

การเสริมภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* ด้วย *Bacillus* สายพันธุ์ S11



นายสมบัติ รักประทานพร

วิทยานิพนธ์เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2542

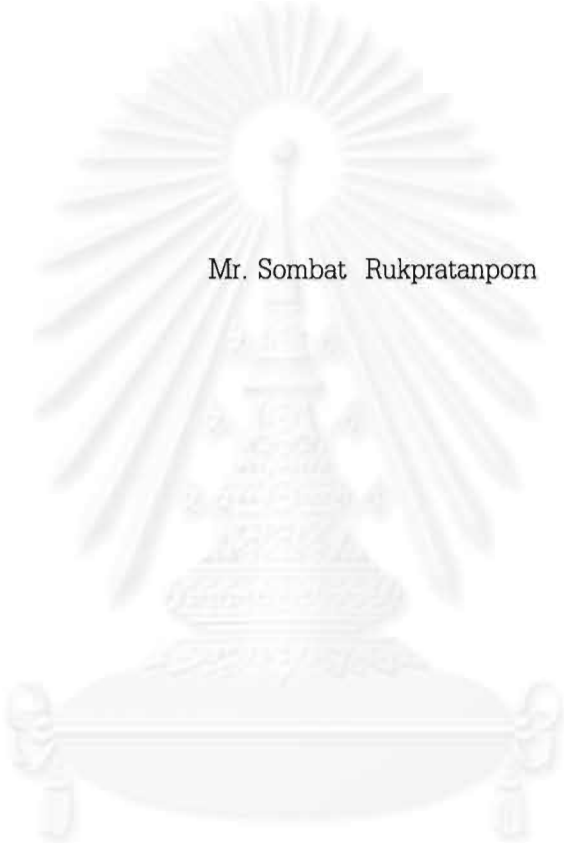
ISBN 974-333-018-6

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

17 ก.ค. 2545

๕ 19423172

IMMUNOENHANCEMENT IN BLACK TIGER SHRIMP *Penaeus monodon*  
BY *Bacillus* STRAIN S11



Mr. Sombat Rukpratanporn

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Graduate School

Chulalongkorn University

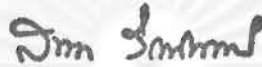
Academic Year 1999

ISBN 974-333-018-6

หัวข้อวิทยานิพนธ์                    การเสริมภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* ด้วย  
   *Bacillus* สายพันธุ์ S11  
โดย    นายสมบัติ รักประทานพร  
ภาควิชา                                    จุลชีววิทยา  
อาจารย์ที่ปรึกษา                        รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์

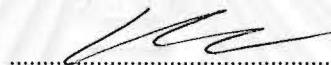
---

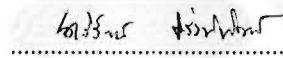
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้วิทยานิพนธ์แบบนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา  
หลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต




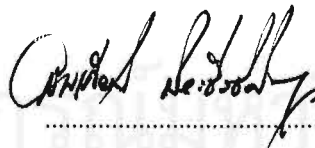
.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย  
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุชาดา กิระนันท์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

  
.....ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล)

  
.....อาจารย์ที่ปรึกษา  
(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

  
.....กรรมการ  
(ศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเสวต)

  
.....กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. สมเกียรติ ปิยะฉัตรจิตวิบูล)

สมบัติ รักประทานพร : การเสริมภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* ด้วย *Bacillus* สายพันธุ์ S11 (IMMUNOENHANCEMENT IN BLACK TIGER SHRIMP *Penaeus monodon* BY *Bacillus* STRAIN S11) อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์, 113 หน้า. ISBN 974-333-018-6.

*Bacillus* สายพันธุ์ S11 แสดงสมบัติเป็นโพรไบโอติกต่อการเจริญเติบโตและการเสริมภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์ และสารน้ำในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* การเลี้ยงกุ้งกุลาดำในบ่อที่มีระบบหมุนเวียนน้ำแบบปิดเป็นเวลา 90 วัน พบน้ำหนักตัว และการรอดชีวิตของกุ้งกุลาดำสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเสริมโพรไบโอติกให้กุ้งระยะ postlarvae แต่ไม่มีผลเพิ่มน้ำหนัก และการรอดชีวิตในกุ้งระยะวัยรุ่น *Bacillus* สายพันธุ์ S11 มีผลกระตุ้นประสิทธิภาพการกลืนทำลายสิ่งแปลกปลอมโดยวิธีฟาโกไซโตซิส ได้แก่ เพอร์เซ็นต์ฟาโกไซโตซิส และฟาโกไซติก อินดิเคซ์ และเพิ่มปริมาณฟีนอลออกซิเดสในเม็ดเลือดกุ้งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 เป็นเวลา 10 วัน กุ้งกลุ่มที่ได้รับ *Bacillus* สายพันธุ์ S11 เสริมในอาหาร มีเปอร์เซ็นต์การตายสะสม (45.7%) ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับโพรไบโอติก (64.5%) และพบเปอร์เซ็นต์ฟาโกไซโตซิส, ฟาโกไซติก อินดิเคซ์ และจำนวนเม็ดโลหิตที่ถูกกินต่อเซลล์ถูกชักนำให้สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) การเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 มีผลกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งทั้งสองกลุ่มการทดลอง คือ จำนวนเม็ดเลือดรวมของกุ้งจะลดลง ส่วนเปอร์เซ็นต์ฟาโกไซโตซิส, ฟาโกไซติก อินดิเคซ์ และฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจะสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา ..... จุลชีววิทยา .....  
สาขาวิชา ..... จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม .....  
ปีการศึกษา ..... 2542 .....

ลายมือชื่อนิสิต ..... สมบัติ รักประทานพร .....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ..... ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ .....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ..... - .....

# # 3971961423 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD: IMMUNOENHANCEMENT/*Penaeus monodon*/PROBIOTICS/*Bacillus* STRAIN S11

SOMBAT RUKPRATANPORN : IMMUNOENHANCEMENT IN BLACK TIGER SHRIMP

*Penaeus monodon* BY *Bacillus* STRAIN S11. THESIS ADVISOR : ASSO. PROF.

SIRIRAT RENGPIPAT, Ph.D., 113 pp. ISBN 974-333-018-6.

Effect of probiotic *Bacillus* strain S11 on the growth and immunoenhancement either by cellular or humoral defenses in *Penaeus monodon* were shown after feeding black tiger shrimp in closed-recirculating pond for 90 days. Shrimp weight and their survival in postlarvae shrimp but not in juvenile ones were significantly higher ( $p < 0.05$ ) than those of control group. *Bacillus* strain S11 could also efficiently activate and increase the engulfment of foreign particles (phagocytosis) as shown by the significant increase of %phagocytosis, phagocytic index and phenoloxidase at the level of  $p < 0.05$ . When performing for the challenge test by *Vibrio harveyi* strain 1526 for 10 days, accumulation of mortality (45.7%) was lower in shrimp fed probiotic supplement as compared to a control one (64.5%). Furthermore %phagocytosis, phagocytic index and average number of the beads ingested per cell of probiotic treated shrimp were significantly higher ( $p < 0.05$ ). The effect from the challenge test by *Vibrio harveyi* strain 1526 on immune activation in both probiotic and control groups was observed and found that their total hemocytes decreased but %phagocytosis, phagocytic index and antibacterial activity increased significantly ( $p < 0.05$ ).



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา.....จุลชีววิทยา.....

สาขาวิชา.....จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม.....

ปีการศึกษา.....2542.....

ลายมือชื่อนิติ.....สมพงษ์ วัชรประทีป.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....ศิริพร ดงษ์พันธ์.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....—.....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการเมธีวิจัยอาวุโส สกว. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต ในโครงการเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล เพื่อการพัฒนาที่ยั่งยืน : การปรับปรุงกระบวนการผลิตพันธุ์กุ้งที่มีคุณภาพ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ลงได้โดยได้รับความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒนา ที่ได้ให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็น และช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร. นลินี นิลอุบล ศ.ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต รศ.ดร. สมเกียรติ ปิยะธีรธิตวิตรกุล ที่กรุณาเป็นคณะกรรมการในการสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณภาคีวิชาการชีววิทยา ที่ได้กรุณาเอื้อเฟื้อสถานที่ และ เครื่องมือในการทำงานวิจัย ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาคีวิชาการชีววิทยา รวมทั้งเพื่อนๆ และ น้องๆ ที่ได้มีส่วนช่วยเหลือให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณหน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเลที่ได้กรุณาเอื้อเฟื้อสถานที่ทำงานวิจัย ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ของหน่วยปฏิบัติการฯ รวมทั้งเพื่อน พี่ และน้อง ที่ได้มีส่วนช่วยเหลือให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณโครงการเมธีวิจัยอาวุโส สกว. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต ที่ให้ทุนอุดหนุนงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ที่ให้ทุนอุดหนุนการศึกษาและการวิจัยครั้งนี้

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และพี่ ที่ได้ให้กำลังใจช่วยเหลือ สนับสนุน ตั้งแต่เริ่มต้นจนเสร็จสมบูรณ์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ซ
สารบัญรูป.....	ฅ
สัญลักษณ์และคำย่อ.....	ญ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. วารสารปริทัศน์.....	3
3. อุปกรณ์และวิธีการทดลอง.....	28
4. ผลการทดลอง.....	38
5. อภิปรายผลการทดลอง.....	62
6. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	69
รายการอ้างอิง.....	71
ภาคผนวก ก.....	79
ภาคผนวก ข.....	83
ภาคผนวก ค.....	86
ภาคผนวก ง.....	87
ภาคผนวก จ.....	88
ภาคผนวก ฉ.....	89
ภาคผนวก ช.....	90
ประวัติผู้เขียน.....	113

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก.....	8
2. การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ.....	11
3. หน้าที่ของเม็ดเลือดในครัสเตเชียน.....	15
4. ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในครัสเตเชียน.....	22
5. จำนวน <i>Bacillus</i> สายพันธุ์ S11 ในอาหารกึ่งระหว่างการเก็บที่ 4 °ซ เป็นเวลา 90 วัน.....	39
6. คุณภาพน้ำระหว่างการเลี้ยงกุ้งกุลาดำครั้งที่ 1 เป็นระยะเวลา 90 วัน.....	39
7. จำนวนเม็ดเลือดรวมในน้ำเลือดกุ้งกุลาดำกลุ่มควบคุมเทียบกับกลุ่มโพรไบโอติกระหว่างการเลี้ยง กุ้งกุลาดำครั้งที่ 1.....	46
8. ประสิทธิภาพการกินทำลายสิ่งแปลกปลอมโดยวิธีฟาโกไซโตซิสของเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำกลุ่ม ควบคุมเทียบกับกลุ่มโพรไบโอติกระหว่างการเลี้ยงกุ้งกุลาดำครั้งที่ 1.....	46
9. ปริมาณฟีนอลออกซิเดสในเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำกลุ่มควบคุมเทียบกับกลุ่มโพรไบโอติกระหว่าง การเลี้ยงกุ้งกุลาดำครั้งที่ 1.....	47
10. ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย <i>V. harveyi</i> สายพันธุ์ D331 ในพลาสมากุ้งกุลาดำกลุ่มควบคุมเทียบกับ กลุ่มโพรไบโอติกระหว่างการเลี้ยงกุ้งกุลาดำครั้งที่ 1.....	47
11. จำนวนกุ้งกุลาดำที่ตายหลังใส่ <i>V. harveyi</i> สายพันธุ์ 1526 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ในน้ำ เลี้ยงกุ้งเป็นเวลา 96 ชม.....	49
12. คุณภาพน้ำระหว่างการเลี้ยงกุ้งกุลาดำครั้งที่ 2. เป็นระยะเวลา 90 วัน.....	52
13. ปัจจัยทางภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำกลุ่มควบคุม และกลุ่มโพรไบโอติก หลังการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ครั้งที่ 2. เป็นเวลา 90 วัน.....	55
14. ลักษณะรูปร่างและชีวเคมีของ <i>V. harveyi</i> สายพันธุ์ 1526.....	60
15. ปัจจัยทางภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำกลุ่มควบคุม และกลุ่มโพรไบโอติก หลังการเหนี่ยวนำให้ เกิดโรคด้วย <i>V. harveyi</i> สายพันธุ์ 1526 เป็นเวลา 10 วัน.....	61
16. ปัจจัยทางภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ ก่อนและหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย <i>V. harveyi</i> สายพันธุ์ 1526 เป็นเวลา 10 วัน.....	61
17. สรุปผลการกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งสกุลที่เหนี่ยวนำด้วยองค์ประกอบเซลล์หรือเซลล์ของ แบคทีเรียแกรมบวกในตัวสัตว์ทดลอง ( <i>in vivo</i> ) .....	68



สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1. ความสัมพันธ์ ระหว่างกุ้งกุลาดำ สิ่งแวดล้อมในบ่อเลี้ยงกุ้ง และเชื้อโรครวมทั้งวิธีการที่ใช้ในการจัดการของแต่ละปีจจัย.....	6
2. อวัยวะภายในของกุ้งสกุลพืเเนยส.....	14
3. เม็ดเลือดของครัสเตเชียน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ลำแสงปกติ และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน.....	14
4. น้ำหนักตัว และการรอดชีวิตของกุ้งกุลาดำกลุ่มโพรไบโอติก และกลุ่มควบคุมระหว่างการเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 1.....	40
5. จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด <i>Bacillus</i> สายพันธุ์ S11 และ <i>Vibrio</i> spp. ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำระหว่างการเลี้ยงกุ้ง ครั้งที่ 1.....	41
6. จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด <i>Bacillus</i> สายพันธุ์ S11 และ <i>Vibrio</i> spp. ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำระหว่างการเลี้ยงกุ้ง ครั้งที่ 1.....	42
7. จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด <i>Bacillus</i> สายพันธุ์ S11 และ <i>Vibrio</i> spp. ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำระหว่างการเลี้ยงกุ้ง ครั้งที่ 1.....	43
8. เซลล์เม็ดเลือดกุ้งกุลาดำที่เกิดฟาโกไซโตซิส .....	45
9. ค่า LC <sub>50</sub> ของ <i>V. harveyi</i> สายพันธุ์ 1526 ที่ทำให้กุ้งกุลาดำตายที่เวลาต่างๆ.....	49
10. น้ำหนักตัว และการรอดชีวิตของกุ้งกุลาดำกลุ่มโพรไบโอติก และกลุ่มควบคุมระหว่างการเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 2.....	51
11. จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด <i>Bacillus</i> สายพันธุ์ S11 และ <i>Vibrio</i> spp. ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำระหว่างการเลี้ยงกุ้ง ครั้งที่ 2.....	53
12. จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด <i>Bacillus</i> สายพันธุ์ S11 และ <i>Vibrio</i> spp. ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำระหว่างการเลี้ยงกุ้ง ครั้งที่ 2.....	54
13. การตายสะสม (cumulative mortality) ของกุ้งกุลาดำ ระหว่างการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย <i>V. harveyi</i> สายพันธุ์ 1526 เป็นเวลา 10 วัน.....	57
14. จำนวน <i>V. harveyi</i> สายพันธุ์ 1526 และ <i>Bacillus</i> สายพันธุ์ S11 ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ระหว่างการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย <i>V. harveyi</i> สายพันธุ์ 1526 เป็นเวลา 10 วัน.....	58
15. จำนวน <i>V. harveyi</i> สายพันธุ์ 1526 และ <i>Bacillus</i> สายพันธุ์ S11 ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ระหว่างการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย <i>V. harveyi</i> สายพันธุ์ 1526 เป็นเวลา 10 วัน.....	59

## สัญลักษณ์และคำย่อ

กก.	=	กิโลกรัม
ชม.	=	ชั่วโมง
มก.	=	มิลลิกรัม
มล.	=	มิลลิลิตร
°ซ	=	องศาเซลเซียส
CFU/g	=	โคโลนีต่อกรัม
CFU/ml	=	โคโลนีต่อมิลลิลิตร
nm	=	นาโนเมตร
$\mu\text{m}$	=	ไมโครเมตร
w/v	=	น้ำหนักต่อปริมาตร





กุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* เป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่มีความสำคัญที่สุดประเภทหนึ่งของประเทศไทย ด้วยเหตุที่เนื้อนุ่มอร่อย เป็นที่นิยมของตลาดต่างประเทศโดยเฉพาะในญี่ปุ่นและอเมริกา เป็นสินค้าเกษตรที่มีมูลค่าส่งออกสูงสุดของประเทศไทย โดยในปี พ.ศ. 2541 มีปริมาณส่งออก 156,176 เมตริกตัน คิดเป็นมูลค่าส่งออกประมาณ 58,353.32 ล้านบาท (กรมเศรษฐกิจการพาณิชย์, 2542)

ปัจจุบันกุ้งกุลาดำยังคงเป็นที่นิยมเลี้ยงสูงที่สุดในกลุ่มกุ้งที่มีจำหน่ายทั่วโลก คือ ประมาณ 52% ในปี 2541 (ทีมงานข่าวกุ้ง, 2542) ปัญหาในการเลี้ยงกุ้ง ได้แก่ คุณภาพลูกกุ้งวัยอ่อนและโรคติดเชื้อในการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ โดยเฉพาะโรควิบริโอซิส (Vibriosis) ซึ่งเกิดจากแบคทีเรียสกุล *Vibrio* เช่น *V. harveyi*, *V. vulnificus* เป็นต้น ซึ่งเป็นอุปสรรคที่สำคัญในการเลี้ยงกุ้งให้ประสบผลสำเร็จ

การใช้สารปฏิชีวนะเพื่อป้องกันหรือรักษาโรคกุ้ง ผู้เลี้ยงกุ้งส่วนใหญ่จะใช้ในอัตราสูง เกินความจำเป็น และใช้ในระยะเวลาที่ไม่เหมาะสม (คมสัน ลีลาศหกิจ, 2539) นอกจากจะเสียค่าใช้จ่ายสูงแล้วยังเกิดสารตกค้างในกุ้งเมื่อจับจำหน่าย และเกิดอุบัติการณ์เชื้อก่อโรคเกิดการดื้อยาสูงขึ้นเรื่อยๆ มีผลทำให้เกิดการรักษายากขึ้น (Flegel และคณะ, 1992) ประกอบกับญี่ปุ่นที่เป็นประเทศนำเข้ากุ้งรายใหญ่ของประเทศไทยมีกฎหมายต่อต้านการใช้สารเคมีและสารปฏิชีวนะในอาหาร (คมสัน ลีลาศหกิจ, 2539) การนำจุลินทรีย์โพรไบโอติก (probiotics) เสริมสร้างให้กุ้งแข็งแรง จึงเป็นทางเลือกใหม่ในการลดการใช้สารปฏิชีวนะ

จุลินทรีย์โพรไบโอติกไม่เป็นอันตรายต่อคน และสัตว์ ช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรคโดยเฉพาะบริเวณทางเดินอาหาร ช่วยควบคุมชนิดและปริมาณจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารให้อยู่ในสภาพที่สมดุล โพรไบโอติกมีการใช้กันอย่างแพร่หลาย ใช้ได้ผลทั้งในมนุษย์ (Holzapfel และคณะ, 1998) และสัตว์บก เช่น สุนัข, วัว, แพะ และ ไก่ (Fox, 1988 ; Fuller, 1992) ซึ่งให้ผลการเพิ่มน้ำหนักและกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรคได้ดี (Fuller, 1992)

การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีการใช้โพรไบโอติกไม่แพร่หลายนัก โดยเริ่มมีการใช้โพรไบโอติก ภายใน 10 ปีที่ผ่านมา วัตถุประสงค์การนำมาใช้เพื่อลดการใช้สารปฏิชีวนะ ระยะแรกเริ่มมีการศึกษาในปลาซัลมอนโดยนำสาหร่าย *Tetraselmis suecica* (Austin และคณะ, 1992) และ *Vibrio alginolyticus* (Austin และคณะ, 1995) ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก ผสมในอาหารที่ใช้เลี้ยงปลาซัลมอน พบว่าปลาซัลมอนมีน้ำหนักเพิ่มขึ้น และอัตราการตายลดลง เมื่อเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วยเชื้อก่อโรค *Aeromonas salmonicida*

วรรณิกา เพ็ญนัทธ์ (2539) ศึกษาการใช้โพรไบโอติกเสริมในอาหารกุ้งกุลาดำเป็นครั้งแรกโดยใช้ *Bacillus* สายพันธุ์ S11 ที่แยกได้จากลำไส้กุ้งกุลาดำที่มีสุขภาพดี และมีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก ผสมในอาหารกุ้ง และเลี้ยงกุ้งเป็นเวลา 100 วัน พบว่า กุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารที่ผสม *Bacillus* สายพันธุ์ S11 จะมีการเจริญเติบโต อัตราการรอด และความต้านทานต่อโรคสูงกว่ากุ้งกุลาดำที่ไม่ได้รับอาหารที่ผสม *Bacillus* สายพันธุ์ S11 อย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) แสดงว่า จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกนอกจากจะเร่งการเจริญเติบโต ยังอาจทำหน้าที่เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำสอดคล้องกับการพบการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของโพรไบโอติกในสัตว์บก (Havenaar และ Spanhaak, 1994; Perdigon และคณะ, 1995)

สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันมีผลในการป้องกันโรคติดเชื้อในกุ้งกุลาดำ โดยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน 2 ระบบ คือ

1. ภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์ (cellular defenses) ประกอบด้วย การแข็งตัวของเลือด (hemolymph clotting), กระบวนการกลืนทำลาย (phagocytosis), การสร้างโนดูล (nodule formation), การห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอม (encapsulation) และ ระบบโพรฟีนอลออกซิเดส (prophenoloxidase system)

2. ภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยสารน้ำ (humoral defenses) ประกอบด้วย ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (antibacterial activity), แอคกลูตินิน (agglutinin), สารคล้ายไซโตไคน์ (cytokine-like factor), โมดูเลเตอร์ (modulators) และ สารที่เกี่ยวข้องกับการแข็งตัวของเลือด (clotting factors)

### วัตถุประสงค์ที่สำคัญของงานวิจัย

1. ศึกษาผลของ *Bacillus* สายพันธุ์ S11 ต่อการเจริญเติบโต การเสริมภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์ ได้แก่ จำนวนเม็ดเลือดรวม ฟาโกไซโตซิส ระบบโพรฟีนอลออกซิเดส และการเสริมภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยสารน้ำ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ในกุ้งกุลาดำ
2. เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ
3. พัฒนาการใช้จุลินทรีย์เป็นสารเสริมความต้านทานโรค

