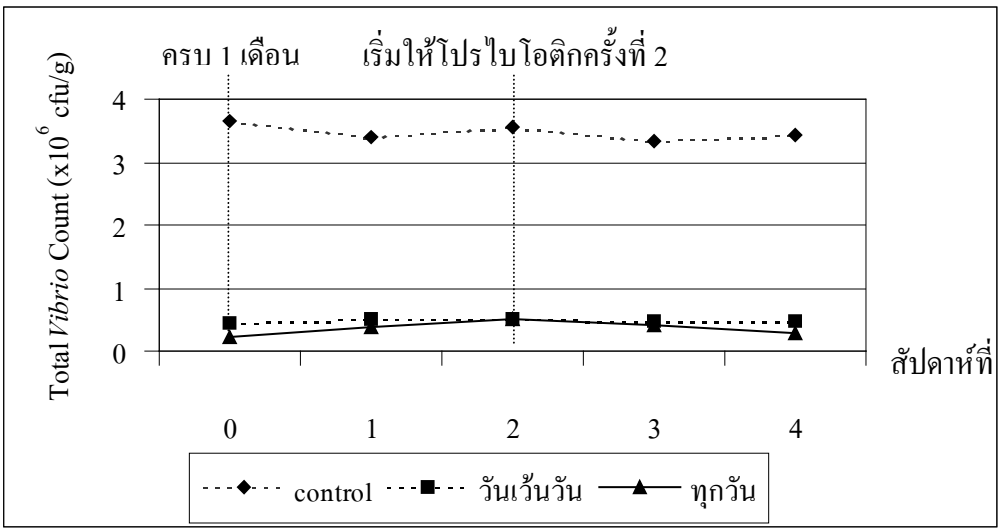
หลังจากกุ้งกุลาดำได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกเป็นระยะเวลา 1 เดือน แล้วจึงนำลำไส้กุ้งมาบดเพื่อนับปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. โดยวิธี spread plate บนTCBS agar พบว่ากุ้งที่รับอาหารผสมโปรไบโอติกทุกวันมีจำนวนเชื้อ *Vibrio* spp. เฉลี่ยน้อยที่สุดคือ

0.220 ± 0.192 x10^6 cfu/g ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) จากกุ้งที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกวันเว้นวัน แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) จากกุ้งกลุ่มควบคุม เมื่อหยุดให้อาหารผสมโปรไบโอติกในสัปดาห์ที่ 1 และ 2 จำนวนเชื้อ *Vibrio* spp. เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ แต่ยังคงน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แต่ไม่แตกต่าง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) กับกุ้งที่เลี้ยงวันเว้นวัน เมื่อให้อาหารผสมโปรไบโอติกอีกครั้งในสัปดาห์ที่ 3 และ 4 พบว่าลำไส้กุ้งที่ได้รับโปรไบโอติกทุกวันและวันเว้นวันมีจำนวนเชื้อ *Vibrio* spp. ลดลงโดยต่ำกว่ากุ้งในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 16 และภาพที่ 14)

ตารางที่ 16 Total *Vibrio* Count ของลำไส้กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติก (*B. subtilis* ร่วมกับ *B. licheniformis* 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม) เป็นระยะเวลา 1 เดือน แล้วให้อาหารปกติเป็นเวลา 2 สัปดาห์ จึงให้อาหารผสมโปรไบโอติกครั้งที่ 2

ชุดการทดลอง / สัปดาห์ที่	**Total *Vibrio* Count (x10^6 cfu/g)**		
	กลุ่มควบคุม	วันเว้นวัน	ทุกวัน
ครบ 1 เดือน	3.650 ± 1.231^b	0.440 ± 0.223^a	0.220 ± 0.192^a
1	3.400 ± 0.250^b	0.500 ± 0.484^a	0.380 ± 0.291^a
2	3.570 ± 0.341^b	0.520 ± 0.254^a	0.500 ± 0.234^a
3	3.330 ± 2.144^b	0.480 ± 0.273^a	0.410 ± 0.212^a
4	3.420 ± 1.520^b	0.470 ± 0.158^a	0.290 ± 2.273^a

หมายเหตุ อักษรที่ต่างกันตามแนวนอนแสดงถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *($P<0.05$)*



ภาพที่ 14 Total *Vibrio* Count ของลำไส้กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติก (*B. subtilis* ร่วมกับ *B. licheniformis* 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม) เป็นระยะเวลา 1 เดือน แล้วให้อาหารปกติเป็นเวลา 2 สัปดาห์ จึงให้อาหารผสมโปรไบโอติกครั้งที่ 2

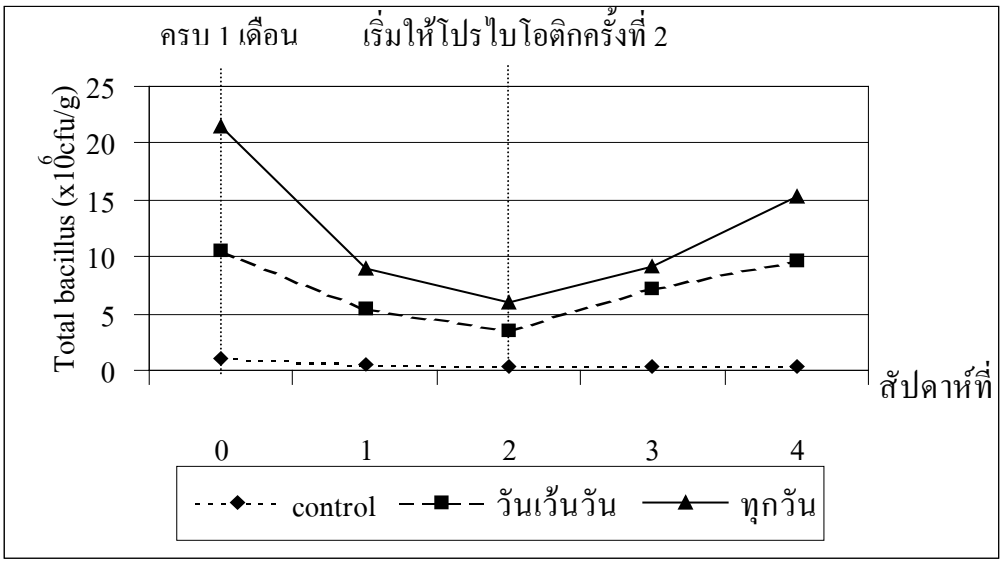
2.2 จำนวนเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ทั้งหมดในลำไส้ (Total *Bacillus* Count)