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 2

### วารสารปริทัศน์

#### ชีววิทยาของกุ้งกุลาดำ

กุ้งกุลาดำ หรือ กุ้งทะเล หรือ กุ้งม้าลาย เป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง จัดอยู่ในชั้นครัสเตเชีย (Class Crustacea) เป็นกุ้งทะเลที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในวงศ์ Penaeidae มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Penaeus monodon* Fabricius และมีชื่อภาษาอังกฤษคือ Giant black tiger prawn หรือ Tiger prawn หรือ Jumbo tiger prawn (วัลลภ คงเพิ่มพูน, 2534)

#### ลักษณะภายนอก

ลำตัวเป็นสีม่วงแดง มีแถบสีน้ำตาลหรือดำพาดขวางลำตัวเป็นปล้องๆ โคนขาว่ายน้ำมีแถบสีเหลือง เปลือกหัวเกลี้ยงไม่มีขน หนวดมีสีดำไม่มีลาย ฟันกรีด้านบนมี 7-8 ซี่ ด้านล่างมี 3 ซี่ ร่องข้างกรีดทั้งสองด้านมีลักษณะแคบ และยาวไม่ถึงฟันกรีดสุดท้าย ที่ขาเดินคู่ที่ 5 ไม่มีระยางค์อันนอก (วัลลภ คงเพิ่มพูน, 2534)

#### วงจรชีวิต

กุ้งกุลาดำมีอายุขัยประมาณ 18-24 เดือน โดยจะวางไข่ที่ระดับน้ำลึกประมาณ 30-40 เมตร ใกล้กับพื้นท้องทะเล ไข่จะเกิดการปฏิสนธิในน้ำโดยการพัดโบกไปมาของขาว่ายน้ำ ไข่ที่ผสมแล้วจะฟักออกเป็นลูกกุ้งวัยอ่อน และเคลื่อนเข้าสู่บริเวณชายฝั่ง พร้อมทั้งเปลี่ยนแปลงรูปร่าง โดยวิธีลอกคราบ (นันทริกา ชันช้อย, 2540) เป็นลูกกุ้งวัยอ่อนระยะต่าง ๆ ดังนี้ ลูกกุ้งวัยอ่อนระยะแรก จะฟักออกจากไข่ ภายในเวลา 14-15 ชั่วโมง เรียกว่าวัยอ่อนระยะแรกว่า นอเพลียส (Nauplius) มี 6 ระยะ ผ่านการลอกคราบ 5 ครั้ง เป็นเวลา 48-56 ชั่วโมง เปลี่ยนแปลงรูปร่างเข้าสู่ลูกกุ้งวัยอ่อนระยะที่ 2 เรียกว่า ระยะโซเอีย (Zoea) มีการลอกคราบ 3 ครั้ง ภายในเวลา 4-5 วัน จะพัฒนารูปร่างเข้าสู่ลูกกุ้งวัยอ่อนระยะที่ 3 เรียกว่า ระยะไมซิส (Mysis) มีการลอกคราบ 3 ครั้ง เป็นเวลา 4-5 วัน จึงเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นลูกกุ้งวัยอ่อนระยะสุดท้าย เรียกว่า ระยะโพสลาวา (Postlarvae) หรือระยะกุ้งคว่ำ มีลักษณะเหมือนกุ้งตัวเต็มวัย นับตั้งแต่เป็นลูกกุ้งวัยอ่อนระยะโพสลาวาวันแรกใช้เวลาประมาณ 3-4 เดือน จึงจะเติบโตเป็นกุ้งวัยรุ่น (Juvenile) และมีการพัฒนาเฉพาะเรื่องของขนาดเท่านั้น ส่วนรูปร่างต่างๆ เหมือนเดิม (ประจวบ หล้าอุบล, 2533) เมื่อพัฒนาเป็นกุ้งโตเต็มวัย (Adult) จึงเดินทางสู่ทะเลลึกเพื่อผสมพันธุ์ต่อไป และกลับมาวางไข่ เป็นวงจรชีวิตเช่นนี้ตลอดไปจนกว่าจะหมดอายุขัย

## ลักษณะนิสัย

กุ้งกุลาดำ เป็นกุ้งที่มีการเจริญเติบโตรวดเร็ว ในธรรมชาติชอบอาศัยอยู่ในบริเวณน้ำลึกเขตร้อนที่มีท้องทะเลเป็นโคลนปนทราย สามารถทนอยู่ในน้ำทะเลที่มีอุณหภูมิสูง และความเค็มต่ำ เช่น บริเวณป่าชายเลน ชอบหมกตัวและอยู่ตามหน้าพื้นทะเล หากินตามพื้นทะเล กินอาหารจำพวกพืช และสัตว์ทั้งที่ตายแล้ว และยังมีชีวิตอยู่ กินอาหารได้ทุกเวลา กุ้งกุลาดำสามารถนำมาเพาะเลี้ยงได้ดีในบ่อทุกสภาพ มีความอดทนสูง ปรับตัวให้เข้ากับการเปลี่ยนแปลงของสภาพของน้ำในบ่อได้เร็ว (วัลลภ คงเพิ่มพูน, 2534) ทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงของความเค็มในช่วงกว้าง ถ้าความเค็มเปลี่ยนแปลงอย่างช้าๆ สามารถปรับตัวอยู่ที่ความเค็มเกือบศูนย์ หรือความเค็มที่เพิ่มขึ้นจนถึง 45 ส่วนในพันส่วน เป็นเวลานานพอสมควร (ชลอ ลี้มสุวรรณ, 2535)

## สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ (วัลลภ คงเพิ่มพูน, 2534)

1. อุณหภูมิน้ำ 25-30 องศาเซลเซียส
2. ความเค็มของน้ำ 15-30 ส่วนในพันส่วน
3. ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำไม่น้อยกว่า 3-5 ส่วนในล้านส่วน (มิลลิกรัมต่อลิตร)
4. พีเอชของน้ำ 7.5-8.5
5. แอมโมเนีย ไม่ควรเกิน 0.1 ส่วนในล้านส่วน
6. ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ ไม่ควรเกิน 0.033 ส่วนในล้านส่วน (ชลอ ลี้มสุวรรณ, 2535)
7. ธาตุอาหารในน้ำ ได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และ ซิลิกา ไม่ควรมีมากเกินไป
8. ปราศจากสารพิษต่างๆในน้ำ ได้แก่ ยาปราบวัชพืช ยาฆ่าแมลง และโลหะหนัก จำพวกปรอท ทองแดง สังกะสี แคดเมียม และ อื่นๆ
9. ความขุ่นใสของน้ำ ไม่ควรเกิน 25 ส่วนในล้านส่วน
10. สภาพพื้นบ่อไม่ควรเน่าเสีย ป้องกันโดยการดูแลควบคุมอาหารที่ให้และควบคุมปริมาณของแพลงก์ตอนพืชในบ่อ

## โรคกุ้งกุลาดำในประเทศไทย (Flegel และคณะ, 1992)

### 1. สาเหตุเกิดจากแบคทีเรีย

โรคติดเชื้อแบคทีเรียเป็นสาเหตุการตายของกุ้งที่สำคัญและพบอุบัติการณ์เชื้อก่อโรคเกิดการดื้อยาสูงขึ้นเรื่อยๆ

ไวรัสโอซิส (Vibriosis) เป็นโรคติดเชื้อแบคทีเรียในกุ้งที่เกิดจากแบคทีเรียสกุล *Vibrio* ได้แก่

- *V. harveyi* (สาเหตุโรคเรืองแสง)
- *V. parahaemolyticus*

- *V. vulnificus* (สาเหตุโรคเสี้ยนดำ)

- *V. splendidus*

นอกจาก *Vibrio* sp. แล้วอาจเกิดจาก *Aeromonas* sp. ได้แต่เล็กน้อย

## 2. สาเหตุเกิดจากไวรัส

โรคติดเชื้อไวรัสเป็นโรคที่สำคัญและก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก ไวรัสที่ก่อโรคกึ่งในประเทศไทยได้แก่

*Penaeus monodon* baculovirus (MBV)

Lymphoid organ virus

Infectious Hematopoietic and Hypodermal Necrosis virus (IHNV)

Hepatopancreatic Parvo-like virus (HPV)

Yellow head virus (YHV)

Systemic Ectodermal and Mesodermal Baculovirus (SEMBV)

## 3. สาเหตุเกิดจากเชื้อรา

โรคติดเชื้อรามักจะเป็นโรคฉวยโอกาสไม่ค่อยก่อความเสียหายทางเศรษฐกิจมากนัก เชื้อราที่ก่อโรคกึ่งได้แก่

*Lagenidium* sp.

*Fusarium* sp.

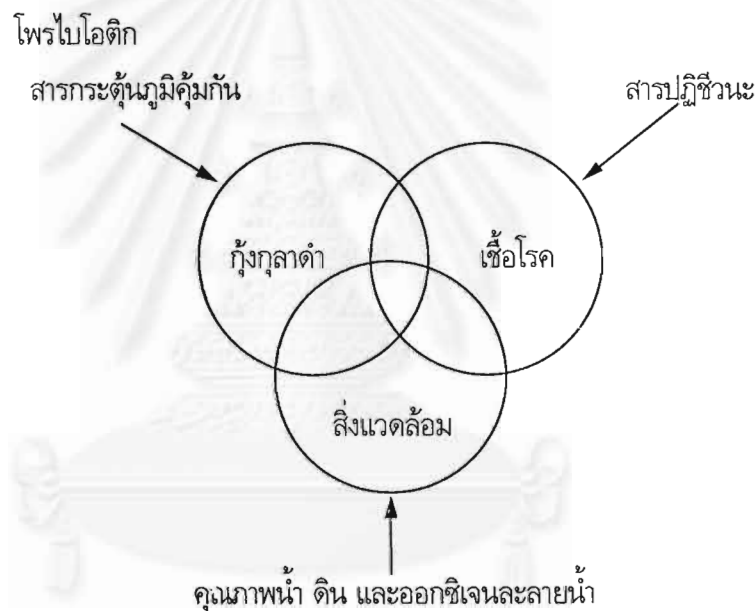
## 4. สาเหตุเกิดจากพยาธิ

พยาธิภายนอก ได้แก่ *Zoothamnium* sp., *Epistylis* sp., *Vorticella* sp., *Acineta* sp.

พยาธิภายใน ได้แก่ *Agmasoma penaei* (microsporidian)

## ความสัมพันธ์ระหว่างกิ้ง สิ่งแวดล้อมในบ่อเลี้ยงกิ้ง และการเกิดโรคติดเชื้อ

ความสัมพันธ์ระหว่างกิ้ง สิ่งแวดล้อม และเชื้อโรค เป็นดังรูปที่ 1. ถ้ามีการจัดการคุณภาพน้ำ คุณภาพดิน และออกซิเจนละลายน้ำที่เหมาะสม และไม่มีเชื้อก่อโรครกในปริมาณสูง จะทำให้กิ้งมีการเจริญเติบโต และสุขภาพแข็งแรง ในทางตรงกันข้าม ถ้าการจัดการสิ่งแวดล้อมไม่ดี ประกอบกับมีเชื้อก่อโรคในปริมาณสูง กิ้งก็จะมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคสูงและตายไปในที่สุด วิธีการที่สามารถจะนำไปใช้ในการจัดการแต่ละปัจจัย ได้แก่ การใช้โพรไบโอติก (probiotics) หรือสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันเพื่อทำให้กิ้งแข็งแรง การจัดการคุณภาพน้ำ ดิน และค่าออกซิเจนละลายน้ำให้เหมาะสมกับการเลี้ยงกิ้ง สำหรับการรักษาโรคติดเชื้อ ก็อาจยังมีความจำเป็นในการใช้สารปฏิชีวนะในปริมาณพอเหมาะแบบไม่เกินความจำเป็น เพื่อลดปัญหาการดื้อยาหรือมลภาวะที่เกิดบนผิวดิน ที่สามารถส่งผลต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ตลอดจนสิ่งมีชีวิตบนหน้าดิน และในน้ำได้ (ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์, 2539)



รูปที่ 1. ความสัมพันธ์ระหว่างกิ้งกุลาดำ สิ่งแวดล้อมในบ่อเลี้ยงกิ้ง และเชื้อโรค รวมทั้งวิธีการที่ใช้ในการจัดการของแต่ละปัจจัย (ที่มา : ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์, 2539 ; Snieszko, 1973 อ้างถึงใน Lightner และ Redman, 1998)

การใช้สารปฏิชีวนะเพื่อป้องกันหรือรักษาโรครก ผู้เลี้ยงกิ้งส่วนใหญ่จะใช้ในอัตราสูง เกินความจำเป็น และใช้ในระยะเวลาที่ไม่เหมาะสม นอกจากจะเสียค่าใช้จ่ายสูงแล้วยังเกิดสารตกค้างในกิ้งเมื่อจับจำหน่าย (คมสัน ลีลาศหกิจ, 2539) และเกิดอุบัติการณ์เชื้อก่อโรคเกิดการดื้อยาสูงขึ้นเรื่อยๆมีผลทำให้เกิดการรักษายากขึ้น (Flegel และคณะ, 1992) ประกอบกับญี่ปุ่นที่เป็นประเทศนำเข้ากิ้งรายใหญ่ของประเทศไทยมีกฎหมายต่อต้านการใช้สารเคมี และสารปฏิชีวนะในอาหาร (คมสัน ลีลาศหกิจ, 2539) การนำจุลินทรีย์โพรไบโอติกเสริมสร้างให้กิ้งแข็งแรง จึงเป็นทางเลือกใหม่ในการลดการใช้สารปฏิชีวนะ



## โพรไบโอติก (Probiotics)

โพรไบโอติก (Probiotics) มาจากภาษากรีก แปลว่า “ เพื่อชีวิต ” (for life) (Fuller, 1992) Metchnikoff (1907) ถือว่าเป็นผู้ให้กำเนิดโพรไบโอติก มีผลงานตีพิมพ์ในหนังสือ The Prolongation of Life (อ้างถึงใน Fuller, 1992) หลังจากนั้นคำว่า โพรไบโอติก ถูกนำไปใช้ในหลายๆ ทางด้วยกัน และมีผู้ให้คำจำกัดความต่างๆ กัน คือ

Lilly และ Stillwell (1965) หมายถึง “สารที่สร้างโดยจุลินทรีย์ชนิดหนึ่ง และมีผลกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่ง”

Parker(1974) หมายถึง “จุลินทรีย์และสารที่ช่วยปรับความสมดุลของจุลินทรีย์ในทางเดินอาหาร”

Fuller (1989) หมายถึง “จุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่เสริมในอาหาร และให้ผลประโยชน์แก่สัตว์เจ้าบ้าน (host) โดยช่วยเสริมจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารของสัตว์นั้นๆ ให้อยู่ในสภาพที่สมดุล”

Havenaar และ Huis in't Veld (1992) หมายถึง “จุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่เพาะเลี้ยงเป็นจุลินทรีย์ชนิดเดียวหรือแบบผสม นำไปเสริมให้กับสัตว์และคน แล้วมีผลประโยชน์ต่อสัตว์และคนนั้นๆ โดยช่วยเสริมคุณสมบัติของจุลินทรีย์ประจำถิ่น”

### จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก

จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกส่วนมาก ได้แก่ แลคติกแอซิคแบคทีเรีย และยังมีแบคทีเรียอื่นๆ ยีสต์ และ รา เป็นส่วนน้อย ดังแสดงในตารางที่ 1.

### ลักษณะที่ดีของโพรไบโอติก (Fuller, 1989 ; Havenaar, และ Huis in't Veld, 1992)

1. เป็นสายพันธุ์ที่ให้ผลประโยชน์ต่อตัวสัตว์ เช่น เพิ่มการเจริญเติบโต หรือต้านทานต่อโรค
2. ไม่เป็นสายพันธุ์ที่ก่อโรค จุลินทรีย์โพรไบโอติกและองค์ประกอบของเซลล์รวมทั้งผลิตภัณฑ์ของเซลล์ ต้องไม่สร้างปฏิกิริยาที่เป็นพิษหรือก่อมะเร็งกับตัวเจ้าบ้าน
3. อยู่ในลักษณะเซลล์ที่มีชีวิต และมีปริมาณมากพอ
4. สามารถมีชีวิตอยู่ได้ในระบบทางเดินอาหาร ซึ่งมีระดับพีเอชต่ำ
5. สามารถเจริญ และ/หรือ ตั้งรกราก ในระบบทางเดินอาหารได้
6. ผลิตง่าย สามารถมีชีวิตอยู่ได้นานภายใต้สภาวะการเก็บรักษา หรือเมื่อนำไปผสมอาหาร
7. เป็นสายพันธุ์ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมคงที่ ไม่มีการถ่ายทอดพลาสมิด

ตารางที่ 1. จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก

แลกติกแอซิดแบคทีเรีย (ลอบ.)			จุลินทรีย์ อื่นๆ	รายการอ้างอิง
<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Bifidobacterium</i> spp.	ลอบ. อื่นๆ		
<i>L. acidophilus</i> <i>L. bulgaricus</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. casei</i>	<i>Bif. bifidum</i>	<i>Streptococcus lactis</i> <i>S. diacetylactis</i> <i>S. thermophilus</i> <i>Enterococcus faecium</i>	<i>Bacillus subtilis</i> <i>B. toyoi</i> <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Torulopsis sp.</i>	Fox (1988)
<i>L. bulgaricus</i> <i>L. acidophilus</i> <i>L. casei</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. brevis</i> <i>L. cellobiosus</i> <i>L. lactis</i> <i>L. reuteri</i> <i>L. helveticus</i> <i>L. salivarius</i> <i>L. rhamnosus</i>	<i>Bif. adolescentis</i> <i>Bif. animalis</i> <i>Bif. bifidum</i> <i>Bif. infantis</i> <i>Bif. longum</i> <i>Bif. thermophilum</i> <i>Bif. pseudolongum</i> <i>Bif. brevis</i>	<i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> <i>S. lactis</i> <i>S. cremoris</i> <i>S. diacetylactis</i> <i>S. intermedius</i> <i>Ent. faecium</i> <i>Ent. faecalis</i> <i>Ent. hirae</i> <i>Leuconostoc sp.</i> <i>Pediococcus pentasaceus</i>	<i>B. subtilis</i> <i>B. cereus</i> <i>B. natto</i> <i>B. mesentericus</i> <i>B. licheniformis</i> <i>Propionibacterium sp.</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Candida pintolopesii</i> <i>A. oryzae</i> <i>A. niger</i> <i>E. coli</i> <i>Clostridium butyricum</i>	Fuller(1989, 1992, 1999)

ตารางที่ 1. (ต่อ)

แลกด็กแอซิดแบคทีเรีย (ลอบ.)			จุลินทรีย์ อื่นๆ	รายการอ้างอิง
<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Bifidobacterium</i> spp.	ลอบ. อื่นๆ		
<i>L. acidophilus</i>	<i>Bif. adolescentis</i>	<i>S. thermophilus</i>	<i>B. cereus</i> ('toyoi')	Holzapfel และคณะ (1998)
<i>L. casei</i>	<i>Bif. animalis</i>	<i>Ent. faecalis</i>	<i>E. coli</i> ('Nissle 1917')	
<i>L. crispatus</i>	<i>Bif. bifidum</i>	<i>Ent. faecium</i>	<i>Propionibacterium</i>	
<i>L. gallinarum</i>	<i>Bif. breve</i>	<i>Lactococcus. lactis</i>	<i>freudenreichii</i>	
<i>L. gasseri</i>	<i>Bif. infantis</i>	<i>Leuc. Mesenteroides</i>	<i>Sac. cerevisiae</i> ('boulardii')	
<i>L. johnsonii</i> ( <i>L. paracasei</i> )	<i>Bif. lactis</i>	<i>Ped. acidilactici</i>		
<i>L. plantarum</i>	<i>Bif. longum</i>	<i>Sporolactobacillus inulinus</i>		
<i>L. reuteri</i>				
<i>L. rhamnosus</i>				

## ผลประโยชน์ที่เป็นไปได้ของโพรไบโอติก (Fuller, 1989)

1. ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ โดย:
  - 1.1 สร้างสารต่อต้านจุลชีพ
  - 1.2 แย่งอาหารกับจุลินทรีย์อื่น
  - 1.3 แย่งพื้นที่จับกับผนังทางเดินอาหาร
2. เปลี่ยนแปลงเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ในทางเดินอาหาร
  - 2.1 เพิ่มประสิทธิภาพของเอนไซม์ที่มีประโยชน์ เช่น  $\beta$ -galactosidase ที่ช่วยบรรเทาภาวะที่ไม่สามารถย่อยน้ำตาลแลคโตสในระบบทางเดินอาหารได้
  - 2.2 ลดประสิทธิภาพของเอนไซม์บางชนิด เช่น  $\beta$ -glucuronidase, nitroreductase และ azoreductase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับขบวนการเกิดมะเร็ง โดยปล่อยสารก่อมะเร็งในทางเดินอาหาร (Rafter, 1995)
3. กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน (Havenaar และ Spanhaak, 1994; Perdigon และคณะ, 1995)
  - 3.1 เพิ่มระดับแอนติบอดี (antibody)
  - 3.2 เพิ่มประสิทธิภาพของแมคโครฟาจ (macrophage)

## โพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

โพรไบโอติกมีการใช้กันอย่างแพร่หลาย ใช้ได้ผลทั้งในมนุษย์ (Holzapfel และคณะ 1998) และสัตว์บก เช่น สุกร, วัว, แพะ และ ไก่ (Fox, 1988 ; Fuller, 1992) การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีการใช้โพรไบโอติกไม่แพร่หลายนัก โดยเริ่มมีการใช้โพรไบโอติก ภายใน 10 ปีที่ผ่านมา วัตถุประสงค์การนำมาใช้ เพื่อลดการใช้สารปฏิชีวนะ จุลินทรีย์โพรไบโอติกที่มีการใช้ในการเลี้ยงสัตว์น้ำแสดงในตารางที่ 2.