เมื่อนำลำไส้กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติกเป็นระยะเวลา 1 เดือนมาบดเพื่อนับปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp.ด้วยวิธี spread plate บนNA agar (โดยพิจารณาจากขนาด รูปร่างของเชื้อจากการย้อมแกรมและลักษณะเฉพาะของโคโลนี) พบว่า กุ้งที่รับอาหารผสมโปรไบโอติกทุกวันมีจำนวนเชื้อ *Bacillus* spp.. เฉลี่ยสูงที่สุดคือ 21.5 $\pm$ 1.620 x10^6 cfu/g ซึ่งแตกต่างจากกุ้งที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกวันเว้นวันและกุ้งกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) เมื่อหยุดให้อาหารผสมโปรไบโอติกในสัปดาห์ที่ 1 และ 2 จำนวนเชื้อ *Bacillus* spp. ลดลงเรื่อย ๆ แต่ยังคงสูงกว่ากุ้งที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกวันเว้นวันและกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) เมื่อให้อาหารผสมโปรไบโอติกอีกครั้งในสัปดาห์ที่ 3 และ 4 พบว่าลำไส้กุ้งที่ได้รับโปรไบโอติกมีจำนวนเชื้อ *Bacillus* spp. สูงขึ้นโดยกุ้งที่ได้รับโปรไบโอติกทุกวันมีจำนวนเชื้อ *Bacillus* spp. สูงที่สุดซึ่งแตกต่างจากกุ้งที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกวันเว้นวันและกุ้งกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) (ตารางที่ 17 และภาพที่ 15)

ตารางที่ 17 Total *Bacillus* Count ของลำไส้กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติก (*B. subtilis* ร่วมกับ *B. licheniformis* 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม) เป็นระยะเวลา 1 เดือนแล้วให้อาหารปกติเป็นเวลา 2 สัปดาห์จึงให้อาหารผสมโปรไบโอติกครั้งที่ 2

ชุดการทดลอง / สัปดาห์ที่	Total *Bacillus* Count ($x10^6$ cfu/g)		
	กลุ่มควบคุม	วันเว้นวัน	ทุกวัน
ครบ 1 เดือน	1.100 ± 0.158^a	10.500 ± 1.541^b	21.5 ± 1.620^c
1	0.500 ± 0.254^a	5.500 ± 2.371^b	9.000 ± 1.837^c
2	0.400 ± 0.353^a	3.500 ± 2.150^b	6.000 ± 1.118^c
3	0.300 ± 0.070^a	7.200 ± 0.384^b	9.080 ± 2.007^c
4	0.300 ± 0.212^a	9.600 ± 0.748^b	15.400 ± 2.025^c

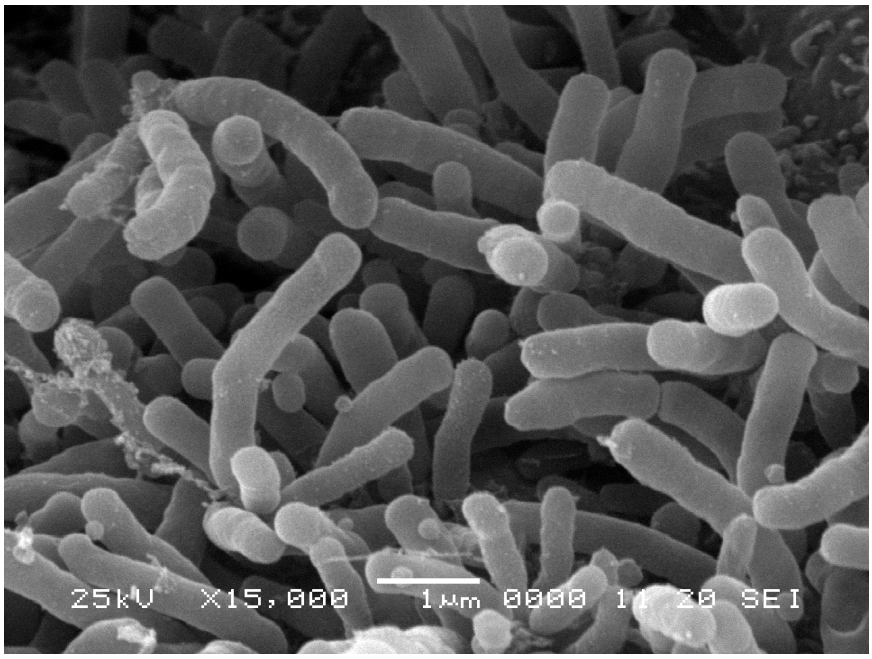
หมายเหตุ อักษรที่ต่างกันตามแนวนอนแสดงถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *(P*<0.05*)*



ภาพที่ 15 Total *Bacillus* Count ของลำไส้กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติก(*B. subtilis* ร่วมกับ *B. licheniformis* 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม) เป็นระยะเวลา 1 เดือน แล้วให้อาหารปกติเป็นเวลา 2 สัปดาห์จึง ให้อาหารผสมโปรไบโอติกครั้งที่ 2

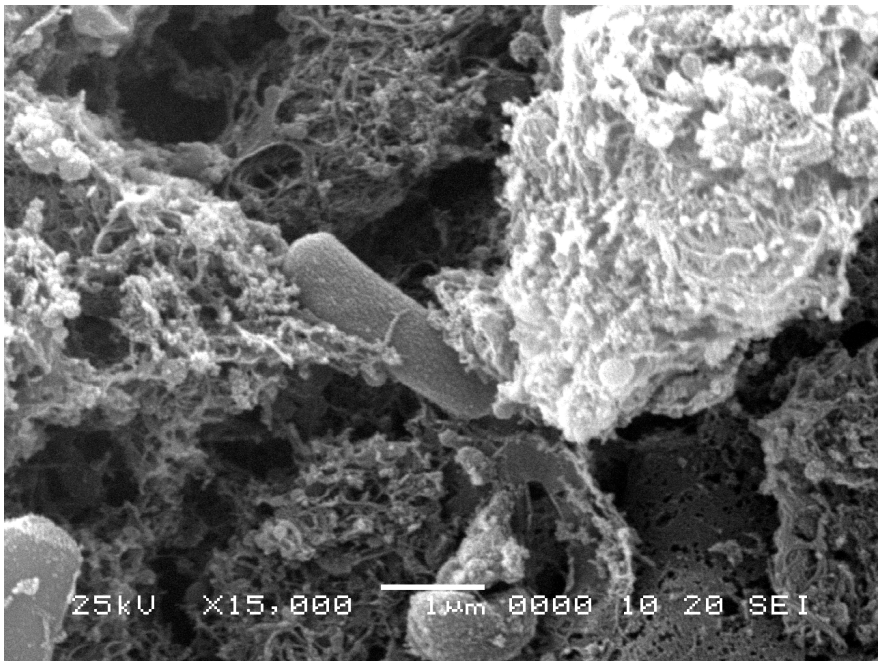
2.3 การตรวจหาเชื้อแบคทีเรียโดย Scanning Electron Microscope (SEM)

เมื่อนำลำไส้กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *B. subtilis* ร่วมกับ *B. licheniformis* 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ทุกวันเป็นระยะเวลา 1 เดือน และกลุ่มควบคุมมาตรวจหาเชื้อแบคทีเรียโดยส่องภายใต้กล้อง Scanning Electron Microscope (SEM) เพื่อประเมินบทบาทและการดำรงอยู่ของโปรไบโอติกในลำไส้กุ้ง พบว่า บริเวณผนังลำไส้ของกุ้งที่ได้โปรไบโอติกผสมในอาหารมีจำนวนเชื้อแบคทีเรียมากกว่าในกลุ่มควบคุม ซึ่งเชื้อที่พบส่วนมากจะมีลักษณะเป็นแท่งยาว ขนาดยาวประมาณ 2-3 ไมครอน (ภาพที่16) แต่เชื้อแบคทีเรียที่พบในลำไส้กุ้งกลุ่มควบคุมจะมี 2 ชนิด ซึ่งลักษณะเป็นแท่งยาวประมาณ 2 ไมครอน และเป็นแท่งงอยาวประมาณ 1 ไมครอน (ภาพที่ 17-18)



ภาพที่ 16 ลำไส้ของกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *B. subtilis* ร่วมกับ *B. licheniformis* 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ทุกวันเป็นระยะเวลา 1 เดือน ที่ส่องภายใต้กล้อง Scanning Electron Microscope (SEM)

ภาพที่ 17 ลำไส้ของกุ้งกลุ่มควบคุมที่ส่องภายใต้กล้อง Scanning Electron Microscope (SEM)



ภาพที่ 18 ลำไส้ของกุ้งกลุ่มควบคุมที่ส่องภายใต้กล้อง Scanning Electron Microscope (SEM)

วิจารณ์ผลการทดลอง

ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีการใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกกันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากจุลินทรีย์โปรไบโอติกมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อที่ก่อให้เกิดโรค โดยการเข้าไปแย่งชิงพื้นที่ยึดเกาะภายในลำไส้ ช่วยปรับปรุงคุณภาพน้ำให้ดีขึ้น และยังสามารถเพิ่มภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำให้ดีขึ้นอีกด้วย (Heyman and Menard, 2002., Verschuere *et al.,* 2000) การใช้โปรไบโอติกกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งยังมีน้อยอยู่ ซึ่งพบรายงานของ Gullian *et al.* (2004) ที่ทำการเลือกชนิดของจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei* โดยใช้เชื้อ *Vibrio* P62 , *Vibrio* P63 และ *Bacillus* P64 ที่แยกได้จาก hepatopancreas และลำไส้กุ้ง พบว่า กุ้งที่ได้รับ *Bacillus* P64 เสริมในอาหารมีระดับภูมิคุ้มกันสูงที่สุดโดยสูงกว่ากุ้งในกลุ่มอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) Rengpipat *et al.* (2000) พบว่า *Bacillus* S11 แสดงสมบัติเป็นโปรไบโอติกต่อการเจริญเติบโตและการเสริมภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์ และสารน้ำในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* โดยเลี้ยงกุ้งในบ่อที่มีระบบน้ำแบบปิดเป็นเวลา 90 วัน พบว่า น้ำหนักตัวและอัตราการรอดตายของกุ้งกุลาดำสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) เมื่อเสริมโปรไบโอติกให้กุ้งระยะ postlarvae แต่ไม่มีผลเพิ่มน้ำหนักและการรอดตายในกุ้งระยะวัยรุ่น *Bacillus* S11มีผลช่วยกระตุ้นประสิทธิภาพการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมโดยวิธี Phagocytosis และเพิ่มปริมาณ Phenoloxidase ในเม็ดเลือดกุ้งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) เมื่อเทียบกับกุ้งกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับ *Bacillus* S11 เสริมในอาหาร

การศึกษาการใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำครั้งนี้ ทำการแยก *Bacillus* จากลำไส้กุ้งกุลาดำ ได้ 3 สายพันธุ์ คือ *B. subtilis*, *B. licheniformis* และ *B. sphaericus* โดยในการทดลองได้เลือกใช้จุลินทรีย์เพียง 2 สายพันธุ์ คือ *B. subtilis* และ *B. licheniformis* เนื่องจาก *B. sphaericus* มีข้อมูลอ้างอิงถึงความเป็นพิษต่อยุง ทั้งในระยะตัวอ่อนและตัวเต็มวัย (Stray *et al.*, 1988) ซึ่งยุงจัดอยู่ในกลุ่มครัสเตเชียนเช่นเดียวกับกุ้ง

การศึกษาชนิดและระดับความเข้มข้นของจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่เหมาะสมในการผสมอาหารเพื่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ใช้จุลินทรีย์ที่แยกได้จากลำไส้กุ้งกุลาดำในรูปสปอร์ การใช้เชื้อ *Bacillus* ในรูปของสปอร์นั้นจะช่วยในเรื่องการจัดการ การเก็บรักษา และยังสามารถคลุกในอาหารได้อย่างทั่วถึง (Gatesoupe, 1999)โดยมีจำนวนเชื้อ $1x10^{10}$ cfu/g ทำการศึกษาโดยเลือกใช้ เชื้อ *B. subtilis* เชื้อ *B. licheniformis* และ เชื้อ *B. subtilis* ร่วมกับ

B. licheniformis (อัตราส่วน 1:1) โดยผสมในอาหารกุ้งที่ระดับความเข้มข้น 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม และ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เลี้ยงเป็นระยะเวลา 1 เดือน แล้วศึกษาองค์ประกอบต่าง ๆ ทางด้านภูมิคุ้มกัน ได้แก่ Total Haemocytes Count, Phenoloxidase Activity, Percent Phagocytosis, Phagocytic Index และ Bactericidal Activity พบว่า การใช้ *B. subtilis* ร่วมกับ *B. licheniformis* ที่ 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีผลทำให้ระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งสูงขึ้นกว่ากลุ่มอื่น ๆ ซึ่งมีปริมาณเม็ดเลือดรวมเฉลี่ยสูงที่สุดคือ $2.670 \pm 0.959 \times 10^7$ cells/ml สามารถกลืนกินสิ่งแปลกปลอมได้สูงสุด คือ 27.248 ± 3.732 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าเจือจางของซีรั่มมากที่สุดที่ทำให้เชื้อแบคทีเรียลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างจากกุ้งที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกในชุดการทดลองอื่น ๆ รวมทั้งกุ้งในกลุ่มควบคุมด้วย

กลไกในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำโดยจุลินทรีย์โปรไบโอติกยังไม่ทราบแน่ชัด เนื่องจากมีผู้ศึกษาผลของโปรไบโอติกต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันน้อย ซึ่งคาดว่าโปรไบโอติกสามารถเพิ่มความต้านทานโรคในกุ้งกุลาดำได้เหมือนกับสัตว์มีกระดูกสันหลังคือ ป้องกันการเกาะผนังลำไส้ของเชื้อก่อโรค และกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่เกิดเองโดยธรรมชาติ ส่วนการกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นภายหลังจากการที่มีการบุกรุกของเชื้อโรคอย่างจำเพาะเจาะจงไม่น่าเกิดในกุ้งกุลาดำ เนื่องจากระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งเป็นแบบไม่จำเพาะ ไม่มีความทรงจำที่จะสามารถสร้างแอนติบอดี้ได้เหมือนคนหรือสัตว์ชั้นสูงชนิดอื่น (Lackie,1980 ; Ratcliffe *et al.*, 1985 Thornqvist and Soderhall,1997) การกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายกุ้งกุลาดำส่วนใหญ่เป็นการทำงานของเม็ดเลือดซึ่งเป็นการทำงานร่วมกันเพื่อดักจับกินสิ่งแปลกปลอม เมื่อจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่ผสมอาหารให้กุ้งกินนั้นตายลงก็พร้อมที่จะเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันแก่กุ้งกุลาดำ หรือแม้แต่แบคทีเรียแกรมลบที่ก่อให้เกิดโรคบริเวณลำไส้เมื่อตายลงไปซากของแบคทีเรียก็เป็นประโยชน์ในการสร้างภูมิคุ้กันแก่กุ้งได้เช่นกัน

B. subtilis และ *B. licheniformis* สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งกลาดำได้ อาจเกิดจากเปปติโดไกลแคนซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมบวกเป็นตัวกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ซึ่งสอดคล้องกับ Itami *et al*. (1998) ศึกษาประสิทธิภาพของเปปติโดไกลเคนจาก *Bifidobacterium thermophilum* ในกุ้ง *Penaeus japonicus* พบว่า กุ้งที่ได้รับอาหารผสมเปปติโด-ไกลแคนมีค่า Phagocytic Index สูงกว่ากลุ่มควบคุม และยังมีความต้านทานโรคสูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเปปติโดไกลแคนอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเหนี่ยวนำด้วยเชื้อ *Vibrio penaeicida* และไวรัส

WSSV จันทนา (2539) ใช้เซลล์ *Clostridium butyricum* ที่ทำให้ตายด้วยฟอร์มาลินเสริมลงในอาหาร และตรวจสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคในกุ้งกุลาดำ พบว่า กุ้งที่ได้รับ *C.. butyricum* เสริมในอาหารมีความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* และกระตุ้นให้กระบวนการ Phagocytosis และ ปริมาณ Bactericidin สูงขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

จากผลการทดลองเพื่อหาระยะเวลาในการให้จุลินทรีย์โปรไบโอติกที่เหมาะสมในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ พบว่า ในสัปดาห์ที่ 1 ที่หยุดให้อาหารผสมโปรไบโอติกค่า Phenoloxidase Activity, Percent Phagocytosis และ Phagocytic Index ของกุ้งที่ได้รับโปรไบโอติกทุกวัน มีระดับสูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัดซึ่งต่างจากกุ้งกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และมีการตายของเชื้อ *Bacillus* sp. โดยพิจารณาจากปริมาณ *Bacillus* sp. ทั้งหมดในลำไส้ที่ลดลงเป็นจำนวนมากจาก $21.5 \pm 1.620 \times 10^6$ cells/g เหลือเพียง $9.000 \pm 1.837 \times 10^6$ cells/g ซึ่งเป็นไปได้ว่าในสัปดาห์นี้กุ้งได้รับเปปติโดไกลแคนเป็นจำนวนมาก จนสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้สูงขึ้นได้ และพบว่าระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งในสัปดาห์ที่ 2 ลดลง ซึ่งปริมาณ *Bacillus* sp. ทั้งหมดในลำไส้ลดลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้นจาก $9.000 \pm 1.837 \times 10^6$ cells/g เหลือเพียง $6.000 \pm 1.118 \times 10^6$ cells/g กุ้งจึงได้รับเปปติโดไกลแคนในปริมาณที่น้อยกว่าในสัปดาห์แรก ส่งผลให้ระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งในสัปดาห์นี้ลดลง

เมื่อนำลำไส้กุ้งไปวิเคราะห์หาจำนวนเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp และ *Bacillus* spp ทั้งหมดและตรวจหาเชื้อแบคทีเรียโดยส่องใต้กล้อง Scanning Electron Microscope (SEM) เพื่อประเมินบทบาทและการดำรงอยู่ของโปรไบโอติก พบว่าในลำไส้กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติกทุกกลุ่มทดลองมีจำนวนเชื้อ *Vibrio* spp. ลักษณะเป็นแท่งงอ ยาวประมาณ 1 ไมครอนในลำไส้น้อยกว่ากลุ่มควบคุม และมี *Bacillus* spp ลักษณะเป็นแท่งยาว ขนาดประมาณ 1.5-3 ไมครอนมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แสดงให้เห็นว่า เชื้อ *Bacillus* สามารถดำรงชีวิตอยู่ในลำไส้ได้จริงโดยเข้าไปแย่งพื้นที่ แย่งอาหารรวมทั้งปัจจัยอื่น ๆ จากแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค เพื่อสร้างตัวเองให้โดดเด่นขึ้นมา หรือมีปริมาณมากกว่าแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค ตลอดจนสามารถสร้างสารปฏิชีวนะ (Antibiotic) ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตหรือทำลายแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคได้ โดย *B. subtilis* จะสร้างสาร Mycobacillin, Subtilin, Bacilysin, Bacillin และ Subsprorin ส่วน *B. licheniformis* สามารถสร้างสาร Bacitraciin, Proticin และ Licheniformin (Edward and Amold, 1977) ซึ่งสอดคล้องกับมณจันทร์ และกมลพร (2543) ที่ทำการศึกษา