วรรณิกา เพ็ญนัทธ์ (2539) ศึกษาการใช้โพรไบโอติกเสริมในอาหารกุ้งกุลาดำเป็นครั้งแรกโดยใช้ *Bacillus* สายพันธุ์ S11 ที่แยกได้จากลำไส้กุ้งกุลาดำที่มีสุขภาพดี และมีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก ผสมในอาหารกุ้ง เลี้ยงกุ้งเป็นเวลา 100 วัน พบว่า กุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารที่ผสม *Bacillus* สายพันธุ์ S11 จะมีการเจริญเติบโต อัตราการรอด และความต้านทานต่อโรคสูงกว่ากุ้งกุลาดำที่ไม่ได้รับอาหารที่ผสม *Bacillus* สายพันธุ์ S11 อย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) แสดงว่า จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกนอกจากจะเร่งการเจริญเติบโต ยังอาจทำหน้าที่เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำสอดคล้องกับการพบการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของโพรไบโอติกในสัตว์บก (Havenaar และ Spanhaak, 1994; Perdigon และคณะ, 1995)

ตารางที่ 2. การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

ชนิดสัตว์น้ำ	จุลินทรีย์โพรไบโอติก	จุลินทรีย์ที่ใช้ในการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค	ผลการศึกษา	รายการอ้างอิง
ปลาซัลมอน	<i>Tetraselmis suecica</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>A. salmonicida</i> <i>Serratia liquefaciens</i> <i>Vibrio anguillarum</i> <i>V. salmonicida</i> <i>Yersinia ruckeri</i> type I	- ควบคุมโรคได้ดี	Austin และคณะ (1992)
ปลาซัลมอน	<i>Pseudomonas fluorescens</i> สายพันธุ์ F19/3	<i>A. salmonicida</i>	- ควบคุมโรคได้ดี	Smith และ Savey (1993)
หอยนางรม (ระยะตัวอ่อน)	CA 2	ไม่ได้วิเคราะห์	- กระตุ้นการเจริญเติบโต และมีอัตราการรอดสูง	Douillet และ Langdon (1994)
ปลาซัลมอน	<i>V. alginolyticus</i>	<i>A. salmonicida</i> <i>V. anguillarum</i> <i>V. ordalii</i>	- ควบคุมโรคได้ดี	Austin และคณะ (1995)
ปลาซัลมอน	<i>L. plantarum</i> (สามารถยับยั้ง <i>V. anguillarum</i> )	<i>A. salmonicida</i>	- ไม่สามารถควบคุมโรคได้ แต่ <i>L. plantarum</i> สามารถตั้งรกรากเกาะที่ผนังลำไส้	Gildberg และคณะ (1995)
ปลา flounder	<i>Lactobacillus</i> สายพันธุ์ DS12	ไม่ได้วิเคราะห์	- กระตุ้นการเจริญเติบโต	Byun และคณะ (1997)
หอยแครง (ระยะตัวอ่อน)	<i>Vibrio</i> sp.	<i>V. anguillarum</i> related (VAR) pathogen	- ควบคุมโรคได้ดี	Riquelme และคณะ (1997)
กุ้งสกุลพีเนียส	<i>Bacillus</i> sp.	ไม่ได้วิเคราะห์	- มีอัตราการรอดสูง	Moriarty (1998)
กุ้งกุลาดำ	<i>Bacillus</i> สายพันธุ์ S 11	<i>V. harveyi</i>	- กระตุ้นการเจริญเติบโต และมีอัตราการรอดสูง - ควบคุมโรคได้ดี	Rengpipat และคณะ (1998a)
ปลา rainbow trout	<i>P. fluorescens</i> สายพันธุ์ AH2	<i>V. anguillarum</i>	- ควบคุมโรคได้ดี	Gram และคณะ (1999)

ที่มา : ดัดแปลงจาก Rengpipat และคณะ (1998b)

## ระบบหมุนเวียนเลือดของครัสเตเชีย (Crustacean hemolymph circulatory system)

ระบบหมุนเวียนเลือดของครัสเตเชียเป็นระบบเปิด มีอวัยวะสร้างเม็ดเลือดเรียกว่า hemopoietic (hematopoietic) tissue อวัยวะนี้ในกุ้งตั้งอยู่ใกล้หลอดเลือดเอออร์ตาส่วนหน้า (anterior aorta) ได้กรี ดังรูปที่ 2. น้ำเลือดกุ้งจะมีรงควัตถุฮีโมไซยานิน (hemocyanin) ทำหน้าที่แลกเปลี่ยนแก๊ส ส่วนเม็ดเลือด (hemocyte) จะทำหน้าที่ทางภูมิคุ้มกันเท่านั้น (Ratcliffe และคณะ, 1985)

เม็ดเลือดของกุ้งแบ่งออกเป็น 3 ชนิด (รูปที่ 3.) คือ

### 1. ไฮยาลินเซลล์ (hyaline cells)

เป็นเม็ดเลือดที่มีขนาดเล็กไม่มีแกรนูล (granule) ในไซโตพลาสซึม (cytoplasm) เมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านจะพบแกรนูลขนาดเล็ก (เส้นผ่าศูนย์กลางแกรนูล 50 นาโนเมตร) ได้เล็กน้อย และพบว่าเซลล์ชนิดนี้จะมีอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ของนิวเคลียสต่อพื้นที่ของเซลล์ (nucleocytoplasmic ratio) สูงกว่าเซลล์เม็ดเลือดอีกสองชนิดนั้นหมายถึงไฮยาลินเซลล์จะมีนิวเคลียสขนาดใหญ่ และมีไซโตพลาสซึมน้อย (Hose และคณะ, 1990)

### 2. เซมิแกรนูลาเซลล์ (semigranular cell)

เป็นเม็ดเลือดที่มีแกรนูลขนาดเล็ก (เส้นผ่าศูนย์กลางแกรนูล  $\leq 1.0$  ไมโครเมตร) ในไซโตพลาสซึม ขนาดของเซลล์จะมีขนาดใหญ่กว่าไฮยาลินเซลล์ และมีอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ของนิวเคลียสต่อพื้นที่ของเซลล์น้อยกว่าไฮยาลินเซลล์ (Hose และคณะ, 1990)

### 3. แกรนูลาเซลล์ (granular cell)

เป็นเม็ดเลือดที่มีแกรนูลขนาดใหญ่ (เส้นผ่าศูนย์กลางแกรนูล 1.3-2.0 ไมโครเมตร) อัดแน่นในไซโตพลาสซึม เซลล์ชนิดนี้จะมีขนาดใหญ่ และมีอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ของนิวเคลียสต่อพื้นที่ของเซลล์น้อยกว่าไฮยาลินเซลล์ (Hose และคณะ, 1990)



## ระบบภูมิคุ้มกันของครัสเตเชีย (Crustacean immune system)

ภูมิคุ้มกันโรคในครัสเตเชียจะเป็นภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่โดยกำเนิด (innate immunity) และสามารถแยกความแตกต่างระหว่างตัวเอง และสิ่งแปลกปลอม (self and non-self) (McKay และคณะ, 1969; Ratcliffe และคณะ, 1985) ระบบภูมิคุ้มกันของครัสเตเชียแบ่งเป็น 2 ระบบ (Lackie, 1980; Ratcliffe และคณะ, 1985; Smith และ Chisholm, 1992) คือ

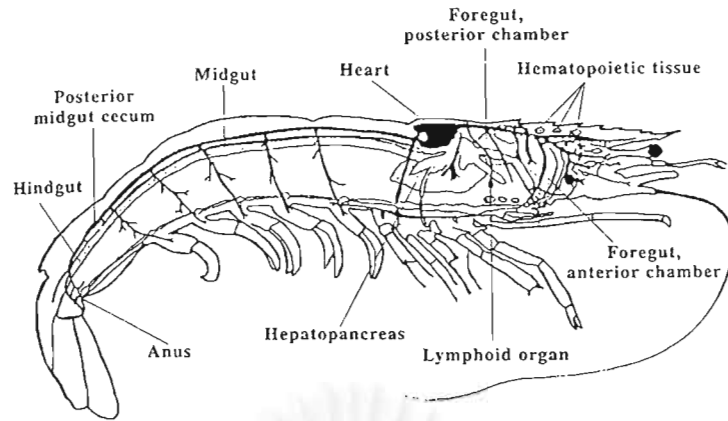
1. ภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์ (cellular defenses)
2. ภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยสารน้ำ (humoral defenses)

### 1. ภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์ (cellular defenses)

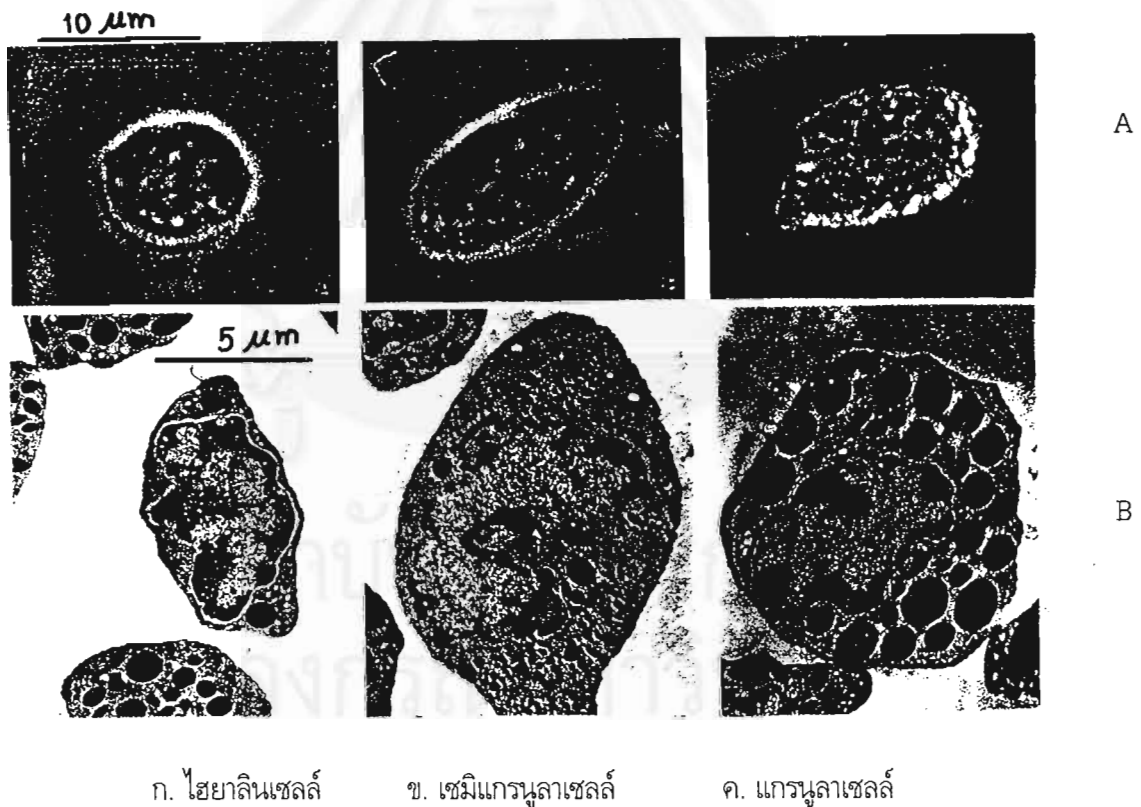
ภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์ในครัสเตเชีย จะเกิดขึ้นทันทีหลังจากได้รับสิ่งแปลกปลอม ซึ่งการตอบสนองจะเป็นแบบไม่จำเพาะ (non-specific defense) และไม่ต้องการการชักนำ (Johansson และ Söderhäll, 1989; Lackie, 1980; Smith และ Söderhäll, 1983) ประกอบด้วย การแข็งตัวของเลือด (hemolymph clotting), กระบวนการกลืนทำลาย (phagocytosis), การสร้างโนดูล (nodule formation), การห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอม (encapsulation) และระบบไพโรฟีโนลออกซิเดส (prophenoloxidase system) โดยมีเซลล์เม็ดเลือดทั้ง 3 ชนิดทำหน้าที่แตกต่างกัน ดังตารางที่ 3.

#### 1.1 การแข็งตัวของเลือด (hemolymph clotting)

เป็นกระบวนการแรกที่เกิดขึ้นภายหลังจากได้รับบาดแผล เพื่อป้องกันการสูญเสียเลือด และป้องกันการบุกรุกของเชื้อโรคผ่านบาดแผล (Johansson และ Söderhäll, 1989) ระบบการแข็งตัวของเลือดในครัสเตเชีย จะมีการทำงานร่วมมือกันระหว่างเซลล์เม็ดเลือดไฮยาลินเซลล์ และโคแอกกูโลเจน (coagulogen) ที่เป็นองค์ประกอบในสารน้ำ (Hose และคณะ, 1990; Ratcliffe และคณะ, 1985; Vargas-Albores และคณะ, 1998) และพบว่าการแข็งตัวของเลือดจะเกิดขึ้นพร้อมกับการสร้างเม็ดสีดำ (melanin) ที่เกิดขึ้นในระบบไพโรฟีโนลออกซิเดส (Johansson และ Söderhäll, 1989; Ratcliffe และคณะ, 1985)



รูปที่ 2. อวัยวะภายในของกุ้งสกุลพีเนียส (ที่มา : Sung และ Song, 1996)



รูปที่ 3. เม็ดเลือดของครัสเตเชียน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ลำแสงปกติ (A) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (B) (ที่มา : Hose และคณะ, 1990)

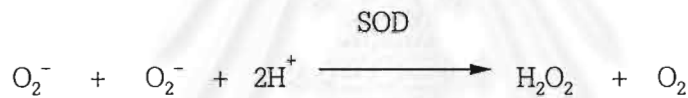
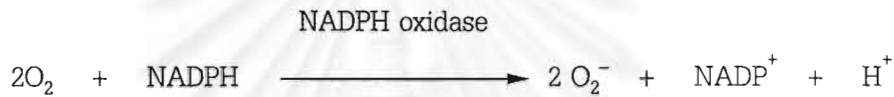


ตารางที่ 3. หน้าที่ของเม็ดเลือดในครัสเตเชีย

บทบาทหน้าที่	ครัสเตเชีย	ชนิดเม็ดเลือด			รายการอ้างอิง
		ไฮยาลินเซลล์	เซมิแกรนูลาเซลล์	แกรนูลาเซลล์	
การแข็งตัวของเลือด (hemolymph clotting)	กุ้งมังกร <i>Homarus americanus</i> กุ้งมังกร <i>Panulirus interruptus</i> ปู <i>Loxorhynchus grandis</i>	+	-	-	Hose และคณะ (1990)
กระบวนการกลืนทำลาย (phagocytosis)	กุ้งน้ำจืด <i>Parachaeraps bicarinatus</i> กุ้งน้ำจืด <i>Astacus astacus</i>	+	-	-	McKay และ Jenkin (1970) Smith และ Söderhäll (1983)
	กุ้ง <i>Penaeus japonicus</i> กุ้งมังกร <i>Homarus americanus</i> กุ้งมังกร <i>Panulirus interruptus</i> ปู <i>Loxorhynchus grandis</i>	-	+	+	Bachère และคณะ (1995) Itami และคณะ (1998) Hose และคณะ (1990)
การห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอม (encapsulation)	กุ้งมังกร <i>Homarus americanus</i> กุ้งมังกร <i>Panulirus interruptus</i> ปู <i>Loxorhynchus grandis</i>	-	+	+	Hose และคณะ (1990)
ระบบไพรอีนอลออกซิเดส (prophenoloxidase system)	กุ้งมังกร <i>Homarus americanus</i> กุ้งมังกร <i>Panulirus interruptus</i> กุ้งมังกร <i>Nephrops norvegicus</i> ปู <i>Loxorhynchus grandis</i>	-	+(ในแกรนูล)	+(ในแกรนูล)	McKay และ Jenkin (1970) Smith และ Söderhäll (1991)

## 1.2 กระบวนการกลืนทำลายหรือฟาโกไซโตซิส (phagocytosis)

กระบวนการกลืนทำลายเป็นหน้าที่สำคัญของเม็ดเลือดในการทำลายหรือลบสิ่งแปลกปลอมทั้งที่มีชีวิต และไม่มีชีวิตที่บุกรุกเข้าไปในร่างกาย (McKay และ Jenkin, 1970; Reade, 1968) ขั้นตอนในการกลืนทำลายจะมีลักษณะเช่นเดียวกับสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง (Ratcliffe และคณะ, 1985) โดยขั้นตอนแรกของการเกิดกระบวนการกลืนทำลายได้แก่ การที่สิ่งแปลกปลอมเกาะบนเซลล์เมมเบรนของเม็ดเลือด และมีการยื่นไซโทพลาสซึมล้อมรอบสิ่งแปลกปลอม นำไปสู่การเพิ่มการนำออกซิเจนเข้าสู่เซลล์ (respiratory burst) ซึ่งออกซิเจนเหล่านี้จะถูกรีดิวซ์เป็นซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน ( $O_2^-$ ) ด้วย NADPH oxidase ต่อจากนั้น  $O_2^-$  จะถูกเปลี่ยนเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide ;  $H_2O_2$ ) โดยการเร่งปฏิกิริยาด้วยซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (superoxide dismutase ; SOD) (Klein, 1982; Pick และ Keisari, 1980) ดังสมการต่อไปนี้



$O_2^-$  อาจถูกเปลี่ยนเป็น  $H_2O_2$  ได้อีกทางหนึ่งโดยการเกิดเองตามธรรมชาติไม่ต้องอาศัยเอนไซม์และได้ซึ่งแก๊สออกซิเจน (singlet oxygen ;  $^1O_2$ ) เป็นผลผลิตร่วมกับ  $H_2O_2$  นอกจากนี้  $O_2^-$  อาจทำปฏิกิริยาร่วมกับ  $H_2O_2$  เกิดเป็นไฮดรอกซิลเรดิคัล (hydroxyl radical ;  $\cdot OH$ ) (Klein, 1982) ดังสมการต่อไปนี้



จากปฏิกิริยาข้างต้นพบว่า  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $^1O_2$  และ  $\cdot OH$  จะมีบทบาทในการทำลายสิ่งแปลกปลอมที่ถูกนำเข้าสู่เซลล์โดยวิธีกลืนทำลาย (Adema และคณะ, 1991; Bachère และคณะ, 1995; Klein, 1982; Pick และ Keisari, 1980) แต่เนื่องจาก  $^1O_2$  และ  $\cdot OH$  มีความไม่คงตัวสูง (Klein, 1982) ทำให้  $O_2^-$  และ  $H_2O_2$  มีบทบาทมากที่สุดในการทำลายสิ่งแปลกปลอมโดยวิธีกลืนทำลาย ซึ่งมีผู้รายงานไว้ในหอยทาก (Adema และคณะ, 1991) และกุ้งกุลาดำ (Song และ Hsieh, 1994; Sung และคณะ, 1996)

กระบวนการกลืนทำลายเกิดขึ้นในเซลล์เม็ดเลือดแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์น้ำ (ตารางที่ 3.) เช่น ในกุ้งน้ำจืด ไฮยาลินเซลล์ทำหน้าที่กลืนทำลาย (McKay และ Jenkin, 1970; Smith และ Söderhäll, 1983) ส่วนในกุ้งน้ำเค็มสกุลพีเนียส และกุ้งมังกร เซมิแกรนูลาเซลล์ทำหน้าที่ในการกลืนทำลาย (Bachère และคณะ, 1995; Hose และคณะ, 1990; Itami และคณะ, 1998)

เปอร์เซ็นต์ฟาโกไซโตซิส (% phagocytosis) เป็นตัวชี้ประสิทธิภาพการจับกินสิ่งแปลกปลอม ของเม็ดเลือด พบว่ามีค่าตั้งแต่ 1-2% (Paterson และ Stewart, 1974) จนถึง 84% (Itami และคณะ, 1998) ขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์ทดลอง, วิธีการวิเคราะห์, สิ่งแปลกปลอมที่ใช้ และการกระตุ้นเม็ดเลือด โดยพบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดกระบวนการกลืนทำลายคือ 22 °C (McKay และ Jenkin, 1970)

องค์ประกอบในสารน้ำ (humoral components) เป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้กระบวนการกลืนทำลายเกิดขึ้น McKay และคณะ (1969) และ McKay และ Jenkin (1970) พบว่าเมื่อปล่อยสิ่งแปลกปลอมด้วยซีรัมของกุ้งน้ำจืด *Parachaeraps bicarinatus* ก่อนนำไปวิเคราะห์กระบวนการกลืนทำลาย จะทำให้กระบวนการกลืนทำลายสูงขึ้น และพบว่าซีรัมประกอบด้วยแอกกลูตินิน (agglutinin) ทำให้สรุปได้ว่าสารในน้ำเลือดที่สามารถทำหน้าที่กระตุ้นกระบวนการกลืนทำลาย หรือที่เรียกว่า อ็อปโซนิน (opsonin) คือ แอกกลูตินิน

ในกุ้งมังกร *Homarus americanus* แอกกลูตินินพบว่าเป็นสารที่กระตุ้นกระบวนการกลืนทำลายได้เช่นกัน (Paterson และ Stewart, 1974)

แอกกลูตินินที่เชื่อมต่อกับไลโปโพลีแซคคาไรด์ (LPS-binding agglutinin) เป็นแอกกลูตินิน ชนิดหนึ่งที่พบว่าเป็นสารกระตุ้นกระบวนการกลืนทำลายในกุ้งน้ำจืด *Penaeus californiensis* (Vargas-Albores, 1995) นอกจากนี้ยังพบว่า โปรตีนที่เชื่อมต่อกับบีตา-1,3-กลูแคน ( $\beta$ -1,3-glucan binding protein) และโปรตีน 76 kDa ซึ่งเป็นองค์ประกอบในน้ำเลือดกุ้งปกติ สามารถเป็นอ็อปโซนิน กระตุ้นกระบวนการกลืนทำลายได้ (Cerenius และคณะ, 1994; Johansson และ Söderhäll, 1989; Thörnqvist และ Söderhäll, 1997) สำหรับในปู *Carcinus maenas* จะมีโปรตีน 80 kDa และโปรตีนที่เชื่อมต่อกับบีตา-1,3-กลูแคนในน้ำเลือดทำหน้าที่เป็นอ็อปโซนินกระตุ้นกระบวนการกลืนทำลาย (Johansson, 1995) บีตา-1,3-กลูแคนซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์เชื้อราพบที่สามารถกระตุ้นกระบวนการกลืนทำลายได้เช่นกัน (Smith และ Söderhäll, 1983) โดยบีตา-1,3-กลูแคน จะเพิ่มระดับโปรตีนที่เชื่อมกับบีตา-1,3-กลูแคนที่ทำหน้าที่เป็นอ็อปโซนินในซีรัม (Vargas-Albores, 1995)