ประสิทธิภาพของแบคทีเรีย 8 ชนิด คือ *B. subtilis* AM-01, *B. licheniformis* AM-04, *Bacillus* sp. AM-14, *Bacillus* sp. AM-3065, *Nitrosomonas* sp. AM-11, *Nitrobactor* sp. AM-12, *Thiobacillus* sp. FW01 และ *Thiobacillus* sp. SW-01 ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ที่เป็นสาเหตุของโรคเรืองแสงในกุ้ง หลังการทดสอบ 72 ชั่วโมงในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่ามี 3 ชนิดที่มีศักยภาพในการยับยั้ง ได้แก่ *B. subtilis* AM-01, *B. licheniformis* AM-04 และ *Nitrosomonas* sp. AM-11 ถึงแม้ว่า *B. subtilis* AM-01 จะสามารถควบคุมการเจริญเติบโตของ *V. harveyi* แบบเข้าครอบครองบนอาหารเลี้ยงเชื้อช้ากว่า *B. licheniformis* AM-04 และ *Nitrosomonas* sp. AM-11 ก็ตาม แต่เมื่อนำ *V. harveyi* ที่ทดสอบด้วย *B. subtilis* AM-01นี้ไปศึกษาดูความผิดปกติด้วยกล้อง Transmission Electron Microscope พบรูปร่างทางสัณฐานวิทยาเปลี่ยนแปลงและขนาดเล็กลงกว่าปกติมากที่สุด ซึ่งความผิดปกตินี้เป็นลักษณะถาวร ไม่มีแนวโน้มที่จะกลับคืนสภาพปกติ และพรชัย (2545) ศึกษาประสิทธิภาพของสารประกอบจุลินทรีย์ในการยับยั้งแบคทีเรียสกุลวิบริโอ ซึ่งสารประกอบที่ใช้ในการทดลองประกอบด้วยเชื้อ *Bacillus* 3 ชนิด คือ *B. subtilis*, *B. licheniformis* และ *B. cereus* มีปริมาณเชื้อรวมทั้งหมด 1.116×10^{11} cfu/g พบว่าสารประกอบจุลินทรีย์ดังกล่าวที่ระดับความเข้มข้น 5, 50, 500 และ 5000 ppmมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. harveyi* โดยการยับยั้งเชื้อ *V. parahaemolyticus* จะเกิดได้ดีในช่วงต้น ๆ ที่ทุก ๆ ระดับความเข้มข้น ส่วนการยับยั้งเชื้อ *V. harveyi* พบว่า ทุกระดับความเข้มข้นของ *Bacillus* ให้ผลดีตลอดการทดลอง

การศึกษาการใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติก2 ชนิด หรือมากกว่า 2 ชนิดร่วมกันในการเลี้ยงสัตว์น้ำยังคงมีน้อยอยู่ ซึ่งการใช้จุลินทรีย์ร่วมกันนั้นน่าที่จะสามารถเพิ่มโอกาสในการยึดเกาะในลำไส้เพิ่มมากขึ้น ซึ่งส่งผลทำให้ระบบภูมิคุ้มกันทำงานดีขึ้นอย่างต่อเนื่อง ซึ่งจากการศึกษาระยะเวลาการให้จุลินทรีย์ *B. subtilis* ร่วมกับ *B. licheniformis* ความเข้มข้น 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม (1:1) ที่เหมาะสมในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ พบว่า กุ้งที่รับอาหารผสมโปรไบโอติกทุกวันเป็นระยะเวลา 1 เดือน มีระดับภูมิคุ้มกันสูงกว่ากลุ่มอื่น ๆ โดยพิจารณาจากการตรวจองค์ประกอบต่าง ๆ ทางภูมิคุ้มกัน เมื่อหยุดให้โปรไบโอติกโดย ให้อาหารปกติที่ไม่ผสมโปรไบโอติกเหมือนกับกลุ่มควบคุม พบว่า ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งสูงกว่ากลุ่มควบคุมเพียง 1 สัปดาห์เท่านั้น และเมื่อให้อาหารผสมโปรไบโอติกอีกครั้งในสัปดาห์ที่ 3 และ 4 พบว่า ระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งเพิ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ และแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าการกระตุ้นภูมิคุ้มตลอดการเลี้ยงควรใช้โปรไบโอติกผสมในอาหารอย่างต่อเนื่อง ซึ่งจากการศึกษาของ Salinas *et al.*(2005) พบว่าปลา seabream ที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Lactobacillus delbrüeckii* lactis 0.5×10^{7} cfu/g ร่วมกับ

B. subtilis 0.5 x 10^7 cfu/g เป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ สามารถกระตุ้นให้ Leucocytes กำจัดสิ่งแปลกปลอมโดยการกลืนกิน (Phagocytic Activity) ได้ดีกว่าปลาที่ได้รับเชื้อจุลินทรีย์เพียงชนิดเดียว แต่ทำให้ค่า Phagocytic Activity อยู่ได้ไม่นาน เพียง 1 สัปดาห์ก็ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม

ดังนั้นในการใช้โปรไบโอติกกับการเลี้ยงกุ้งกุลาดำจึงควรใช้จุลินทรีย์ชนิด *B. subtilis* ร่วมกับ *B. licheniformis* ที่ระดับความเข้มข้น 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีผลในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำได้เป็นอย่างดี โดยควรให้จุลินทรีย์ดังกล่าวอย่างต่อเนื่องในระหว่างการเลี้ยง

สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองเพื่อศึกษาชนิดและระดับความเข้มข้นของจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่เหมาะสมในการผสมอาหารเพื่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ พบว่า การใช้ *Bacillus subtilis* ร่วมกับ *Bacillus licheniformis* (1:1) 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีผลทำให้ระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งสูงขึ้นกว่ากลุ่มอื่น ๆ โดยประเมินจากองค์ประกอบต่าง ๆ ทางด้านภูมิคุ้มกัน ได้แก่ Total Haemocytes Count, Phenoloxidase Activity, Percent Phagocytosis, Phagocytic Index และ Bactericidal Activity และยังพบว่าในลำไส้กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติกทุกกลุ่มทดลองมีจำนวนเชื้อ *Vibrio* spp. ในลำไส้น้อยกว่ากลุ่มควบคุม และมี *Bacillus* spp มากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

การทดลองเพื่อหาระยะเวลาการให้จุลินทรีย์ *B. subtilis* ร่วมกับ *B. licheniformis* ความเข้มข้น 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ที่เหมาะสมในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ พบว่า กุ้งที่รับอาหารผสมโปรไบโอติกทุกวันเป็นระยะเวลา 1 เดือน มีระดับภูมิคุ้มกันสูงกว่ากลุ่มอื่น ๆ และเมื่อหยุดให้โปรไบโอติกพบว่า ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งยังคงสูงกว่ากลุ่มควบคุมเพียง 1 สัปดาห์เท่านั้น และเมื่อให้อาหารผสมโปรไบโอติกอีกครั้งในสัปดาห์ที่ 3 และ 4 พบว่า ระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งเพิ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ และแตกต่างจากกลุ่มควบคุม และพบว่าในลำไส้กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติกทุกกลุ่มทดลองมีจำนวนเชื้อ *Vibrio* spp. ในลำไส้น้อยกว่ากลุ่มควบคุม และมี *Bacillus* spp มากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ดังนั้นในการใช้โปรไบโอติกกับการเลี้ยงกุ้งกุลาดำควรใช้จุลินทรีย์ชนิด *B. subtilis* ร่วมกับ *B. licheniformis* ที่ระดับความเข้มข้น 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม โดยควรให้จุลินทรีย์ดังกล่าวอย่างทุกวันตลอดระหว่างการเลี้ยง

ข้อเสนอแนะ

กุ้งกุลาดำเป็นสัตว์เลือดเย็น ซึ่งมีระบบกลไกทางชีวเคมีภายในร่างกายแปรเปลี่ยนไปตามสภาพแวดล้อมภายนอก ถึงแม้ว่าสามารถทนอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงได้ในช่วงกว้าง แต่กุ้งจะสามารถเจริญเติบโตและดำรงชีวิตได้ดีที่สุดในสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมในช่วงแคบ ๆ เท่านั้น ทั้งยังส่งผลต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันด้วย ดังนั้นควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมบางประการที่มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ เพื่อเป็นแนวทางในการจัดการระบบการเลี้ยงควบคู่ไปกับการใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกได้อย่างมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

ปัจจุบันเกษตรกรหันไปเลี้ยงกุ้งขาว (Litop*enaeus vannamei*) เป็นจำวนมาก เนื่องจากเป็นกุ้งที่ผ่านการพัฒนาทางสายพันธุ์เป็นเวลานาน ทำให้ใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงสั้น อัตราการรอดสูง ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาการใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกที่เหมาะสมในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการเพิ่มผลผลิตในการเลี้ยงกุ้งชนิดนี้

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กิจการ ศุภมาตย์, วุฒิพร พรหมขุนทอง, ชุติมา ตันติกิตติ และ R. Hoffmann. 2543ก. ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ : II เซลล์และเนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมในกุ้งกุลาดำ. **วารสารสงขลานครินทร์**. 22: 581-588.

_____, สุภาพ เกียรติทับทิว และ R. Hoffmann. 2543ข. ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ: III การศึกษาทางจุลทรรศน์อิเลคตรอนของเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำ. **วารสารสงขลานครินทร์.** 22: 589-596.

คมสัน ลีลาคหกิจ. 2539. กฎหมายใหม่ของญี่ปุ่นกับการส่งออกกุ้งกุลาดำของไทย. **วิชาการปริทัศน์** 2 : 6-8.

จันทนา นิธิเมธาโชค. 2539. **การใช้สารกระตุ้นภูมิในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* โดย *Clostridium butyricum***. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาคจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

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

นิพนธ์ เหมาะประสิทธิ์. 2522. ผลของอาหารผสมซึ่งมีระดับโปรตีนต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ, น. 86 *ใน* **รายงานประจำปีหน่วยอาหารกุ้งและปลา**. งานทดลองและวิจัยเพื่อการเพาะเลี้ยง. กองประมงน้ำกร่อย กรมประมง, กรุงเทพฯ.

บุญรัตน์ ประทุมชาติ. 2545. **การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง (Costal Aquaculture)**. ภาควิชาวาริช-ศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา

ประจวบ หลำอุบล. 2530. **ความรู้เรื่องการเลี้ยงกุ้ง**. กรุงเทพ ฯ: ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

พรชัย รุ่งศรี. 2545. การใช้สารประกอบจุลินทรีย์ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำและประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียสกุลวิบริโอ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตร์.

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

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

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

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

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

สุวิทย์ ชื่นสินธุ์. 2531. **การเลี้ยงกุ้งแชบ๊วยและกุ้งกุลาดำ**. สำนักพิมพ์ศูนย์หนังสือเกษตร, กรุงเทพฯ.

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

Austin, B., L. F. Stuckey, P. A. W. Robertson, I. Effendi and D. R. W. Griffith. 1995. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida, Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. **J. Fish Dis** 18: 93-96.

Bauchau, A.G. 1981. Crustaceans**,** pp. 385-420. *In* N.A. Ratcliffe, A. F. Rowley, (eds.), **Invertebrate Blood Cells.** Academic Press. London .

Byun, J.W., S.C. Park, Y. Benno and T.K. Oh. 1997. Probiotic effect of *Lactobacillus* sp. DS-12 in flounder (*Parslinchthys olivacaceus*). **J. Gen. Appl. Microbiol.** 43:305-308.

Chythanya, R., K. Indrani, K. Iddya. 2002. Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by a marine *Pseudominas* I-2 strain. **Aquaculture** 2002: 1-10.

Douillet, P.A. and C. J. Langdon. 1994. Use of a probiotic for the culture of larvae of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thumberg). **Aquaculture.** 119: 25-40.

Edward, K. and L.D. Amold. 1977. The peptide antibiotics of *Bacillus.* **Chemistry Biogenesis and Possible Function**. 41:449-473

Flegel, T.W., D.F. Fegan, S. Kongsom, S. Vuthikomudomkit, S. Sriurairatana, S. Boonyaratpalin, S. Chantanachookhin, C. Vickers, J. E. and O.D. Macdonald, 1992. Occurrence, diagnosis and treatment of shrimp diseases in Thailand, pp. 57-112. *In* Fulks,W. and Main, K. L. (eds.), **Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and United States**, Hawaii.

Fontaine, C. T. and D. V. Lightner. 1974. Observations on the phagocytosis and elimination of carmine particles injected into the abdominal musculature of the white shrimp, *Penaeus setiperus* **J. Inver. Pathol**. 24 : 141-148.

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

_____. 1992. History and development of probiotics, pp. 1-8 *In* Fuller, R. (ed.) **Probiotics the Scientific Basis**, **1st ed**. London: Chapman &Hall.

Gatesoupe, F.J. 1999. Review / The use of probiotic in aquaculture. **Aquaculture.** 180:147-165.

Gibson , L., J. Woodworth and A. George. 1998. Probiotic activity of *Aeromonas media* on the Pacific oyster, *Crassostrea gigas,* when challenged with *Vibrio tubiasshii.* **Aquaculture.** 169: 111-120

Gildberg, A., A. Johansen and J. Bogwald. 1995. Growth and survival of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fly given diets supplement with fish protein hydrolysate and lactic acid bacteria during a challenge trial with *Aeromonas salmonicida.* **Aquaculture.** 138: 23-34.

Gram, L., J. Melchiorsen, B. Speanggaard, I. Huber and T.F. Nielsen. 1999. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. **Appl. Environ. Microbiol.** 65: 969-973.

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

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 & Diseases.** London: Elsevier Applied Science.

Heyman, M. and S. Menard. 2002. Probiotic microorganisms: how they affect intestinal pathophysiology. **Cellular and Molecular Life Sciences.** 59:1-15.

Holzapfel, W.H., P. Haberer, J. Snel, U.Schillinger and J. H. J. Huis in't Veld.1998. Overview of gut flora and probiotics. **Int. J. Food Microbiol**. 41: 85-101.

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

Iriantoา A. and B. Austin. 2002. Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **J. Fish Dis.** 25:1-10.