กระบวนการกลืนทำลายไม่ได้เกิดเฉพาะเซลล์เม็ดเลือดในระบบหมุนเวียนเลือดเท่านั้น เซลล์ที่อยู่กับที่ (fixed cells) บริเวณเหงือก ที่เรียกว่า nephrocytes ก็สามารถทำหน้าที่กลืนทำลายสิ่งแปลกปลอมได้ด้วยเช่นกัน (Ratcliffe และคณะ, 1985; Thörnqvist และ Söderhäll, 1997)

### 1.3 การสร้างโนดูล (nodule formation)

กรณีที่มีเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมบุกรุกเป็นจำนวนมากจนเกินความสามารถของกระบวนการกลืนทำลายที่จะลบล้างได้ทัน การสร้างโนดูลเป็นกลุ่มก้อนเซลล์รอบๆ สิ่งแปลกปลอมจะเกิดขึ้นเพื่อไม่ให้สิ่งแปลกปลอมกระจายลุกลามทั่วร่างกาย และมักจะพบการสร้างโนดูลบริเวณเหงือก และเฮปาโตแพนแครีเอส (hepatopancreas) (Ratcliffe และคณะ, 1985) พร้อมกับการเกิดเม็ดสีดำ (melanin production) ในระบบโพรฟีโนลออกซิเดส (Johansson และ Söderhäll, 1989)

### 1.4 การห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอม (encapsulation)

การห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอมจะเกิดในกรณีที่สิ่งแปลกปลอมมีขนาดใหญ่มากกว่า 10 ไมโครเมตร (Lackie, 1980) จนเม็ดเลือดเซลล์เดียวไม่สามารถกลืนทำลายได้ ต้องอาศัยเม็ดเลือดจำนวนมากมาล้อมจับกระจายห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอม สิ่งแปลกปลอมที่มีขนาดใหญ่ เช่น พยาธิ, เชื้อรา และสัตว์เซลล์เดียวขนาดใหญ่ (Ratcliffe และคณะ, 1985) เซลล์เม็ดเลือดที่ทำหน้าที่ในการห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอมได้แก่ เซมิแกรนูลาและแกรนูลาเซลล์ (ตารางที่ 3.) โดยที่เซมิแกรนูลาเซลล์จะมีบทบาทมากกว่าแกรนูลาเซลล์ (Hose และคณะ, 1990) กลไกการฆ่าสิ่งแปลกปลอมที่ถูกห่อหุ้มจะอาศัยองค์ประกอบในระบบโพรฟีโนลออกซิเดส พร้อมทั้งมีการเกิดเม็ดสีดำ (Nappi, 1973; Ratcliffe และคณะ, 1985) และพบว่าโปรตีน 76 kDa ในน้ำเลือดจะเป็นตัวช่วยให้การห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอมเกิดเพิ่มขึ้น โดยกระตุ้นให้เม็ดเลือดยึดเกาะสิ่งแปลกปลอมดีขึ้น (Johansson และ Söderhäll, 1989; Smith และ Chisholm, 1992)

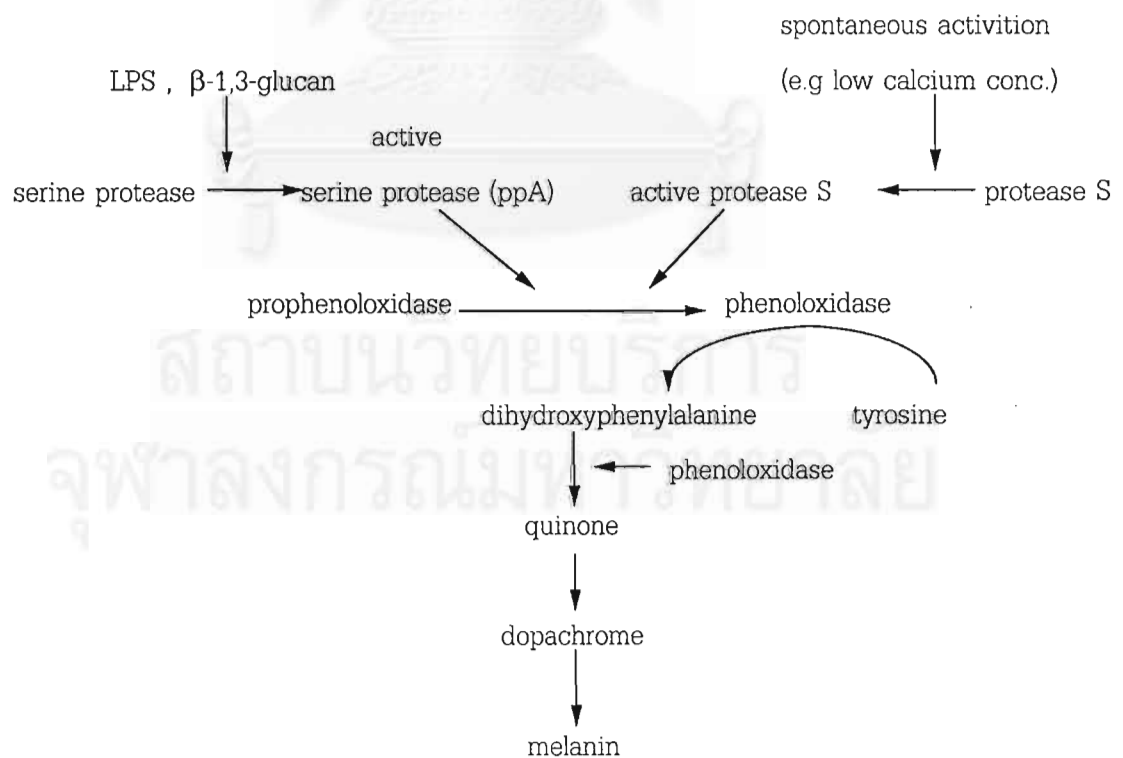
### 1.5 ระบบโพรฟีโนลออกซิเดส (prophenoloxidase system)

การสร้างเม็ดสีดำในระบบโพรฟีโนลออกซิเดส บริเวณบาดแผลที่ปิดแล้ว หรือบริเวณโนดูล หรือภายในกลุ่มก้อนเม็ดเลือดที่ห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอมเพื่อฆ่าพยาธิ (Nappi, 1973) เป็นกลไกการป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์ที่สำคัญในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (Ratcliffe และคณะ, 1985) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มครัสเตเชีย (Johansson และ Söderhäll, 1989) พบว่าเม็ดเลือดจำพวกเซมิแกรนูลา และแกรนูลาเซลล์ จะเป็นแหล่งสร้าง และเก็บเอนไซม์ต่างๆ ในระบบนี้ (ตารางที่ 3.) โดยเก็บอยู่ในเม็ดแกรนูลา (Hose และคณะ, 1990; Smith และ Söderhäll, 1991)

ระบบโพรฟีโนลออกซิเดส เป็นระบบที่มีความซับซ้อนขององค์ประกอบต่างๆ ทางเอนไซม์ (Johansson และ Söderhäll, 1989; Smith และ Söderhäll, 1991) โดยเริ่มจากเซลล์เม็ดเลือดจำพวกเซมิแกรนูลาและแกรนูลาเซลล์จะจดจำและถูกกระตุ้นโดยองค์ประกอบเซลล์ของเชื้อก่อโรคจำพวกไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide ; LPS) ที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรีย หรือ บีตา-1,3-กลู

แคน ที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์เชื้อรา มีผลทำให้เซลล์เม็ดเลือดเกิดดีแกรนูเลชัน (degranulation) หลังเอนไซม์กระตุ้นโปรเฟโนลออกซิเดส (prophenoloxidase activating enzyme ; ppA) ได้แก่ เซอรีนโปรติเอส (serine protease) และโปรเฟโนลออกซิเดส ออกจากเม็ดแกรนูล (Johansson และ Söderhäll, 1989; Ratcliffe และคณะ, 1985) หลังจากนั้น เซอรีนโปรติเอส จะถูกกระตุ้นโดยไลโปโพลีแซคคาไรด์ และ บีตา-1,3-กลูแคนให้กลายเป็น เซอรีนโปรติเอสที่อยู่ในรูปแอคทีฟ (Söderhäll, 1983; Ratcliffe และคณะ, 1985) มีผลไปยังปฏิกิริยาการเปลี่ยนโปรเฟโนลออกซิเดสเป็นเฟโนลออกซิเดส (phenoloxidase) ปฏิกิริยาการเปลี่ยนช่วงสุดท้ายนี้สามารถเกิดได้อีกทางหนึ่ง คือ สภาวะที่มีความเข้มข้นของแคลเซียมต่ำจะไปกระตุ้นให้มีการเปลี่ยนโปรติเอส เอส (protease S) ให้อยู่ในรูปแอคทีฟ และมีผลเปลี่ยนโปรเฟโนลออกซิเดสเป็นเฟโนลออกซิเดสได้เช่นกัน (Ratcliffe และคณะ, 1985) (ดังแสดงในแผนภูมิถัดไป)

เฟโนลออกซิเดส หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า ไทโรซิเนส (tyrosinase) (Aspan และ Söderhäll, 1995) มีความสามารถจับเกาะกับผิวของจุลชีพและพยาธิ พร้อมกับชักนำให้เกิดการสร้างเม็ดสีดำบนเชื้อก่อโรคนั้นๆ (Johansson และ Söderhäll, 1989; Thörnqvist และ Söderhäll, 1997) เฟโนลออกซิเดส จะเร่งปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชัน (hydroxylation) เปลี่ยนไทโรซีน (tyrosine) ให้เป็นไดไฮดรอกซีฟีนิลอะลานีน (dihydroxyphenylalanine ; DOPA) และออกซิไดซ์ ไดไฮดรอกซีฟีนิลอะลานีนให้กลายเป็นควิโนน (quinone) หลังจากนั้นควิโนนจะมีการเรียงตัวใหม่เองโดยไม่มีเอนไซม์เกี่ยวข้องกลายเป็นโดปาโครม (dopachrome) เกาะตัวรวมกันเป็นเม็ดสีดำ (Aspan และ Söderhäll, 1995; Pawelek และ Körner, 1982) ดังแสดงในแผนภูมิต่อไปนี้



เม็ดสีดำ (melanin) ที่สร้างขึ้นในระบบโพรฟีนอลออกซิเดส พบว่าสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ (Kou และ Alexander, 1967) นอกจากนี้สารตัวกลางในขั้นตอนการสร้างเม็ดสีดำก็สามารถทำลายจุลชีพและพยาธิได้เช่นกัน (Pawelek และ Lerner, 1978; Zlotkin และคณะ, 1973) โดยเฉพาะครีโนนที่มีรายงานพบฤทธิ์ทำลายแบคทีเรีย (Pye, 1974)

โปรตีน 76 kDa เป็นโปรตีนที่พบในน้ำเลือดกึ่งโดยธรรมชาติซึ่งสามารถส่งเสริมการทำงานของระบบโพรฟีนอลออกซิเดส โดยมีผลทำให้เม็ดเลือดชนิดเขมิแกรนูลาและแกรนูลา เกิดดีแกรนูเลชันมากขึ้น ปล่อยเอนไซม์โพรฟีนอลออกซิเดสออกมาต่อสู้กับเชื้อโรค (Johansson และ Söderhäll, 1989)

นักวิจัยหลายท่านพบว่า องค์ประกอบของจุลชีพสามารถกระตุ้นระบบโพรฟีนอลออกซิเดส เช่น ไลโปโพลีแซคคาไรด์จากแบคทีเรียแกรมลบ (Pye, 1974), บีตา-กลูแคนจากเชื้อรา (Ratcliffe และคณะ, 1984; Smith และ Söderhäll, 1983; Söderhäll และ Unestam, 1979; Vargar-Albores, 1995) หรือไซโมแซน (zymosan) จากยีสต์ (Sung และคณะ, 1996; Unestam และ Söderhäll, 1977) และพบว่าการทำงานของระบบเอนไซม์นี้ต้องอาศัย  $Mg^{2+}$  (Smith และ Söderhäll, 1983) และ  $Ca^{2+}$  (Vargar-Albores และคณะ, 1998)

การควบคุมการเกิดกระบวนการนี้ให้เหมาะสมในร่างกายกึ่งจะเกิดจากตัวยับยั้งเอนไซม์ย่อยโปรตีน 2 ชนิดคือ อัลฟาแมโครโกลบูลิน ( $\alpha$ -macroglobulin) และตัวยับยั้งทริปซินขนาด 155 kDa (155 kDa trypsin inhibitor) ตัวยับยั้งเอนไซม์ย่อยโปรตีนนี้จะยับยั้งเอนไซม์กระตุ้นโพรฟีนอลออกซิเดส (ppA) ซึ่งเป็นเอนไซม์เปลี่ยนโพรฟีนอลออกซิเดสเป็นฟีนอลออกซิเดส (Cerenius และ Söderhäll, 1995; Johansson และ Söderhäll, 1989; Thörnqvist และ Söderhäll, 1997)

## 2. ภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยสารน้ำ (humoral defenses)

ซีรัมของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังจะไม่พบอินมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin) เหมือนสัตว์มีกระดูกสันหลัง (Lackie, 1980 ; Ratcliffe และคณะ, 1985; Thörnqvist และ Söderhäll, 1997) แต่มีองค์ประกอบหลายชนิดที่ทำหน้าที่ในระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (antibacterial activity) , แอคกลูตินิน (agglutinin) , สารคล้ายไซโตไคน์ (cytokine-like factor) , โมดูเลเตอร์ (modulators) และสารที่เกี่ยวข้องกับการแข็งตัวของเลือด (clotting factors) องค์ประกอบเหล่านี้เกิดขึ้นเองในธรรมชาติ (Chisholm และ Smith, 1995; McKay และคณะ, 1969; Stewart และ Zwicker, 1972) หรืออาจถูกชักนำให้สร้างขึ้น (Adams, 1991; Evans และคณะ, 1968, 1969a, 1969b ; Stewart และ Zwicker, 1972)

Lackie (1980) และ Ratcliffe และคณะ (1985) กล่าวว่า การถูกชักนำจะไม่แสดงคุณสมบัติของ อิมมูโนโกลบูลินที่สามารถจดจำแอนติเจนและตอบสนองต่อแอนติเจนนั้นๆ เมื่อพบแอนติเจนเป็นครั้งที่สอง อย่างเฉพาะเจาะจง (anamnestic properties of immunoglobulin)

## 2.1 ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (antibacterial activity)

ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียมีการศึกษาไม่มากนักในกลุ่ม crustaceans ส่วนใหญ่จะศึกษาในสัตว์ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น กุ้งมังกร และกุ้งสกุล *Penaeus* เป็นต้น (ตารางที่ 4.) ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียสามารถพบได้ทั้งส่วนพลาสมา (Adams, 1991; Destoumieux และคณะ, 1997; Evans และคณะ, 1968, 1969a, 1969b; Stewart และ Zwicker, 1972), ซีรัม (Noga และคณะ, 1996; Stewart และ Zwicker, 1972) และส่วนของเซลล์เม็ดเลือดแดง (Chisholm และ Smith, 1995; Destoumieux และคณะ, 1997; Noga และคณะ, 1996)

แบคทีเรียซิดิน (bactericidin) เป็นสารต้านแบคทีเรียที่รายงานพบในน้ำเลือดกุ้งมังกร (Evans และคณะ, 1968, 1969a, 1969b; Stewart และ Zwicker, 1972; Weinheimer และคณะ, 1969) สามารถถูกชักนำให้สูงขึ้นเมื่อได้รับสารกระตุ้น, ไม่ทนความร้อน และมีความจำเพาะต่อเชื้อบางส่วน (ตารางที่ 4.)

Evans และคณะ (1968, 1969a, 1969b) และ Weinheimer และคณะ (1969) พบว่าแบคทีเรียซิดินสามารถถูกชักนำให้สูงขึ้นเมื่อได้รับเชื้อแบคทีเรียแกรมลบรูปท่อน EMB-1 ที่แยกได้จากลำไส้ของกุ้งมังกร *Panulirus argus* ที่มีสุขภาพดี ในรูปเซลล์ที่มีชีวิต และเซลล์ที่ถูกฆ่าด้วยฟอร์มาลิน 0.5 % เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน เมื่อได้รับการกระตุ้นครั้งที่ 2 และ 3 จะพบแบคทีเรียซิดิน ไตเตอร์ สูงขึ้นตามลำดับ แต่แบคทีเรียซิดินจะแสดงความจำเพาะต่อเชื้อเพียงบางส่วน (ตารางที่ 4.)

Stewart และ Zwicker (1972) พบว่า ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในน้ำเลือดกุ้งมังกร *Homarus americanus* สูงขึ้น เมื่อกระตุ้นด้วยเชื้อ *Pseudomonas perolens* ในรูปเซลล์ที่ตายแล้ว ซึ่งแยกได้จากลำไส้ กุ้งมังกร และเป็นสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรคในกุ้ง แบคทีเรียซิดินที่พบไม่ทนความร้อน และมีฤทธิ์สูงขึ้นเมื่อพีเอชลดลงจาก 7.6 เป็น 6.0 (ตารางที่ 4.)

Chisholm และ Smith (1995) ศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียใน crustaceans หลายชนิด พบว่า ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียมีฤทธิ์ยับยั้งแต่ไม่ทำให้เซลล์แบคทีเรียแตก โดยที่ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่พบในส่วนของเซลล์เม็ดเลือดแดงไม่ได้เกิดจากฟีนอลออกซิเดสที่พบในเม็ดเลือด (ตารางที่ 4.)

ตารางที่ 4. ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในคริสต์เตเซียน

คริสต์เตเซียน	แหล่งที่พบ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย	แบคทีเรียที่ถูกยับยั้ง	คุณสมบัติบางประการ			รายการอ้างอิง
			การทนความร้อน	ถูกชักนำด้วย สารกระตุ้น	คุณสมบัติอื่นๆ	
กุ้งมังกร <i>Panulirus argus</i>	พลาสมา	แกรมลบรูปแท่ง	เสถียรที่ 65 °ซ 20 นาที	+	-ไม่เกิดการรวมกลุ่มกับ แบคทีเรีย -ตอบสนองต่อการกระตุ้น ครั้งที่ 2 และ 3 -มีความจำเพาะต่อเชื้อ เพียงบางส่วน	Evans และคณะ (1968)  Evans และคณะ (1969b)  Weinheimer และคณะ (1969)
กุ้งมังกร <i>Panulirus interruptus</i>	พลาสมา	แกรมลบรูปแท่ง	เสถียรที่ 60 °ซ 20 นาที	+	-ไม่เกิดการรวมกลุ่มกับ แบคทีเรีย	Evans และคณะ (1969a)
กุ้งมังกร <i>Homarus americanus</i>	ซีรัม และ พลาสมา	<i>Pseudomonas perolens</i>	เสถียรที่ 55-65 °ซ	+	-ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียสูงขึ้น เมื่อพีเอชลดลงจาก 7.6 เป็น 6.0	Stewart และ Zwicker (1972)
กุ้งกุลาดำ <i>Penaeus monodon</i>	พลาสมา	<i>Vibrio anguillarum</i> <i>V. alginolyticus</i> <i>E. coli</i>	ไม่มีข้อมูล	+	-มีความจำเพาะต่อเชื้อ เพียงบางส่วน	Adams (1991) Sung และคณะ (1996)



ตารางที่ 4. (ต่อ)

ครัสเตเชียน	แหล่งที่พบ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย	แบคทีเรียที่ถูกยับยั้ง	คุณสมบัติบางประการ			รายการอ้างอิง
			การทนความร้อน	ถูกชักนำด้วย สารกระตุ้น	คุณสมบัติอื่นๆ	
กุ้งมังกร <i>Galathea strigosa</i> กุ้งมังกร <i>Nephrops norvegicus</i> กุ้ง <i>Crangon crangon</i>	HLS*	<i>Psychrobacter immobilis</i>	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล	-มีฤทธิ์ต้านแต่ไม่ทำให้ เซลล์แบคทีเรียแตก (non lytic activity)	Chisholm และ Smith (1995)
ปูทะเล <i>Callinectes sapidus</i>	ซีรัม และ HLS	<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>V. alginolyticus</i> <i>V. parahemolyticus</i> <i>V. vulnificus</i> <i>E. coli</i>	เสียสภาพที่ 65-70 °ซ	ไม่มีข้อมูล	-มีฤทธิ์ต้านที่พีเอช 5.2-6.0 -ถูกยับยั้งโดยโซเดียม คลอไรด์ -เสียสภาพโดย โปรติเอส	Noga และคณะ (1996)
กุ้ง <i>Penaeus vannamei</i>	พลาสมา และ HLS	<i>Micrococcus luteus</i> <i>E. coli</i>	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล	-มีฤทธิ์ต้านแต่ไม่ทำให้ เซลล์แบคทีเรียแตก	Destoumieux และคณะ (1997)

หมายเหตุ \* HLS (hemocyte lysate supernatants) = ส่วนใสของเซลล์เม็ดเลือดแตก

Noga และคณะ (1996) ศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในปูทะเล *Callinectes sapidus* พบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียทั้งในซีรัม และส่วนใสของเซลล์เม็ดเลือดแดง มีคุณสมบัติเป็นโปรตีน มีฤทธิ์ที่พีเอชต่ำ (5.2-6.0), ถูกยับยั้งโดยโซเดียมคลอไรด์ และไม่ทนความร้อน (ตารางที่ 4.)

Destoumieux และคณะ (1997) ค้นพบโปรตีนที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพในน้ำเลือดกุ้ง *Penaeus vannamei* และตั้งชื่อว่า penaeidins โปรตีนนี้สามารถสกัดได้ทั้งจากส่วนพลาสมาและเม็ดเลือดมีฤทธิ์ต้านจุลชีพโดยไม่ทำให้เซลล์แบคทีเรียแตก (non lytic activity) สร้างและจัดเก็บอยู่ในเม็ดเลือดของกุ้ง *Penaeus vannamei* (ตารางที่ 4.)

ในกุ้งกุลาดำมีผู้รายงานฤทธิ์ต้านแบคทีเรียไม่มากนัก Adams (1991) พบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในกุ้งกุลาดำในส่วนพลาสมาสามารถถูกชักนำให้สูงขึ้นด้วยสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่ผลิตจาก *V. alginolyticus* ที่ฆ่าให้ตายด้วยความร้อน (ตารางที่ 4.)