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

_____, Y. Takahashi, E. Tsuchihira and H. Igusa. 1994. Enhancement of disease resistance of kuruma prawn *Penaeus japonicus* and increase in phagocytic activity of prawn hemocytes after oral administration of β-1, 3 –glucan (Schizophyllan), pp. 375-378. *In* L.M. Chou, A.D. Munro, T. J. Lam, T.W. Chen, L.K.K. Cheong, J.K. Ding, K.K. Hooi, H.W. Khoo, V.P.E. Phang, K.F. Shim, C.H. Tan (eds). **The Thrid Asian Fisheries Forum.** Asian Fisheries Society, Manila, Philippines.

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

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

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

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: 789-799.

Lilly, D.M. and R.H. Stillwell. 1965. Probiotics : growth promoting factors produced by microorganisms. **Science.** 147: 744-748.

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193: 265-275.

Martin, G.G., D. Poole, C. Poole, J.E. Hose, M. Arias, L. Reynolds, N. Mckrell and A. Whang. 1993. Clearance of bacteria injected into the hemolymph of the Penaeid shrimp, *Sicyonia ingentis.* **J. Inver. Pathol**. 62: 308-315.

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

Metchnikoff , E. 1907. **The Prolongation of Life**. Heinemann, London.

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

_____. 1999. Disease control in shrimp aquaculture with probiotic bacteria, pp. 1-7. *In* Bell C.R., Brylinsky M. Johnson-Green P. (eds.) **Proceedings of the 8 th Interactional Symposium on Microbial Ecology** Atlantic Canada Society for Microbial Ecology. Halifax, Canada.

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

Persson, M., A.Vey and K. Soderhall. 1987. Encapsulation of foreign particles in vitro by seprated blood cells from crayfish, *Astacusleptodactylus* **. Cell. Tiss. Res**. 247: 409-415.

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.

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

Ratcliffe, 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.

Rengpipat, S., S. Rukpratanporn, S. Piyatirativarakul and P. Menasveta. 1998. Probiotic in aquaculture : A case study of probiotic for larvae of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*), pp.177-181. *In* T.W. Flegel, (ed). **Advance in Shrimp Biotechnology.** National Center for Genetic Engineering and Biotechnology., Bangkok.

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

Riquelme, C., R. Araya, N. Vergara, A. Rojas and M. Guaita and M. Candia. 1997. Potential probiotic strains in the culture of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarch, 1819). **Aquaculture.** 154: 17-26.

Salinas, I., A. Cuesta, M.A. Esteban and J. Meseguer. 2005. Dietary administration of *Lactobacillus delbrüeckii* and *Bacillus subtilis*, single or combined, on gilthead seabream cellular innate immune responses. **Fish & Shellfish Immunol.** 19: 67-77.

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 a 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. and K. Soderhall. 1986. Cellular immune mechanism in the crustacea. **Symposium of the Zoological Society of London.** 56: 59-79.

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

_____ 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 defenses. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 712: 155-161.

Sternshein, D.J. and P.R. Burton. 1980. Light and eletronmicroscropic studies of crayfish hemocytes. **J. Morphol.** 165: 67-83.

Stray, J.E., M.J. Klowden and R.E. Hurbert. 1988. Toxicity of *Bacillus sphaericus* crystal toxin to adult mosquitoes. **Appl. Environ. Microbiol.** 54 (9): 2320-2321.

Sugita, H., Y. Hirose, N. Matsuo, Y. Deguchi. 1998. Production of the antibacterial substance by *Bacillus* sp. Strain NM12, an intestinal bacterium of Japanese coastal fish. **Aquaculture.** 165: 269-280.

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

Supamattaya, K., J. Kasornchadra and S. Boonyaratpalin. 1994. Comparative study of simple methods for the diagnosis of yellow head baculovirus in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Songklanakarin J. Sci. Technol**. 16 (1): 37-48.

Thornqvist, P.O., K. Soderhall. 1997. Crustacean immune reactions, a shot review, pp. 203-218. *In* Flegel, T.W. and I.H. MacRae. (eds.), **Diseases in Asian Aquaculture III**. Manila: Asian Fisheries Society.

Tsing, A., J. M. Arcier and M. Brehelin. 1989. Hemocytes of penaeid and palaemonid shrimps: morphology, cytochemistry and haemograms. **J. Inver. Pathol**. 53: 64-77.

Verschuere, L., G. Rombaut, P. Sorgeloos, W. Verstraete. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. **Microbiol. Molec. Biol. Reviews**. 64: 655-671.

ภาคผนวก

ภาคผนวก

การเตรียมสปอร์ผงแห้ง

ขั้นตอนการแยกเชื้อจากลำไส้กุ้ง

1. นำลำไส้ของกุ้งกุลาดำมาบดด้วย Homogenizer แล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร

2. ทำการ Heat shock ที่อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที จากนั้นทำ Cool shock โดยนำมาผ่านน้ำเย็น นาน 1 นาที การทำ Heat shock และ Cool shock เพื่อทำให้สารละลายมีเพียงสปอร์แบคทีเรียเท่านั้น ซึ่งเป็นคุณสมบัติหนึ่งของเชื้อ *Bacillus* spp. ที่สารารถสร้างสปอร์ได้

3. นำสารละลายที่ได้มา 0.1 มิลลิลิตร เพื่อให้สปอร์ของแบคทีเรียเจริญเป็นเซลล์ปกติในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA โดยวิธีการ spread plate นำไปบ่มที่ 30°C นาน 18-24 ชั่วโมง

4. แยกเชื้อให้บริสุทธิ์เป็น single colony แล้วจึงนำไปทดสอบคุณสมบัติทางเคมีเพื่อจำแนกชนิดโดยใช้ โดยใช้ชุด API 50 CHB

ขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อและทำสปอร์ผงแห้ง

1. นำเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ในเครื่องเขย่าชนิดควบคุมที่ 30°C นาน 5-7 วัน หรือจนกว่าเชื้อจะเข้าสปอร์

2. นำเชื้อแบคทีเรียที่เข้าสปอร์แล้วมาปั่นตกตะกอนด้วย Centrifuge ที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm นาน 10 นาที

3. ปั่นล้างเซลล์สปอร์แบคทีเรียด้วยน้ำเกลือ 0.85% 3 ครั้ง

4. นำสปอร์ของแบคทีเรียมาผสมกับผง cray ที่อบฆ่าเชื้อแล้วในอัตราส่วน 1:1.5

5. นำ cray ที่ผสมด้วยเซลล์สปอร์แบคทีเรียแล้วไปอบให้แห้งที่ 70-80°C จนแห้ง แล้วจึงนำมาบดให้ละเอียด

6. นำสปอร์ผงแห้งไปอบที่ 70-80°C อีกครั้งนาน 10 นาที

7. เก็บสปอร์ผงแห้งในที่แห้งและเย็น

อาหารเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือด K-199

1. วิธีการเตรียมสารของอาหารเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือด K-199

1.1 M-199

อาหารเลี้ยงเซลล์ Medium-199 1 ซอง + $NaHCO_3$ 2.2 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรครบ 500 มิลลิลิตร