Sung และคณะ (1996) พบฤทธิ์ต้าน *E.coli* ในกุ้งกุลาดำสูงขึ้นอย่างรวดเร็วแต่คงอยู่ในช่วงเวลาสั้นๆ เมื่อกระตุ้นด้วยเซลล์ *Vibrio* ที่ทำให้ตายด้วยความร้อน บีตา-กลูแคน และ โซโมแซน (ตารางที่ 4.)

## 2.2 แอคกลูตินิน (agglutinin)

แอคกลูตินินเป็นสารก่อให้เกิดการจับตัวของเม็ดเลือดแดงสัตว์มีกระดูกสันหลัง (McKay และคณะ, 1969) แบคทีเรีย (Sritunyalucksana, 1995) และโปรโตซัว (Bang, 1962) พบโดยธรรมชาติในน้ำเลือดของครัสเตเชีย แอคกลูตินินนอกจากจะเป็นสารก่อให้เกิดการจับตัวของสิ่งแปลกปลอมแล้ว ยังมีหน้าที่เป็นออปโซนิกระตุ้นกระบวนการฟาโกไซโตซิสในการป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์ด้วย (McKay และ Jenkin, 1970; Paterson และ Stewart, 1974; Vargas-Albores, 1995)

## 2.3 สารคล้ายไซโตไคน์ (cytokine-like factors)

ไซโตไคน์เป็นโปรตีนที่ไม่ใช่แอนติบอดี สร้างในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยผลิตจากลิมโฟซัยท์ มีหน้าที่ช่วยรักษาความสมดุลของเลือดในระบบภูมิคุ้มกัน และช่วยในการประสานงานระหว่างระบบภูมิคุ้มกันกับระบบอื่นๆในร่างกาย (Smith และ Chisholm, 1992)

สารที่แสดงสมบัติคล้ายไซโตไคน์ในกุ้งได้แก่ โปรตีนขนาด 76 kDa ซึ่งมีหน้าที่ช่วยกระตุ้นกระบวนการฟาโกไซโตซิส ช่วยในการยึดติดระหว่างเซลล์เม็ดเลือดกับสิ่งแปลกปลอมขณะเกิด encapsulation (Smith และ Chisholm, 1992) และส่งเสริมการทำงานของระบบโพรพีนอลออกซิเดส โดยช่วยให้เม็ดเลือด

ชนิดซีมิแกรนูลา และแกรนูลา เกิดดีแกรนูเลชันมากขึ้น ปล่อยเอนไซม์โพรฟีนอลออกซิเดสออกมาต่อสู้กับเชื้อโรคมากขึ้น (Johansson และ Söderhäll, 1989)

## 2.4 โมดูเลเตอร์ (modulators)

ตัวควบคุมระบบภูมิคุ้มกันให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสมในคริสต์เซียนได้แก่ ตัวยับยั้งเอนไซม์ย่อยโปรตีน (proteinase inhibitor) และ อัลฟาแมคโครโกลบูลิน ( $\alpha$ -macroglobulin) ที่มีหน้าที่ยับยั้ง เซอรินโปรติเอส ในระบบโพรฟีนอลออกซิเดสให้อยู่ในระดับที่สมดุล (Smith และ Chisholm, 1992)

## 2.5 สารที่เกี่ยวข้องกับการแข็งตัวของเลือด (clotting factors)

โคแอกกูโลเจน (coagulogen) เป็นโปรตีนในพลาสมาที่มีบทบาทในการป้องกันการสูญเสียเลือด และป้องกันการบุกรุกของเชื้อโรค (Smith และ Chisholm, 1992)

### การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในคริสต์เซียน (*in vivo*)

การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunostimulants) ในการป้องกันโรคติดเชื้อในสัตว์น้ำเป็นวิธีที่ดีกว่าการใช้สารปฏิชีวนะ เนื่องจากไม่ก่อปัญหาสารปฏิชีวนะตกค้าง (Siwicki และคณะ, 1994) สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่ใช้กันในสัตว์น้ำและสัตว์อื่นๆ ได้แก่ trace mineral , วิตามินรวม และ สารธรรมชาติจากพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ เช่น บีตา-กลูแคน, โลโบโพลีแซคคาไรด์, เบปทีโดไกลแคน, โซโมเซน และเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตหรือทำให้ตายแล้ว (Evans และคณะ, 1968; Siwicki และคณะ, 1994)

Evans และคณะ (1968 ,1969b) ได้ใช้เชื้อแบคทีเรียแกรมลบรูปท่อน EMB-1 ที่แยกได้จากลำไส้ของกุ้งมังกร *Panulirus argus* ที่มีสุขภาพดี ในรูปเซลล์ที่มีชีวิต และเซลล์ที่ถูกฆ่าด้วยฟอร์มาลิน 0.5 % เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยการฉีดเข้าตัวกุ้ง *P. argus* ภายหลังการฉีดจะพบการสร้างแบคทีเรียชนิดสูงสุดที่ 24-48 ชั่วโมงในน้ำเลือดกุ้ง เมื่อได้รับการกระตุ้นครั้งที่ 2 และ 3 จะพบแบคทีเรียชนิดนี้ ไตเตอร์ สูงขึ้นตามลำดับ โดยแบคทีเรียชนิดที่เกิดขึ้นจะมีความจำเพาะต่อเชื้อเพียงบางส่วน (Weinheimer และคณะ ,1969)

McKay และ Jenkin (1969) ศึกษาการใช้วัคซีนในกุ้งน้ำจืดออสเตรเลีย *Parachaeraps bicarinatus* พบว่าการฉีดวัคซีนที่เตรียมจาก *Pseudomonas* CP ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในกุ้งชนิดนี้ สามารถเพิ่มความต้านทานโรค จากการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *Pseudomonas* CP เมื่อทดลองฉีดวัคซีนที่เตรียมจากแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบหลายชนิดรวมทั้ง *Pseudomonas* CP แล้วเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย

*Pseudomonas* CP จะพบความต้านทานโรคเฉพาะกลุ่มที่ใช้วัคซีนที่เตรียมจากแบคทีเรียแกรมลบหลายชนิด รวมทั้ง *Pseudomonas* CP เทำนั้น ส่วนกลุ่มที่ใช้วัคซีนที่เตรียมจากแบคทีเรียแกรมบวกไม่พบความต้านทานโรค แสดงให้เห็นว่าความต้านทานโรคมีความจำเพาะเพียงบางส่วน

Stewart และ Zwicker (1972) พบว่า ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในน้ำเลือดกุ้งมังกร *Homarus americanus* สูงขึ้น เมื่อกระตุ้นด้วยเชื้อ *Pseudomonas perolens* ในรูปเซลล์ที่ตายแล้ว ซึ่งแยกได้จากลำไส้ กุ้งมังกร และเป็นสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรคในกุ้ง

Itami และคณะ (1994) ใช้บีตา-1,3-กลูแคน ที่สกัดจาก *Schizophyllum commune* ผสมในอาหารเลี้ยงกุ้ง *Penaeus japonicus* พบว่าประสิทธิภาพในการจับกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytic activity) ของเม็ดเลือด สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อใช้สารกระตุ้น 100 มก./กก. น้ำหนักกุ้ง/วัน เป็นเวลา 3 วัน หรือ 50 มก./กก. น้ำหนักกุ้ง/วัน เป็นเวลา 10 วัน และพบปัจจัยในน้ำเลือด ที่ช่วยกระตุ้นฟาโกไซโตซิส สูงขึ้นในกลุ่มที่ได้รับสารกระตุ้น

Itami และคณะ (1998) ศึกษาประสิทธิภาพของเปปทิโดไกลแคนจาก *Bifidobacterium thermophilum* ในกุ้ง *Penaeus japonicus* พบว่า กุ้งที่ได้รับอาหารผสมเปปทิโดไกลแคน จะมีความต้านทานโรคสูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเปปทิโดไกลแคนอย่างมีนัยสำคัญ หลังเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio penaeicida* และไวรัสก่อโรคดวงขาว เมื่อทดสอบประสิทธิภาพในการกลืนทำลายสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดพบว่า ฟาโกไซติก อินเด็กซ์ (phagocytic index) ในกุ้งที่ได้รับเปปทิโดไกลแคน มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

### การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ ( *in vivo* )

ในปัจจุบันมีการศึกษาการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำน้อยมาก ในปี ค.ศ. 1991 Itami และคณะ ได้ศึกษาพบว่า อัตราการรอดตายของลูกกุ้งกุลาดำวัยอ่อนระยะไซเอีย (zoea) สูงขึ้น และพบลูกกุ้งระยะไมซิส (mysis) ที่เริ่มเข้าระยะโพสลาวา (postlarvae) มีชีวิตรอดเพิ่มขึ้น เมื่อใช้เซลล์ *Vibrio* sp. NU-1 ที่ฆ่าด้วยฟอร์มาลินผสมอาหาร 0.05, 0.5 และ 5% ในรูป microencapsule

Sung และคณะ (1991) รายงานว่าการใช้แบคทีเรีย (bacterin เป็นคำแทน "วัคซีนที่ผลิตจากแบคทีเรียที่ฆ่าให้ตาย") ที่ผลิตจาก *V. vulnificus* ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำระยะ postlarvae-13 เป็นเวลา 83 วัน โดยแช่กุ้งในแบคทีเรียที่ความเข้มข้น 10% เป็นเวลา 2.5 ชม. พบว่าสามารถเพิ่มน้ำหนักตัว และความยาวของกุ้งได้

Adams (1991) แสดงให้เห็นประสิทธิภาพของ *V. alginolyticus* ที่ฆ่าให้ตายด้วยความร้อน ในการชักนำแบคทีเรียชนิดนี้ให้สูงขึ้นภายใน 1 วัน หลังการแช่กุ้งกุลาดำในวัคซีน 4 ชม. โดยที่แบคทีเรียชนิดนี้จะแสดงความจำเพาะต่อเชื้อเพียงบางส่วน

Sung และคณะ (1994) พบว่า การแช่กุ้งกุลาดำในสารแขวนลอยบีตา-กลูแคน เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ก่อนการเลี้ยงกุ้ง จะทำให้กุ้งมีความเจริญเติบโตสูงขึ้น และเมื่อเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. vulnificus* จะพบความต้านทานโรคสูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้แช่บีตา-กลูแคน ความเข้มข้นของบีตา-กลูแคนที่เหมาะสมในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันคือ 0.5 และ 1 มก./มล. ในการศึกษาครั้งนี้ บีตา-กลูแคน สามารถกระตุ้นความต้านทานโรคได้ในช่วงสั้น

จันทนา นิธิเมธาโชค (2539) ใช้เซลล์ *Clostridium butyricum* ที่ทำให้ตายด้วยฟอร์มาลิน เสริมลงในอาหาร และตรวจสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคในกุ้งกุลาดำ พบว่าการเสริม *C. butyricum* ในอาหาร จะช่วยเพิ่มความต้านทานต่อ *V. harveyi* โดยมีผลกระตุ้นการเกิดฟาโกไซโตซิส และแบคทีเรียชนิดนี้สูงขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

Sung และคณะ (1996) ทำการศึกษาในกุ้งกุลาดำ พบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ฟีนอลออกซิเดส และการสร้างซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน ( $O_2^-$ ) ในเลือดกุ้งกุลาดำสูงขึ้นอย่างรวดเร็วแต่คงอยู่ในช่วงเวลาดังกล่าว เมื่อกระตุ้นด้วยเซลล์ *Vibrio* ที่ทำให้ตายด้วยความร้อน บีตา-กลูแคน และ ไซโมแซน

ในงานวิจัยนี้ จะศึกษาผลของ *Bacillus* สายพันธุ์ S11 ต่อการเจริญเติบโต และการเสริมภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ โดยติดตามผลดังต่อไปนี้

1. การเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ ตรวจสอบ น้ำหนักตัว และการรอดชีวิต
2. การเสริมภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ ตรวจสอบ
  - 2.1 ภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์ ได้แก่
    - จำนวนเม็ดเลือดรวม ด้วยวิธีนับจำนวนเม็ดเลือดบนสไลด์นับเม็ดเลือด
    - กระบวนการฟาโกไซโตซิส ด้วยวิธีนับเม็ดเลือดที่เกิดฟาโกไซโตซิสบนสไลด์ ใช้เม็ดลาเท็กซ์เป็นสิ่งแปลกปลอม
    - ฟีนอลออกซิเดส ด้วยวิธีวัดการเกิดสีที่เกิดจากปฏิกิริยาทางเอนไซม์
  - 2.2 ภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยสารน้ำ ได้แก่
    - ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ด้วยวิธีหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง *V. harveyi* สายพันธุ์ D331

### บทที่ 3

#### อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

##### อุปกรณ์ที่สำคัญ

1. กล้องจุลทรรศน์ ( Microscope )
2. เครื่องเขย่าชนิดควบคุม ( Psychrotherm controlled )
3. เครื่องทำให้อุ่นภาคแตกโดยใช้คลื่นเสียง ( Sonicator )
4. เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ ( Refrigerated centrifuge ) รุ่น J 2- 21
5. เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ ( Refrigerated centrifuge ) รุ่น Kubota 1920
6. เครื่องผสมสาร ( Vortex mixer ) รุ่น G 560 E
7. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง ( Spectrophoto meter ) รุ่น spectronic 21
8. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง ( Spectrophoto meter ) รุ่น uv -160 A
9. เครื่องวัดค่า พี เอช ( pH meter )
10. เครื่องวัดค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำ ( DO meter )
11. ตู้บ่มเชื้อ ( Incubator ) รุ่น R 0-8
12. ตู้อบแห้ง ( Hot air oven )
13. สไลด์นับเม็ดเลือด ( Hemacytometer หรือ Neubauer counting chamber )
14. หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ ( Autoclave ) รุ่น HA -36
15. อ่างน้ำปรับอุณหภูมิ ( Water bath )

##### อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทริปติกซอย (Tryptic soy agar ; TSA)
2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งไทโอซัลเฟตซิเตรทบายซอลท์ซูโครส (Thiosulfate citrate bile salt sucrose agar ; TCBS)
3. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปติกซอย (Tryptic soy broth ; TSB)
4. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเบรอนฮาร์ทอินฟิวชัน (Brain heart infusion broth ; BHI)

## จุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย

### 1. *Bacillus* สายพันธุ์ S11

เป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติก แยกและคัดเลือกสายพันธุ์จากลำไส้กุ้งกุลาดำที่มีสุขภาพดี โดยวรรณิกา เพี้ยนนักตร์ (2539) ใช้สำหรับเตรียมเซลล์เพื่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

### 2. *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ D331

ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์ค้นคว้าวิจัยการเลี้ยงกุ้งเครื่องเจริญโภคภัณฑ์ ใช้สำหรับทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (antibacterial activity) ในพลาสมากุ้งและทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค (challenge test) ในการเพาะเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 1

### 3. *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 1526

ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์ค้นคว้าวิจัยการเลี้ยงกุ้งเครื่องเจริญโภคภัณฑ์ ใช้สำหรับทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค ในการเพาะเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 2

## วิธีดำเนินการวิจัย

### 1. การเตรียม *Bacillus* สายพันธุ์ S11 ที่มีสมบัติเป็นโพรไบโอติก

เลี้ยง *Bacillus* สายพันธุ์ S11 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริบิติกชอย (ภาคผนวก ก. ข้อ 2.) บนเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิ 30 °C ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นแยกเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที นำเซลล์สดที่แยกได้ไปใช้ผสมอาหารกุ้งกุลาดำสำเร็จรูป (ภาคผนวก ก. ข้อ 14)

### 2. การเตรียมอาหารกุ้งกุลาดำผสม *Bacillus* สายพันธุ์ S11 ที่มีสมบัติเป็นโพรไบโอติก

นำเซลล์สด *Bacillus* สายพันธุ์ S11 จากข้อ 1 ผสมกับอาหารกุ้งกุลาดำในอัตราส่วน 1:3 โดยใช้เซลล์สด *Bacillus* สายพันธุ์ S11 1 ส่วนต่ออาหารกุ้งกุลาดำ 3 ส่วน (วรรณิกา เพี้ยนนักตร์, 2539) คลุกให้เข้ากันดี และทำให้อาหารแห้งขึ้นโดยบ่มในตู้อบ 37 °C ประมาณ 1-2 ชม. กระจายไม่ให้อาหารติดเป็นก้อน เก็บใส่ภาชนะที่สะอาดในตู้เย็น

ตรวจนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในอาหารกุ้งกุลาดำ จำนวน *Bacillus* สายพันธุ์ S11 ที่ผสมในอาหารกุ้งกุลาดำทันที และในระหว่างการจัดเก็บ โดยวิธี total plate counts

### 3. การเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำเป็นเวลา 90 วัน เพื่อทดสอบผลโพรไบโอติกต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรค

#### 3.1 การเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำครั้งที่ 1

กุ้งกุลาดำระยะวัยรุ่นจากบ่อเลี้ยงกุ้งจังหวัดจันทบุรี น้ำหนักตัว 6-7 กรัม จำนวน 320 ตัว นำมาเลี้ยงในบ่อพลาสติกกลม บรรจุน้ำเค็ม 26 ส่วนในพันส่วน ประมาณ 150 ลิตร ปล่อยกุ้ง 20 ตัวต่อบ่อ ให้อากาศตลอดเวลา ปรับสภาพกุ้งให้คุ้นเคยกับสภาพบ่อทดลองเป็นเวลา 7 วัน ก่อนทำการทดลอง การทดลองแบ่งเป็น 2 กลุ่มคือ

1. กลุ่มควบคุม (Control) คือกลุ่มที่ให้อาหารกุ้งสำเร็จรูปโดยไม่ผสมเซลล์ *Bacillus* สายพันธุ์ S11
2. กลุ่มที่ให้อาหารกุ้งสำเร็จรูปผสมเซลล์สด *Bacillus* สายพันธุ์ S11

แต่ละกลุ่มมี 8 บ่อ ( 8 ซ้ำ ) ให้อาหาร 3 เวลาต่อวัน ปริมาณที่ให้ต่อวันประมาณ 6 % ของน้ำหนักตัว (ภาคผนวก ค) ระบบเลี้ยงกุ้งเป็นระบบแบบปิดประกอบด้วยระบบกรองชีวภาพอยู่ในบ่อเลี้ยง

#### 3.2 การเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำครั้งที่ 2

กุ้งกุลาดำระยะ postlarvae จากบ่อเลี้ยงกุ้งจังหวัดฉะเชิงเทรา น้ำหนักตัว 0.1-0.3 กรัม จำนวน 240 ตัว นำมาเลี้ยงในบ่อปูนซีเมนต์ขนาด 80x74x87 ลูกบาศก์เซนติเมตร บรรจุน้ำเค็ม 26 ส่วนในพันส่วน ประมาณ 400 ลิตร ปล่อยกุ้ง 40 ตัวต่อบ่อ ให้อากาศตลอดเวลา ปรับสภาพกุ้งให้คุ้นเคยกับสภาพบ่อทดลองเป็นเวลา 7 วัน ก่อนทำการทดลอง การทดลองแบ่งเป็น 2 กลุ่มเช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำครั้งที่ 1 (ข้อ 3.1)

แต่ละกลุ่มทำ 3 ซ้ำ (3 บ่อ) ให้อาหาร 3 เวลาต่อวัน ปริมาณที่ให้ต่อวันประมาณ 10 % ของน้ำหนักตัว (ภาคผนวก ค) ระบบเลี้ยงกุ้งเป็นระบบหมุนเวียนแบบปิด ระบบกรองชีวภาพแยกกับระบบเลี้ยง

การเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำครั้งที่ 1 และ 2 จะทำการศึกษาเหมือนกันทุก 30 วัน ดังนี้

1. การรอดชีวิต ( % )
2. น้ำหนักตัวกุ้งกุลาดำ ( กรัม )
3. จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด *Bacillus* สายพันธุ์ S11 และ *Vibrio* spp. ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำโดยวิธี

Total plate counts

4. จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด *Bacillus* สายพันธุ์ S11 และ *Vibrio* spp. ในซีกุ้งกุลาดำโดยวิธี

Total plate counts

5. จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด *Bacillus* สายพันธุ์ S11 และ *Vibrio* spp. ในลำไส้กุ้งกุลาดำโดยวิธี

Total plate counts



จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และ *Bacillus* สายพันธุ์ S11 ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทริปติกชอย (ภาคผนวก ก ข้อ 1.) ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 2% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ส่วน *Vibrio* spp. ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งไทโอซัลเฟตซีเตรทบายซอลท์ซูโครส (ภาคผนวก ก ข้อ 5.)

6. ศึกษาภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์ และสารน้ำในน้ำเลือดกึ่งกลูตาต้า

7. ตรวจสอบคุณภาพน้ำระหว่างการเลี้ยงกึ่งกลูตาต้า ทุกสัปดาห์ดังนี้

- แอมโมเนียม ( $\text{NH}_4^+$ ) ใช้ Ammonium test kit บริษัท Merck, Germany
- ไนเตรท ( $\text{NO}_2^-$ ) ใช้ Nitrite test kit บริษัท Merck, Germany
- ฟอสเฟต ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) ใช้ Phosphate test kit บริษัท Merck, Germany
- อุณหภูมิ ใช้ Thermometer
- ค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (DO) ใช้ DO meter
- พีเอช (pH) ใช้ pH meter
- ความเค็ม ใช้ Salinometer

#### 4. การศึกษาภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์และสารน้ำ

##### 4.1 การนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดรวมของกึ่ง (total hemocyte count)

เจาะเลือดกึ่ง 100 ไมโครลิตร ผสมกับอาหารเลี้ยงเม็ดเลือด MC -199 (อาหารเลี้ยงเม็ดเลือด M-199 ที่มี L-cysteine เป็นสารป้องกันเลือดแข็งตัว) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ หยดน้ำเลือด 100 ไมโครลิตร บนสไลด์นับเม็ดเลือด (hemacytometer) นับจำนวนเม็ดเลือดทั้งหมดด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า

##### 4.2 การศึกษากระบวนการกลืนทำลายหรือฟาโกไซโตซิส ( phagocytosis )

เจาะเลือดกึ่ง 100 ไมโครลิตร ผสมกับอาหารเลี้ยงเม็ดเลือด MC -199 (ภาคผนวก ก ข้อ 13.) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2,500 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที ปั่นล้างเม็ดเลือดด้วยอาหารเลี้ยงเม็ดเลือด M-199 (ภาคผนวก ก ข้อ 12.) และปรับเม็ดเลือดให้ได้ประมาณ  $10^7$  เซลล์/มล. หยดเม็ดเลือดปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงบนสไลด์ที่สะอาด เติมเม็ดลาเท็กซ์ (latex beads) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.094 ไมครอน (ที่เจือจางให้ได้  $10^8$  เม็ด/มล. ในอาหารเลี้ยงเม็ดเลือด M-199) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับเม็ดเลือดบนสไลด์ บ่มในภาชนะขึ้นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เติมน้ำละลายกลูตารัลดีไฮด์ 2.5% (ภาคผนวก ข ข้อ 3.) ปริมาณ 50 ไมโครลิตร เพื่อตรึงเซลล์บนสไลด์ เป็นเวลา 5 นาที ล้างเซลล์ที่ไม่เกาะติดกับสไลด์ออกด้วยอาหารเลี้ยงเม็ดเลือด M-199 นำแผ่นสไลด์ไปย้อมด้วยสี Diff-Quick ตรวจสอบการเกิดฟาโกไซโตซิสภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า นับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดทั้งหมด 200 เซลล์ โดยเซลล์ที่เกิดฟาโกไซโตซิสจะมีเม็ดลาเท็กซ์อยู่ในเซลล์เม็ดเลือด (ดัดแปลงจาก Itami และคณะ, 1994) นำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์ฟาโกไซโตซิส (%phagocytosis) ฟาโกไซติก อินดิเคซ (phagocytic

index ; PI) และจำนวนเม็ดลาเท็กซ์ที่ถูกกินต่อเซลล์ (average number of the beads ingested per cell ; ABPC)

$$\% \text{ phagocytosis} = \frac{\text{จำนวนเซลล์เม็ดเลือดที่มีการกินเม็ดลาเท็กซ์}}{\text{จำนวนเซลล์เม็ดเลือดทั้งหมดที่สังเกต}} \times 100$$

$$\text{PI} = \frac{\text{จำนวนเม็ดลาเท็กซ์ที่ถูกกิน}}{\text{จำนวนเซลล์เม็ดเลือดทั้งหมดที่สังเกต}} \times \frac{\text{จำนวนเซลล์เม็ดเลือดที่มีการกินเม็ดลาเท็กซ์}}{\text{จำนวนเซลล์เม็ดเลือดทั้งหมดที่สังเกต}} \times 100$$

$$\text{ABPC} = \frac{\text{จำนวนเม็ดลาเท็กซ์ที่ถูกกิน}}{\text{จำนวนเซลล์เม็ดเลือดที่มีการกินเม็ดลาเท็กซ์}}$$

### 4.3 การหาปริมาณฟีนอลออกซิเดส

#### 4.3.1 การเตรียมส่วนใสเซลล์เม็ดเลือดแดง (hemocyte lysate supernatant ; HLS)

เจาะเลือดกุ้ง 100 ไมโครลิตร ผสมกับอาหารเลี้ยงเม็ดเลือด MC-199 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2,500 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที ปั่นล้างเม็ดเลือดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ cacodylate(CAC) (ภาคผนวก ข ข้อ 1.) ที่เย็นจัด ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เก็บและละลายตะกอนเม็ดเลือดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ CAC ที่เย็นจัดปริมาตร 500 ไมโครลิตร หลังจากนั้นทำให้เม็ดเลือดแตกด้วยเครื่องทำให้อนุภาคแตกโดยใช้คลื่นเสียง (Sonicator) 3 วินาที ปั่นเหวี่ยงที่ 15,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 20 นาที แยกส่วนน้ำใส HLS นำไปทดสอบฟีนอลออกซิเดสทันที (Smith และ Söderhäll, 1991)

#### 4.3.2 การวิเคราะห์ฟีนอลออกซิเดส

ใช้ HLS ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายทริปซิน 0.1% (trypsin 0.1% ในสารละลายบัฟเฟอร์ CAC, เตรียมก่อนใช้ทุกครั้ง) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที หลังจากนั้นผสมสารละลายแอล-ไดไฮดรอกซีฟีนิลอะลานีน 0.3% (L-dihydroxyphenylalanine หรือ L-DOPA 0.3% ในสารละลายบัฟเฟอร์ CAC, เตรียมก่อนใช้ทุกครั้ง) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ CAC 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร ทันทีหลังผสมให้เข้ากัน (เวลาที่ 0 นาที) และวัดอีกครั้งที่ 1 นาที โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ CAC แทน HLS ตามขั้นตอนข้างต้น เป็น blank (Smith และ Söderhäll, 1991)

หนึ่งหน่วยของเอนไซม์ = ค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้น 0.001 / 1 นาที / มก. โปรตีน

### 4.3.3 การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Bradford

ปิเปต HLS 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมน้ำยาทดสอบโปรตีน (ภาคผนวก ข ข้อ 4.) 5 มล. ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร ภายใน 1 ชม. โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ CAC แทน HLS ตามขั้นตอนข้างต้น เป็น blank (Bradford, 1976) และคำนวณโปรตีนเป็น มก./มล. เทียบกับเส้นกราฟโปรตีนมาตรฐาน (ภาคผนวก ง )

## 4.4 การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (antibacterial activity) ในพลาสมากุ้ง

### 4.4.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียทดสอบ

เพาะเลี้ยง *V. harveyi* สายพันธุ์ D331 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเบรนฮาดอินฟิวชัน (ภาคผนวก ก ข้อ 4.) ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) บ่มที่ 37 °ซ ให้อยู่ในช่วง log phase ปรับค่า OD 660 นาโนเมตร ให้ความเข้มข้น  $10^4$  CFU/ml โดยเทียบกับ กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง OD 660 นาโนเมตรกับจำนวน *V. harveyi* สายพันธุ์ D331 (ภาคผนวก จ) นำไปปั่นเหวี่ยง 10,000 รอบ/นาที ที่ 4 °ซ 15 นาที ปั่นล้างด้วยสารละลาย 2% โซเดียมคลอไรด์ ที่ปราศจากเชื้อ 1 ครั้ง เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 2% ปริมาตรเท่าเดิมเพื่อปรับให้ได้  $10^4$  CFU/ml

### 4.4.2 การหาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในพลาสมากุ้ง

เจาะเลือดกุ้ง 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย Van Harrevald's salt (Van Harrevald, 1936) (ภาคผนวก ข ข้อ 2.) 1.4 มล. ปั่นเหวี่ยงแยกเม็ดเลือด 11,000 รอบ/นาที ที่ 4 °ซ 10 นาที เก็บส่วนพลาสมาไปกรองผ่านแผ่นกรอง (millipore membrane filter) ขนาด 0.45 ไมครอน นำส่วนพลาสมาที่ปราศจากเชื้อ 100 ไมโครลิตร บ่มกับ *V. harveyi* สายพันธุ์ D331 ที่เตรียมไว้ในข้อ 4.4.1 ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ที่ 37 °ซ เป็นเวลา 1 ชม. หลังจากนั้นปิเปต 50 ไมโครลิตร ไป spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งไทโอสัลเฟตซีเตรทบายซอลท์ซูโครส นำไปบ่มที่ 37 °ซ 24 ชั่วโมง นับจำนวน *V. harveyi* สายพันธุ์ D331 เป็น CFU และคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (% inhibition) ใช้สารละลาย Van Harrevald's salt บ่มกับ *V. harveyi* สายพันธุ์ D331 แทนพลาสมากุ้งเพื่อใช้เป็นตัวควบคุมผลบวก (Adams, 1991)

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = 100 - \frac{\text{CFU พลาสมา}}{\text{CFU ตัวควบคุมผลบวก}} \times 100$$

## 5. การหาค่าความเข้มข้นที่ทำให้กุ้งตาย 50% (50% lethal concentration ; LC<sub>50</sub>)

### 5.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียทดสอบ

เพาะเลี้ยง *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริบติคชอยที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) บนเครื่องเขย่าที่ 30 °C ความเร็ว 200 รอบ/นาที เวลา 18-24 ชม. หลังจากนั้นปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 8,000 รอบ/นาที ที่ 4 °C เวลา 15 นาที เก็บเซลล์สด และหาจำนวน *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 ในเซลล์สด 1 กรัม ด้วยวิธี Total plate count โดยใช้อาหารแข็งไทโอซัลเฟตซีเตรทบายซอลท์ซูโครส เพื่อใช้คำนวณจำนวน *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 ที่ต้องการเติมในน้ำเลี้ยงกุ้ง

### 5.2 ทดสอบหาค่าความเข้มข้นที่ทำให้กุ้งตาย 50 % (Greenberg และคณะ, 1992)

กุ้งกุลาดำจำนวน 180 ตัว น้ำหนักเฉลี่ย 0.77 กรัม แบ่งเลี้ยงในถังพลาสติกที่บรรจุน้ำเค็ม 26 ส่วนในพันส่วน ปริมาตร 7.5 ลิตร ให้อากาศตลอดเวลา ถึงละ 10 ตัว จำนวน 18 ถัง แยกเป็น 6 กลุ่มๆละ 3 ซ้ำ เติม *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 ที่เตรียมจากข้อ 5.1 ลงในน้ำเลี้ยงกุ้งปรับให้มีความเข้มข้นต่างกัน 5 ระดับใน 5 กลุ่มทดลอง และอีก 1 กลุ่มเป็นกลุ่มควบคุมไม่มีการเติม *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 เก็บตัวอย่างน้ำจากทุกถังหลังจากเติม *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 เพื่อหาจำนวน *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 ที่แน่นอนในน้ำ ด้วยวิธี Total plate count โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งไทโอซัลเฟตซีเตรทบายซอลท์ซูโครส

ตลอดการทดลองกุ้งทุกกลุ่มการทดลองจะได้อาหารสำเร็จรูปชนิดเดียวกันจำนวน 3 เวลาต่อวัน บันทึกจำนวนกุ้งที่ตายในแต่ละกลุ่มที่เวลา 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง (Chen และคณะ, 1996) นำข้อมูลไปคำนวณหา LC<sub>50</sub> โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ โพรบิทอสนาลิซิส (probit analysis)

## 6. การทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค (challenge test)

เตรียม *V. harveyi* สายพันธุ์ D331 และ 1526 ตามวิธีในข้อ 5.1 ปรับ *V. harveyi* ให้มีความเข้มข้น  $1 \times 10^7$  CFU/ml ในน้ำเลี้ยงกุ้ง ใช้กุ้งจำนวน 30-35 ตัวที่เหลือจากการเพาะเลี้ยงระยะเวลา 90 วัน ทั้งสองกลุ่มการทดลอง ทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค 10 วัน ติดตามผลการทดลองดังนี้

1. การตายสะสม (cumulative mortality) ติดตามผลทุกวัน
2. จำนวน *Bacillus* สายพันธุ์ S11 และ *V. harveyi* ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ด้วยวิธี Total plate count ติดตามผลทุก 2 วัน
3. จำนวน *Bacillus* สายพันธุ์ S11 และ *V. harveyi* ในลำไส้กุ้งกุลาดำ ด้วยวิธี Total plate count ติดตามผลทุก 2 วัน

จำนวน *Bacillus* สายพันธุ์ S11 ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทริบติคชอย ส่วน *V. harveyi* ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งไทโอซัลเฟตซีเตรทบายซอลท์ซูโครส

## 7. การทดสอบหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค

สุ่มตัวอย่างกึ่งกุลาดำที่ตาย (กลุ่มการทดลองละ 10 ตัว) มาทดสอบยืนยันผลว่ากึ่งตายเนื่องจาก *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 นำเฮปพาโทแพนแครีส (hepatopancreas) กึ่งกุลาดำที่ตาย ลำไส้กึ่ง และ น้ำเลี้ยงกึ่งระหว่างการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค ไปเพาะหาเชื้อแบคทีเรียบนอาหารแข็งไทโอสัลเฟตซีเตรทบายซอลท์ ซูโครส บ่มที่ 37 °ซ เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง แยกโคโลนีให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ นำไปทดสอบลักษณะทางชีวเคมี พร้อมกับ *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 เพื่อจำแนกว่าเป็น *V. harveyi* ตามการจำแนกใน Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Baumann และ Schubert, 1986) โดยตรวจสอบลักษณะรูปร่าง และชีวเคมี และการติดสีแกรม

### ลักษณะรูปร่างและชีวเคมี

#### การติดสีแกรม

นำแบคทีเรียที่เจริญในอาหารแข็งไทโอสัลเฟตซีเตรทบายซอลท์ซูโครสมาย้อมดูการติดสีแกรม (ภาคผนวก ข ข้อ 5.-8.) ดูรูปร่างและการจัดเรียงตัวของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์

#### การทดสอบการเคลื่อนที่

ปลูกเชื้อลงบนอาหารทดสอบการเคลื่อนที่ (Motility test medium) (ภาคผนวก ก ข้อ 6.) ที่เติม โซเดียมคลอไรด์ 1% โดยแทงเข็มเขี่ยเชื้อลงไปจนสุดหลอดทดสอบ บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ ถ้าเชื้อสามารถเคลื่อนที่ได้จะมีรอยการเจริญออกจากรอยที่แทงไว้

#### การสร้างออกซิเดส

หยดสารละลายเตตระเมทิลพาราฟีนิลไดเอมีนไดไฮโดรคลอไรด์ (Tetramethyl paraphenyl diamine dihydrochloride) เข้มข้น 1% (ภาคผนวก ข ข้อ 9.) ลงบนกระดาษกรองจนชุ่มแล้วใช้หลอดพลาสติกเขี่ยเชื้อจากอาหารแข็งทริปติกชอย ป้ายบนกระดาษกรอง ถ้าเกิดสีม่วงขึ้นภายใน 10 วินาที แสดงว่า ผลเป็นบวก สีที่เกิดขึ้นเนื่องจากแบคทีเรียมีการสร้างไซโตโครมออกซิเดส (Cytochrome oxidase) โดย N,N,N,N-Tetramethyl-p-phenylene-diamine dihydrochloride ถูกออกซิไดส์โดย oxidized cytochrome c จะเกิดสีม่วงของ Wurster's blue ถ้าไม่เกิดสีม่วง แสดงว่า แบคทีเรียไม่สร้างเอนไซม์ Cytochrome oxidase

### การทดสอบการสร้างอินโดล

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารเหลวทริปโตเฟน (Tryptophane broth) (ภาคผนวก ก ข้อ 7.) ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 1% บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 24 ชม. ทดสอบการสร้างอินโดลโดยหยดสารละลายโคแควคส์ (Kovac's reagent) (ภาคผนวก ข ข้อ 10.) 1-2 หยด ถ้าเกิดสีชมพูแสดงว่าเชื้อสร้างเอ็นไซม์ทริปโตฟานเนส (Tryptophanase) ย่อยสลายทริปโตเฟนในอาหารเลี้ยงเชื้อได้อินโดล ถ้าไม่เกิดสีแสดงว่าผลเป็นลบ

### การใช้ไนเตรท

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารเหลวไนเตรท (Nitrate broth) (ภาคผนวก ก ข้อ 8.) ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 1% บ่มที่ 37 °C เวลา 24 ชม ตรวจสอบไนเตรทที่เกิดขึ้นโดยการเติมกรดซัลฟานิลิก (Sulfanilic acid) 2-3 หยด และแอลฟาแนฟทิลลามีน ( $\alpha$ -Naphthylamine) (ภาคผนวก ข ข้อ 12.) ลงไปตามลำดับ ถ้าเกิดสีแดงภายใน 30 วินาที ให้ผลเป็นบวก สีแดงที่เกิดขึ้น เนื่องจากไนเตรทที่เกิดขึ้น ทำปฏิกิริยากับกรดซัลฟานิลิก ได้สารประกอบประเภทเกลือไดอะโซเนียม (Diazonium) และเกลือที่ได้นี้จะรวมตัวกับแอลฟาแนฟทิลลามีน ทำให้เกิดสีแดงของอะโซดาย (Azodye) ที่ละลายน้ำได้ แต่ถ้าไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงให้ผลเป็นลบ บางครั้งไนเตรทที่เกิดขึ้นทั้งหมดจะถูกเปลี่ยนเป็นแอมโมเนีย อาหารจึงไม่เปลี่ยนสี ดังนั้นจึงต้องใส่ผงสังกะสีลงไปทดสอบ ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีแดง เนื่องจากสังกะสีไปดึงออกซิเจนจากไนเตรทให้กลายเป็นไนไตรท์ แสดงว่าเชื้อไม่สามารถใช้ไนเตรทได้ให้ผลเป็นลบ ถ้าไม่เกิดสีแดง แสดงว่าไนเตรทเปลี่ยนเป็นแอมโมเนียหมดจึงให้ผลเป็นบวก

### การทดสอบเมทิลคาร์บินอล (Voges proskauer test)

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มอาร์-วีพี (ภาคผนวก ก ข้อ 9.) ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 1% บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 24 ชม. ทดสอบโดยเติมแอลฟาแนฟทอล ( $\alpha$ -Naphthol) 5% ปริมาตร 0.3 มล. (ภาคผนวก ข ข้อ 11.) แล้วจึงใส่สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 40% ปริมาตร 0.2 มล. เขย่าให้ผสมกัน ถ้ามีสีแดงเกิดขึ้นภายใน 10 นาที หรือ 24 ชม. แสดงว่าแบคทีเรียมีการผลิตอะซิโตอิน (Acetoin) จากวัฏจักรบิวทีรีนไกลคอล (Butylene glycol pathway) ซึ่ง 40 % โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์จะเปลี่ยนกลับให้อะซิโตอินกลายเป็นไดอะซิติก (Diacetyl) และเกิดสารประกอบสีแดง โดยการเร่งปฏิกิริยาของแอลฟาแนฟทอล ให้บันทึกผลเป็นบวก ถ้าไม่เกิดสีแดงให้ผลเป็นลบ

### การใช้ซิเตรท

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารซิมมอนส์ซิเตรท (Simmon's citrate agar) (ภาคผนวก ก ข้อ 11.) ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 1% บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 2-7 วัน เชื้อที่สามารถใช้ซิเตรทได้จะเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์ในอาหารจากสีเขียวกลายเป็นสีน้ำเงิน เนื่องจากเชื้อสามารถใช้โซเดียมซิเตรทเป็นแหล่งคาร์บอนและใช้

แอมโมเนียมฟอสเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนได้แอมโมเนียที่มีสมบัติเป็นเบส ทำให้บรอมไซมอลบลูเปลี่ยนจากสีเขียวกลายเป็นสีน้ำเงิน ถ้าเชื้อไม่สามารถใช้ไซโตเดียมซีเตรทได้อาหารเลี้ยงเชื้อจะมีสีเขียวเหมือนเดิม

การทดสอบความสามารถในการทนเกลือ

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริเพตริยท์ที่เติมไซโตเดียมคลอไรด์ 0-10 % บ่มที่ 37 °ซ เป็นเวลา 24 ชม. ตรวจสอบการเจริญของเชื้อโดยดูความขุ่นของเชื้อที่ขึ้นในอาหาร ถ้าเชื้อเจริญเกิดความขุ่นให้ผลเป็นบวก ถ้าไม่เจริญให้ผลเป็นลบ

การทดสอบความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทริเพตริยท์ที่เติมไซโตเดียมคลอไรด์ 1% บ่มที่ 4-40 °ซ เป็นเวลา 24 ชม. ตรวจสอบการเจริญของเชื้อตามรอยเชื้อเชื้อ ถ้าเชื้อเจริญให้ผลเป็นบวก ถ้าไม่เจริญให้ผลเป็นลบ

การทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาล

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทดสอบการใช้น้ำตาล (ภาคผนวก ก ข้อ 10.) ที่เติมไซโตเดียมคลอไรด์ 1% บ่มที่ 37 °ซ เป็นเวลา 18-24 ชม. สังเกตการสร้างกรด ถ้าเชื้อสามารถใช้คาร์โบไฮเดรตได้จะสร้างกรด ทำให้อินดิเคเตอร์บรอมไซมอลบลูในอาหารเปลี่ยนสีจากสีเขียวเป็นสีเหลืองให้ผลเป็นบวก ถ้าไม่เปลี่ยนสีให้ผลเป็นลบ

## 8. วิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูลแต่ละการทดลอง

โดยใช้ Duncan 's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ผลการทดลอง

## 1. การเลี้ยงกุ้งกุลาดำครั้งที่ 1

## 1.1 ผลของโพรไบโอติกต่อการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ

นำ *Bacillus* สายพันธุ์ S11 ผสมอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำเป็นเวลา 90 วัน แบ่งเป็น 2 กลุ่ม (แต่ละกลุ่มทำการทดลอง 8 ซ้ำ) คือ

-กลุ่มควบคุม ให้อาหารกุ้งกุลาดำสำเร็จรูปโดยไม่ผสม *Bacillus* สายพันธุ์ S11

-กลุ่มโพรไบโอติก ให้อาหารกุ้งกุลาดำสำเร็จรูปผสม *Bacillus* สายพันธุ์ S11

ก่อนเริ่มต้นการเลี้ยงกุ้งได้ตรวจสอบแบคทีเรียทั้งหมดในอาหารกุ้งกุลาดำสำเร็จรูปพบว่า มีจำนวนแบคทีเรียนับได้  $5.0 \times 10^2$  CFU/g หลังจากนั้นอาหารกุ้งผสม *Bacillus* สายพันธุ์ S11 เพื่อเตรียมอาหารกุ้งที่มีโพรไบโอติกพบว่าจำนวน *Bacillus* สายพันธุ์ S11  $4.69 \times 10^{10}$  CFU/g โดยจำนวน *Bacillus* สายพันธุ์ S11 จะลดลงไม่ถึงครึ่ง log cycle เมื่อเก็บที่ 4<sup>o</sup> ซ เป็นเวลา 90 วัน (ขณะเลี้ยงกุ้งจะเตรียมอาหารผสม *Bacillus* สายพันธุ์ S11 ให้ใช้หมดภายใน 3 วัน) และตรวจไม่พบ *Vibrio* spp. ทั้งในอาหารกุ้งที่ผสมและไม่ผสม *Bacillus* สายพันธุ์ S11 (ดังแสดงผลในตารางที่ 5.)