1.2 salt mixture ประกอบด้วย

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

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

1.3 NaCl

ละลาย NaCl 11 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

1.4 $CaCl_2.H_2O$

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

1.5 L-glutamin

L-glutamin 0.015 กรัม ในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร แล้วกรองผ่านกระดาษกรองขนาด

0.22 μm

2. <u>การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ K-199 จำนวน 100 มิลลิลิตร</u>

2.1 ผสมสารละลายตามลำดับ ดังนี้

- M-199 50 มิลลิลิตร
- salt mixture 10 มิลลิลิตร
- NaCl 10 มิลลิลิตร
- $CaCl_2.2H_2O$ 10 มิลลิลิตร
- L-glutamine 1 มิลลิลิตร
- Hepes 0.238 กรัม

ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

2.2 ปรับ pH ด้วย HCl หรือ NaOH ให้อยู่ในช่วง 7.3-7.6

2.3 เติม tri-Sodium Citate Dihydrate ($C_6H_5Na_3.2H_2O$) 10 กรัม

<u>สารเคมีในการวิเคราะห์ Prophenoloxidase activity</u>

<u>การเตรียมสารเคมีในการวิเคราะห์ Prophenoloxidase activity</u>

1. สารละลาย cacodylate buffer pH 7.4

ผสมสารละลาย 0.2 M Sodium cacodylate ปริมาณ 50 มิลลิลิตร สารละลาย 0.2 M HCl ปริมาณ 2.7 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 47.3 มิลลิลิตร

2. L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA)

L-dihydroxyphenylalanine 4 มิลลิกรัมในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร

3. สารละลายทริปซิน

เตรียมจาก 0.1% ทริปซินใน cacodylate buffer

<u>สารเคมีในการวิเคราะห์ Phagocytic index activity</u>

<u>การเตรียมสารเคมีในการวิเคราะห์ Phagocytic index activity</u>

1. สารละลาย Shrimp saline

- NaCl 28.4 กรัม
- $MgCl_2.6H_2O$ 10.0 กรัม
- $MgSO_4.7H_2O$ 2.0 กรัม
- $CaCl_2.H_2O$ 2.25 กรัม
- KCl 0.7 กรัม
- Glocose 1.0 กรัม
- Hepes 2.38 กรัม

ผสมในน้ำกลั่น 1 ลิตร กรองด้วยกระดาษกรอง 0.22 μm ใส่ในขวดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส

2. Heat – Killed yeast

2.1 นำ Baker's yeast 0.5 กรัม มาละลายใน 0.9% NaCl 250 มิลลิลิตร แล้วต้มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

2.2 หลังจากนั้นทำการล้างด้วย Shrimp saline ที่ 3000 rpm เป็นเวลา 10 นาที 5 ครั้ง

2.3 นำเซลล์ยีสต์ที่ได้ละลายด้วย Shrimp saline เพื่อให้ได้สารละลายที่มีเซลล์จำนวน 5×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

สารเคมีในการวิเคราะห์โปรตีน

การเตรียมสารเคมีในการวิเคราะห์โปรตีน

1. reagent a

   เตรียมจาก 2 % weight / Volumn Na_2CO_3 ละลายใน 0.1 M NaOH

2. reagent b

   เตรียมจาก 0.5% $CuSO_4$ ละลายใน 1% Potassium tatrate

3. reagent c

   เตรียมจาก reagent a 50 มิลลิลิตร รวมกับ reagent b 1 มิลลิลิตร

4. reagent d

   เตรียมจาก Folin 1 ส่วน ผสมกับน้ำ 2 ส่วน

การคำนวณปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมด (Total Haemocytes Count)

ปริมาตรของ Hemacytometer = กว้าง x ยาว x สูง

= 1 mm x 1mm x 0.1mm

= 0.1 mm^3

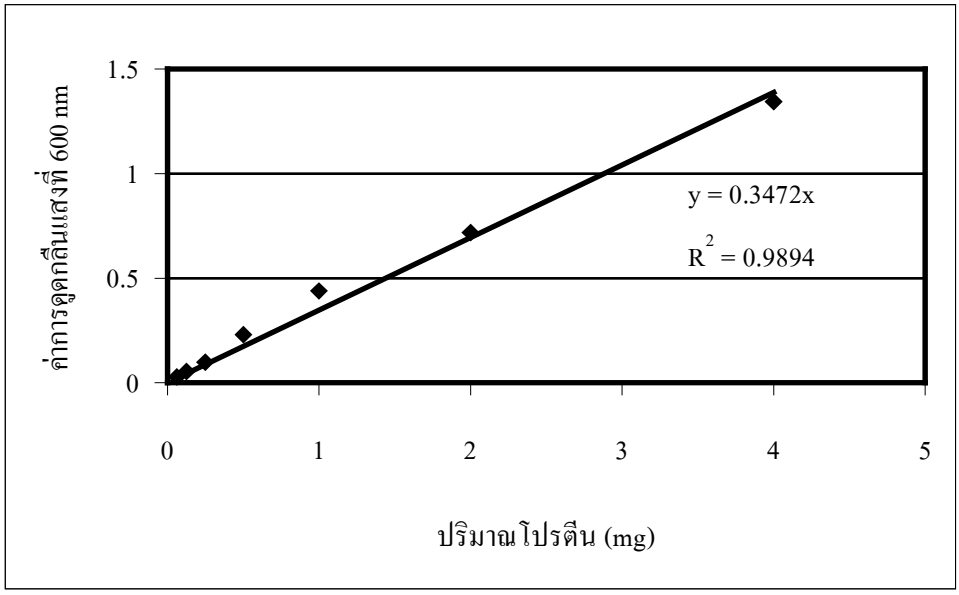
จำนวนเซลล์เม็ดเลือด / mm^3 = เซลล์เม็ดเลือดที่นับได้

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

<u>การคำนวณหน่วยของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส</u>

Phenoloxidase acticity = unit/min/mg protein

กำหนดให้ ค่า OD ที่เปลี่ยนแปลงไป 0.001 เท่ากับ 1 หน่วย (unit)



<u>ภาพผนวกที่ 1</u> มาตรฐานโปรตีน (Bovine serum albumin)

<u>การคำนวณ Percent phagocytosis และ Phagocytic index</u>

$$\text{Percent phagocytosis} = \frac{\text{จำนวนเม็ดเลือดที่จับกินยีสต์ x 100}}{\text{จำนวนเม็ดเลือดทั้งหมด}}$$

$$\text{Phagocytic index} = \frac{\text{จำนวนเม็ดเลือดที่จับกินยีสต์}}{\text{จำนวนเม็ดเลือดทั้งหมด}} \times \frac{\text{จำนวนยีสต์ที่ถูกจับกินทั้งหมด}}{\text{จำนวนเม็ดเลือดทั้งหมด}} \times 100$$