กุ้งกุลาดำระยะวัยรุ่นเริ่มต้นเลี้ยงที่น้ำหนัก 6-7 กรัม ในบ่อพลาสติกกลม มีระบบหมุนเวียนน้ำแบบปิด เป็นเวลา 90 วัน พบว่าน้ำหนักตัวกุ้งกุลาดำ และการรอดชีวิตของกลุ่มโพรไบโอติกสูงกว่ากลุ่มควบคุมแต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ภาคผนวก ข) แสดงผลในรูปที่ 4. คุณภาพน้ำของทั้งสองกลุ่มมีค่าใกล้เคียงกันและอยู่ในช่วงที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของกุ้ง แสดงผลในตารางที่ 6. ผลเปรียบเทียบการนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด *Bacillus* สายพันธุ์ S11 และ *Vibrio* spp. ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (รูปที่ 5.) ซ้ำกุ้ง (รูปที่ 6.) และลำไส้กุ้งกุลาดำ (รูปที่ 7.) แสดงให้เห็นการเพิ่มจำนวน *Bacillus* สายพันธุ์ S11 ต่อเวลาในกลุ่มกุ้งที่ได้รับโพรไบโอติกจากอาหาร โดยตรวจไม่พบ *Bacillus* สายพันธุ์ S11 ในกลุ่มควบคุมในตัวอย่างประเภทเดียวกัน โดยทั่วไปในน้ำจากบ่อกุ้งทั้งสองกลุ่มการทดลองจะตรวจพบแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง  $4.09 \times 10^4$  -  $3.34 \times 10^5$  CFU/ml และ *Vibrio* spp. ตรวจพบอยู่ในช่วง  $3.60 \times 10^3$  -  $1.39 \times 10^4$  CFU/ml (รูปที่ 5.) ซ้ำกุ้งกุลาดำทั้งสองกลุ่มทดลองพบว่า มีแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง  $2.27 \times 10^9$  -  $1.91 \times 10^{12}$  CFU/g และ *Vibrio* spp. อยู่ในช่วง  $1.1 \times 10^7$  -  $9.09 \times 10^8$  CFU/g (รูปที่ 6.) ส่วนลำไส้กุ้งกุลาดำทั้งสองกลุ่มทดลองพบว่า มีแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง  $3.26 \times 10^6$  -  $1.74 \times 10^8$  CFU/g และ *Vibrio* spp. พบอยู่ในช่วง  $4.58 \times 10^5$  -  $1.61 \times 10^8$  CFU/g (รูปที่ 7.)



ตารางที่ 5. จำนวน *Bacillus* สายพันธุ์ S11 (CFU/g) ในอาหารกึ่งระหว่างการเก็บที่ 4 °ซ เป็นเวลา 90 วัน

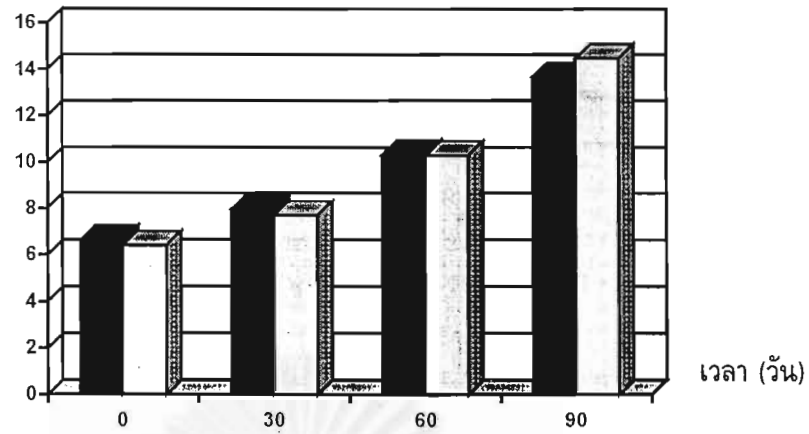
ชนิดอาหาร	ระยะเวลาเก็บที่ 4 °ซ				
	0 วัน	2 วัน	4 วัน	7 วัน	90 วัน
อาหารเม็ดสำเร็จรูป	-	-	-	-	-
อาหารเม็ดสำเร็จรูปผสม <i>Bacillus</i> สายพันธุ์ S11	$4.69 \times 10^{10}$	$4.78 \times 10^{10}$	$4.43 \times 10^{10}$	$1.39 \times 10^{10}$	$1.75 \times 10^{10}$

ตารางที่ 6. คุณภาพน้ำระหว่างการเลี้ยงกุ้งกุลาดำครั้งที่ 1 เป็นระยะเวลา 90 วัน (ตรวจสอบผลทุกสัปดาห์)

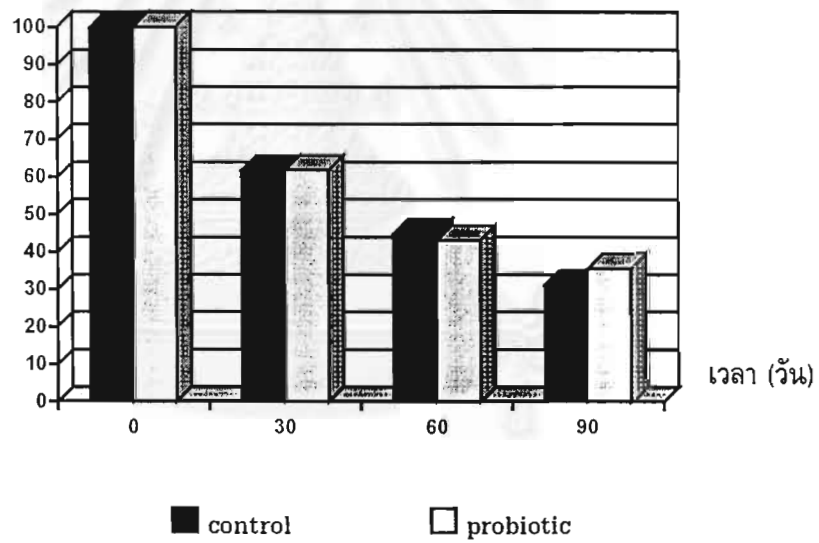
คุณภาพน้ำ	ช่วงค่าคุณภาพน้ำ (ต่ำสุด-สูงสุด)	
	กลุ่มควบคุม	กลุ่มโปรไบโอติก
แอมโมเนีย (มก./ลิตร)	0 - 0.56	0 - 0.28
ไนไตรท์ (มก./ลิตร)	0.1 - 2.5	0.1 - 2.5
ฟอสเฟต (มก./ลิตร)	8.0 - 22.5	8.0 - 26.3
อุณหภูมิ (°ซ)	25.7 - 31.7	25.6 - 31.7
ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (มก./ลิตร)	5.1 - 7.2	5.0 - 7.2
พีเอช	7.4 - 8.03	7.37 - 8.06
ความเค็ม (ส่วนในพันส่วน)	26 - 26.4	26 - 26.3

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

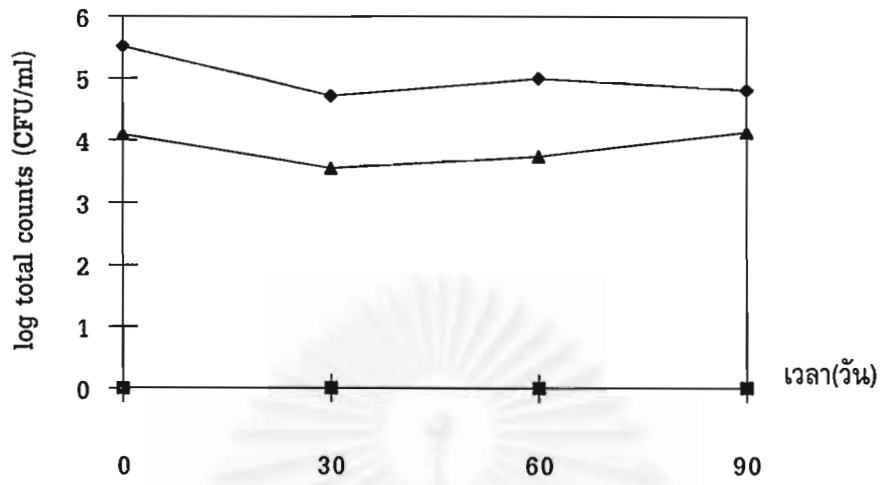
น้ำหนัก(กรัม)



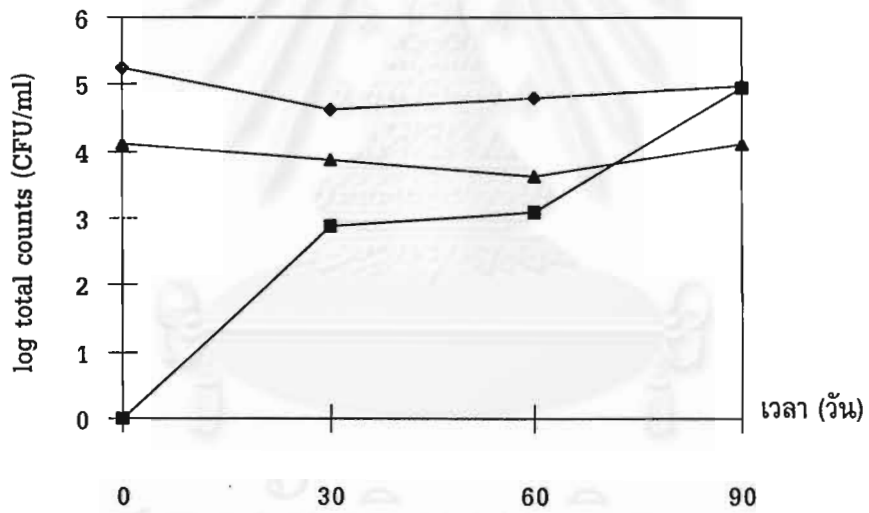
การรอดชีวิต (%)



รูปที่ 4. น้ำหนักตัว และการรอดชีวิตของกิ้งกูดดำกลุ่มโปรไบโอติก (probiotic) และ กลุ่มควบคุม (control) ระหว่างการเลี้ยงกิ้งครั้งที่ 1



ก

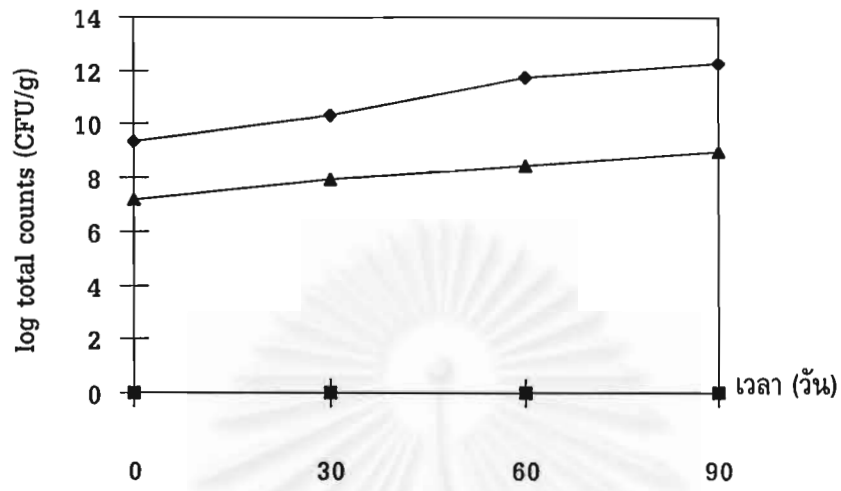


ข

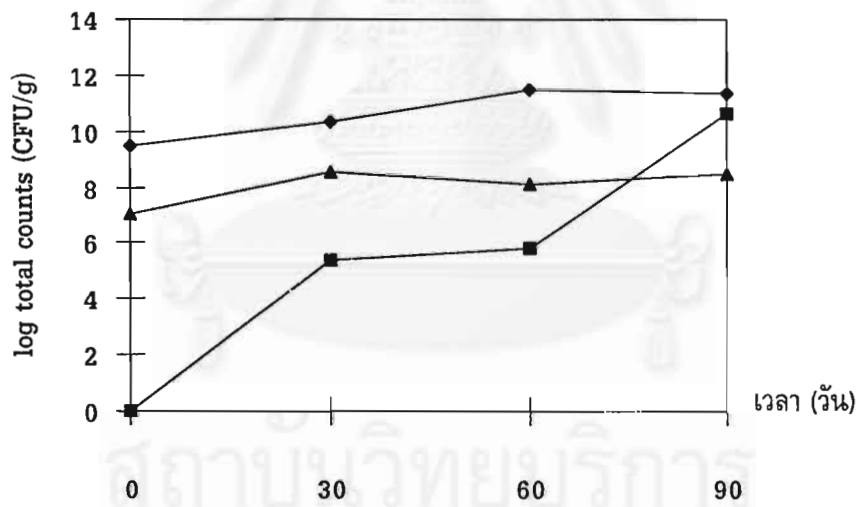
ก. กลุ่มควบคุม

ข. กลุ่มโพรไบโอติก

รูปที่ 5. จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (◆) *Bacillus* สายพันธุ์ S11 (■) และ *Vibrio* spp. (▲) ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำระหว่างการเลี้ยงกุ้ง ครั้งที่ 1. แต่ละจุดเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 8 ซ้ำ



ก

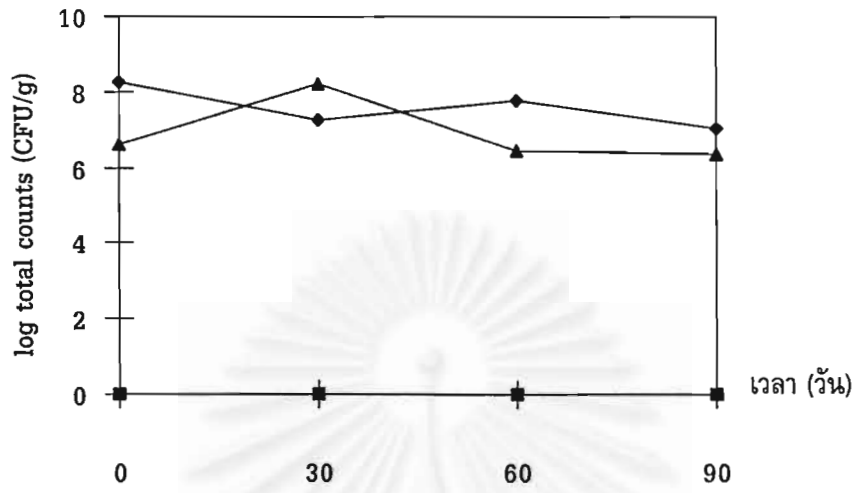


ข

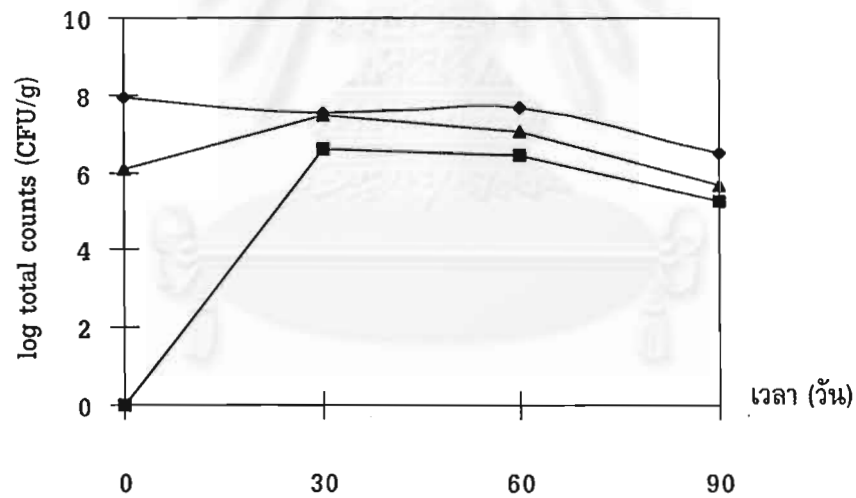
ก. กลุ่มควบคุม

ข. กลุ่มโพรไบโอติก

รูปที่ 6. จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (◆) *Bacillus* สายพันธุ์ S11 (■) และ *Vibrio* spp. (▲) ในซี่กุ้งกุลาดำระหว่างการเลี้ยงกุ้ง ครั้งที่ 1. แต่ละจุดเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 8 ซ้ำ



ก



ข

ก. กลุ่มควบคุม

ข. กลุ่มโพรไบโอติก

รูปที่ 7. จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (◆) *Bacillus* สายพันธุ์ S11 (■) และ *Vibrio* spp. (▲) ในลำไส้กุ้งกุลาดำระหว่างการเลี้ยงกุ้ง ครั้งที่ 1. แต่ละจุดเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 8 ซ้ำ

## 1.2 ผลของไฟโรไบโอติกต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรค

จำนวนเม็ดเลือดรวมของกึ่งกลุ่มไฟโรไบโอติกหลังการเพาะเลี้ยง 90 วัน มีจำนวน  $4.64 \times 10^7$  เซลล์/มล. สูงกว่ากลุ่มควบคุม 2.3 เท่า แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ(ภาคผนวก ข) แสดงผลในตารางที่ 7.

ความสามารถในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมโดยวิธีฟาโกไซโตซิสจะใช้ค่า เปอร์เซนต์ฟาโกไซโตซิส, ฟาโกไซติก อินดิเคซ์ (PI) และจำนวนเม็ดลาเท็กซ์ที่ถูกกินต่อเซลล์ (ABPC) เป็นตัวบ่งชี้ พบว่า เปอร์เซนต์ฟาโกไซโตซิส ของกลุ่มไฟโรไบโอติกสูงกว่ากลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ในวันที่ 60 ของการเพาะเลี้ยง แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ในวันที่ 30 และ 90 วันของการเพาะเลี้ยง (ภาคผนวก ข) แสดงผลในตารางที่ 8. เซลล์ที่เกิดฟาโกไซโตซิส แสดงในรูปที่ 8.

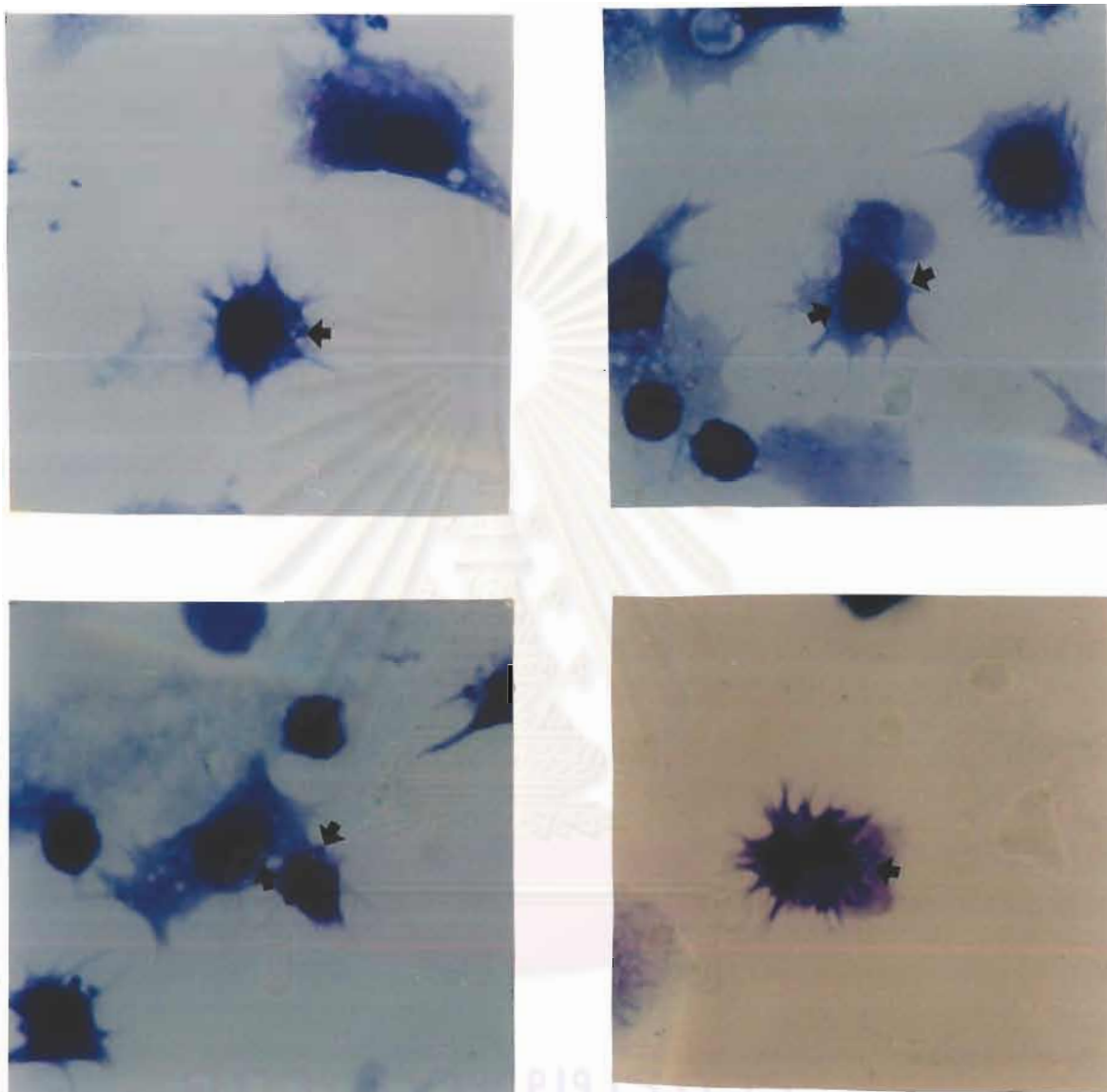
ฟาโกไซติก อินดิเคซ์ (PI) ของกลุ่มไฟโรไบโอติกสูงกว่ากลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ในวันที่ 60 ของการเพาะเลี้ยง แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ในวันที่ 30 และ 90 วัน (ภาคผนวก ข) แสดงผลในตารางที่ 8.

จำนวนเม็ดลาเท็กซ์ที่ถูกกินต่อเซลล์ (ABPC) ของกลุ่มไฟโรไบโอติกสูงกว่ากลุ่มควบคุมแต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ภาคผนวก ข) แสดงผลในตารางที่ 8.

ฟีนอลออกซิเดส ของกลุ่มไฟโรไบโอติกมีปริมาณสูงกว่ากลุ่มควบคุมหลังการเพาะเลี้ยงกึ่ง 90 วัน แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ภาคผนวก ข) แสดงผลในตารางที่ 9.

ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ของกลุ่มไฟโรไบโอติกมีแนวโน้มสูงกว่ากลุ่มควบคุม (แสดงค่าเป็นเปอร์เซนต์ การยับยั้งเชื้อ *V. harveyi*) แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ (ภาคผนวก ข) แสดงผลในตารางที่ 10.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 8. เซลล์เม็ดเลือดกึ่งกลาดำที่เกิดฟาโกไซโตซิส กำลังขยาย 1000 เท่า  
 ( ▲ ซีเมนต์ลาเท็กซ์ที่ถูกจับกินโดยเซลล์ฟาโกไซโตซิส )

ตารางที่ 7. จำนวนเม็ดเลือดรวมในน้ำเลือดกึ่งกลาดำกลุ่มควบคุมเทียบกับกลุ่มโพรไบโอติก ระหว่างการเลี้ยงกึ่งกลาดำครั้งที่ 1.

ระยะเวลาเลี้ยงกึ่ง (วัน)	จำนวนเม็ดเลือดรวม ( $1 \times 10^7$ เซลล์/มล.)	
	กลุ่มควบคุม	กลุ่มโพรไบโอติก
0	ND	ND
30	$2.61 \pm 0.27$	$4.32 \pm 2.68$
60	$2.85 \pm 0.95$	$5.48 \pm 1.52$
90	$1.97 \pm 1.33$	$4.64 \pm 1.63$

ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย  $\pm$  SD (n = 3)

ND = Not done

ตารางที่ 8. ประสิทธิภาพการกลืนทำลายสิ่งแปลกปลอมโดยวิธีฟาโกไซโตซิสของเม็ดเลือดกึ่งกลาดำ กลุ่มควบคุมเทียบกับกลุ่มโพรไบโอติกระหว่างการเลี้ยงกึ่งกลาดำครั้งที่ 1.

ประสิทธิภาพการกลืนทำลาย	ระยะเวลาเลี้ยงกึ่ง (วัน)	กลุ่มควบคุม	กลุ่มโพรไบโอติก
% phagocytosis	0	ND	ND
	30	$3.2 \pm 1.7$	$4.4 \pm 4.0$
	60	$7.7 \pm 2.4$	$16.3 \pm 0.8$ *
	90	$5.8 \pm 0.4$	$6.8 \pm 0.4$
phagocytic index	0	ND	ND
	30	$0.22 \pm 0.17$	$0.50 \pm 0.66$
	60	$3.34 \pm 1.77$	$12.81 \pm 4.31$ *
	90	$1.06 \pm 0.03$	$1.74 \pm 0.56$
จำนวนเม็ดลาเท็กซ์ที่ถูกกินต่อ เซลล์ (ABPC)	0	ND	ND
	30	$1.6 \pm 0.2$	$2.1 \pm 0.9$
	60	$5.9 \pm 2.5$	$4.9 \pm 1.6$
	90	$2.7 \pm 0.1$	$3.6 \pm 0.50$

\* แสดงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย  $\pm$  SD (n = 3)

ND = Not done



ตารางที่ 9. ปริมาณฟีนอลออกซิเดสในเมดเลือดกึ่งกลาดำกลุ่มควบคุมเทียบกับกลุ่มโพรไบโอติกระหว่างการเลี้ยงกึ่งกลาดำครั้งที่ 1.

ระยะเวลาเลี้ยงกึ่ง (วัน)	ฟีนอลออกซิเดส (units/นาที่/มก.โปรตีน)	
	กลุ่มควบคุม	กลุ่มโพรไบโอติก
0	ND	ND
30	33.7 ± 17.0	39.0 ± 25.1
60	763.8 ± 639.4	750.6 ± 97.4
90	624.1 ± 516.2	767.3 ± 258.0

ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± SD (n = 5)

ND = Not done

ตารางที่ 10. ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *V. harveyi* สายพันธุ์ D331 ในพลาสมากึ่งกลาดำกลุ่มควบคุมเทียบกับกลุ่มโพรไบโอติกระหว่างการเลี้ยงกึ่งกลาดำครั้งที่ 1.

ระยะเวลาเลี้ยงกึ่ง (วัน)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (%)	
	กลุ่มควบคุม	กลุ่มโพรไบโอติก
0	ND	ND
30	0.0 ± 0.0	47.6 ± 46.7
60	88.5 ± 7.4	96.0 ± 3.3
90	71.8 ± 17.4	97.3 ± 1.0

ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± SD (n = 6)

ND = Not done

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### 1.3 การทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค (challenge test)

รวมกุ้งที่เหลือจากการเพาะเลี้ยง 90 วัน ในแต่ละกลุ่ม นำมาทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค โดยใช้ *V. harveyi* สายพันธุ์ D331 เป็นเชื้อก่อโรค เติมเชื้อก่อโรคในน้ำเลี้ยงกุ้งจำนวน  $2.33 \times 10^7$  CFU/ml พบว่ากุ้งไม่มีการตายภายใน 7 วัน จึงเติมเชื้อ *V. harveyi* สายพันธุ์ D331 เพิ่มขึ้นเป็น  $5.85 \times 10^7$  CFU/ml พบว่ากุ้งไม่มีการตายภายใน 7 วัน จึงเปลี่ยน *V. harveyi* สายพันธุ์ใหม่ที่มีความรุนแรงกว่าสายพันธุ์เดิม สายพันธุ์ใหม่นี้ได้แก่ *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 เติมซ้ำจนมีจำนวน *V. harveyi* เท่ากับ  $1.21 \times 10^8$  CFU/ml พบว่ากุ้งตายหมดภายใน 1 วัน ซึ่งไม่สามารถตรวจสอบผลต่างระหว่างกุ้งทดลองสองกลุ่มได้ จึงต้องหาค่าความเข้มข้นที่ทำให้กุ้งตาย 50% ( $LC_{50}$ ) ของ *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 เพื่อนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 2

### 1.4 การหาค่าความเข้มข้นที่ทำให้กุ้งตาย 50 % ( $LC_{50}$ )

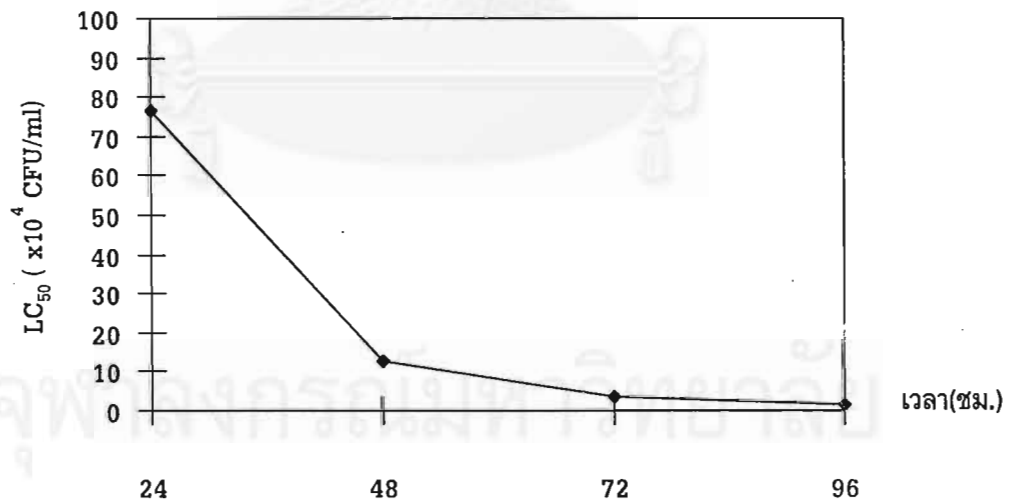
กุ้งที่ใช้ทดลองนี้ น้ำหนักเฉลี่ย 0.77 กรัม ตรวจสอบจำนวนกุ้งที่ตายในแต่ละกลุ่มความเข้มข้นของ *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 แสดงผลในตารางที่ 11. นำผลไปวิเคราะห์หาค่า  $LC_{50}$  โดยโปรแกรมโปรแกรมโพธิ์ อเนลิส ได้ค่า  $LC_{50}$  ของ *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 เท่ากับ  $7.65 \times 10^5$ ,  $1.30 \times 10^5$ ,  $3.44 \times 10^4$ ,  $1.77 \times 10^4$  CFU/ml ที่ 24, 48, 72 และ 96 ชม. ตามลำดับ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ภาคผนวก ซ)

นำค่า  $LC_{50}$  ไปเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์กับเวลาได้ผลดังรูปที่ 9.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11. จำนวนกุ้งกุลาดำที่ตายหลังใส่ *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ใน น้ำเลี้ยงกุ้ง เป็นเวลา 96 ชม.

<i>V. harveyi</i> สายพันธุ์ 1526 (CFU/ml)	log cell number	N (ตัว)	จำนวนกุ้งตายสะสม (ตัว)				
			0 ชม.	24 ชม.	48 ชม.	72 ชม.	96 ชม.
0 (ควบคุม)	-	30	0	1	1	1	1
$9.33 \times 10^2$	2.97	30	0	0	1	3	3
$4.13 \times 10^3$	3.62	30	0	2	5	6	6
$2.40 \times 10^4$	4.38	30	0	4	7	12	18
$5.70 \times 10^5$	5.76	30	0	13	25	28	29
$3.53 \times 10^6$	6.55	30	0	29	30	30	30



รูปที่ 9. ค่า LC<sub>50</sub> ของ *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 ที่ทำให้กุ้งกุลาดำตายที่เวลาต่างๆ

## 2. การเลี้ยงกุ้งกุลาดำครั้งที่ 2

### 2.1 ผลของโพรไบโอติกต่อการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ

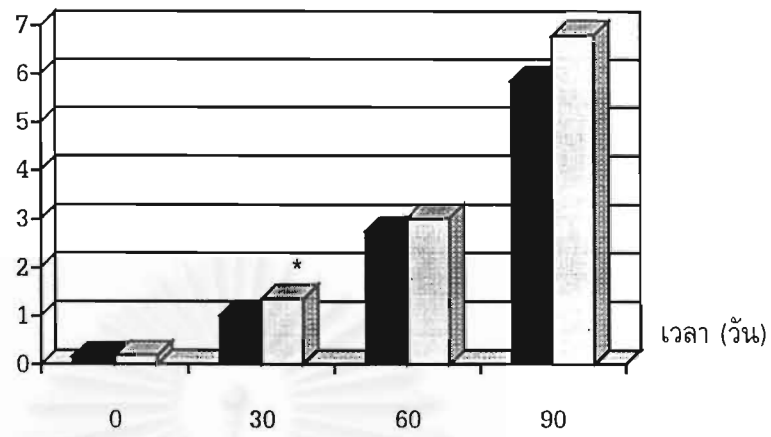
แบ่งการทดลองเป็น 2 กลุ่มเช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำครั้งที่ 1 กุ้งกุลาดำระยะ postlarvae เริ่มตั้งเลี้ยงที่ น้ำหนักประมาณ 0.1-0.3 กรัม ในบ่อปูนซีเมนต์ ระบบหมุนเวียนน้ำแบบปิด เป็นเวลา 90 วัน พบว่าน้ำหนักตัวกุ้งกุลาดำ ของกลุ่มโพรไบโอติก สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 30 วัน ของการเพาะเลี้ยง (ภาคผนวก ข) การรอดชีวิตของกุ้งกลุ่มโพรไบโอติก สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 60 วันและ 90 วัน ของการเพาะเลี้ยง (ภาคผนวก ข) น้ำหนักตัวกุ้งกุลาดำและการรอดชีวิตแสดงผลในรูปที่ 10 คุณภาพน้ำของทั้ง 2 กลุ่มมีค่าใกล้เคียงกัน และอยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกุ้ง แสดงผลในตารางที่ 11. โดยแสดงจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด *Bacillus* สายพันธุ์ S11 และ *Vibrio* spp. ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (รูปที่ 11.) และ ในลำไส้กุ้งกุลาดำ (รูปที่ 12.) พบว่า *Bacillus* สายพันธุ์ S11 มีปริมาณเพิ่มขึ้นต่อเวลาในกลุ่มกุ้งที่ได้รับโพรไบโอติกจากอาหาร โดยตรวจไม่พบ *Bacillus* สายพันธุ์ S11 ในกลุ่มควบคุม น้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำทั้งสองกลุ่มทดลอง ตรวจพบแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง  $1.52 \times 10^4 - 2.5 \times 10^5$  CFU/ml และ *Vibrio* spp. ตรวจพบอยู่ในช่วง  $1.0 \times 10^2 - 6.0 \times 10^3$  CFU/ml (รูปที่ 11.) ส่วนลำไส้กุ้งกุลาดำทั้งสองกลุ่มทดลอง พบแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง  $6.28 \times 10^7 - 3.47 \times 10^8$  CFU/g และ *Vibrio* spp. ตรวจพบอยู่ในช่วง  $2.83 \times 10^4 - 4.77 \times 10^6$  CFU/g (รูปที่ 12.)

### 2.2 ผลของโพรไบโอติกต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรค

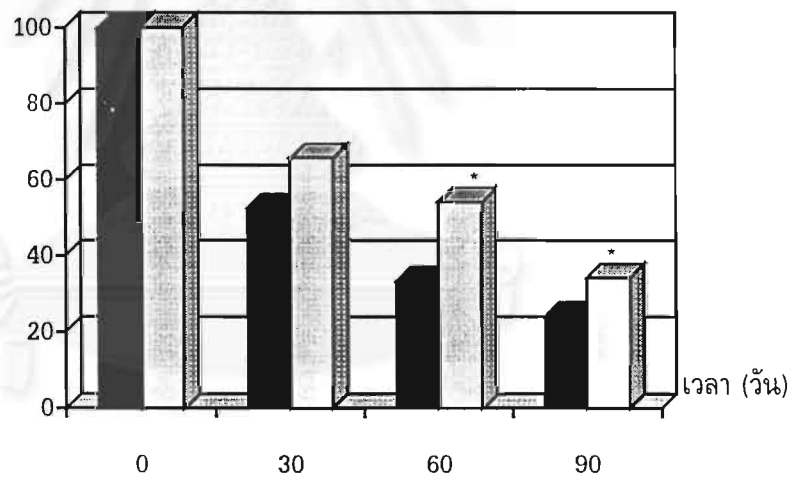
จำนวนเม็ดเลือดรวม ความสามารถในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมโดยวิธีฟาโกไซโตซิส และฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของกลุ่มโพรไบโอติก และกลุ่มควบคุมไม่มีความแตกต่างทางสถิติ หลังการเพาะเลี้ยงกุ้ง 90 วัน แสดงผลในตารางที่ 13.

ส่วนฟีนอลออกซิเดส ของกุ้งกลุ่มโพรไบโอติกหลังการเพาะเลี้ยง 90 วัน แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาคผนวก ข) แสดงผลในตารางที่ 13.

น้ำหนัก (กรัม)



การรอดชีวิต (%)



■ control

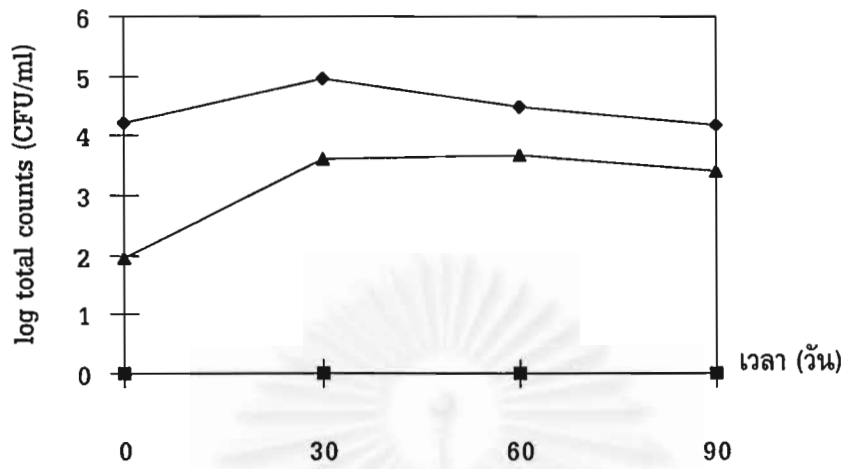
□ probiotic

รูปที่ 10. น้ำหนักตัว และการรอดชีวิตของกิ่งกลาดำกลุ่มโพรไบโอติก (probiotic) และกลุ่มควบคุม (control) ระหว่างการเลี้ยงกิ่งกลาดำ ครั้งที่ 2.

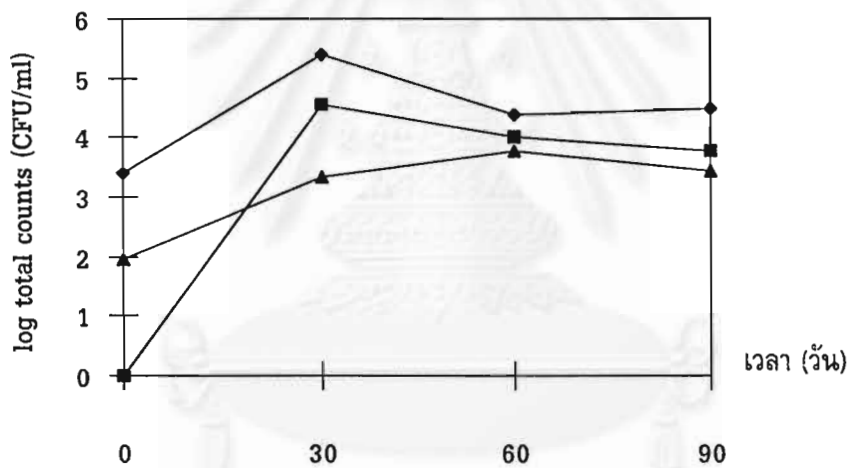
\* แสดงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

ตารางที่ 12. คุณภาพน้ำระหว่างการเลี้ยงกุ้งกุลาดำครั้งที่ 2 เป็นระยะเวลา 90 วัน (ตรวจสอบผลทุกสัปดาห์)

คุณภาพน้ำ	ช่วงค่าคุณภาพน้ำ (ต่ำสุด-สูงสุด)	
	กลุ่มควบคุม	กลุ่มโปรไบโอติก
แอมโมเนีย (มก./ลิตร)	0 - 0.42	0 - 0.33
ไนไตรท์ (มก./ลิตร)	0.5 - 0.3	0.08 - 0.33
ฟอสเฟต (มก./ลิตร)	5.0 - 10.0	3.3 - 7.5
อุณหภูมิ (°C)	24.2 - 27.5	24.0 - 27.0
ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (มก./ลิตร)	5.2 - 7.5	5.2 - 7.2
พีเอช	7.83 - 8.12	7.64 - 8.18
ความเค็ม (ส่วนในพันส่วน)	26.0 - 29.0	26.0 - 30.0



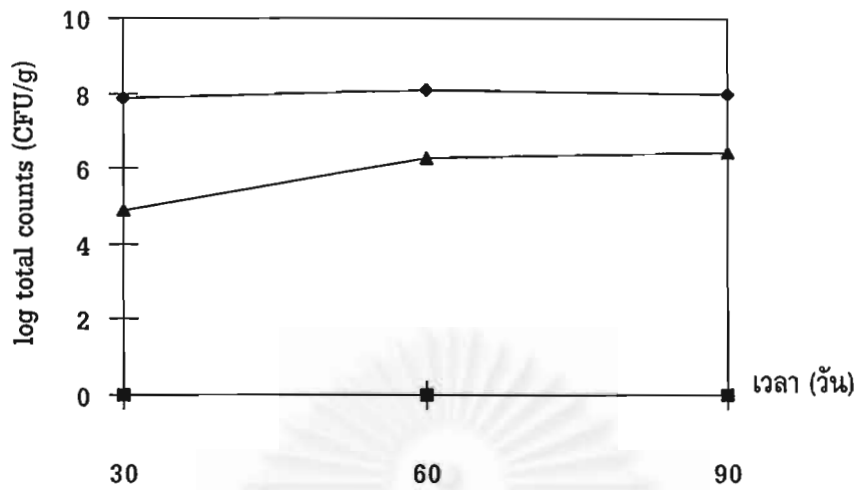
ก



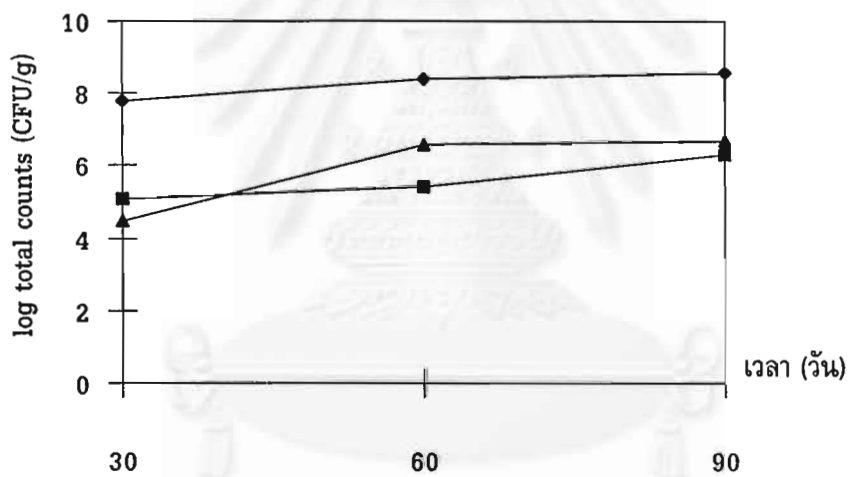
ข

ก. กลุ่มควบคุม      ข. กลุ่มโพรไบโอติก

รูปที่ 11. จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (◆) *Bacillus* สายพันธุ์ S11 (■) และ *Vibrio* spp. (▲) ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำระหว่างการเลี้ยงกุ้ง ครั้งที่ 2. แต่ละจุดเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ



ก



ข

ก. กลุ่มควบคุม

ข. กลุ่มโพรไบโอติก

รูปที่ 12. จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (◆) *Bacillus* สายพันธุ์ S11 (■) และ *Vibrio* spp. (▲)

ในลำไส้กุ้งกุลาดำระหว่างการเลี้ยงกุ้ง ครั้งที่ 2.

แต่ละจุดเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ



ตารางที่ 13. ปัจจัยทางภูมิคุ้มกันของกึ่งกลาดำกลุ่มควบคุม และกลุ่มโพรไบโอติก หลังการเลี้ยง กึ่งกลาดำครั้งที่ 2. เป็นเวลา 90 วัน

ปัจจัยทางภูมิคุ้มกัน	กลุ่มควบคุม	กลุ่มโพรไบโอติก
จำนวนเม็ดเลือดรวม ( x 10 <sup>7</sup> เซลล์/มล.)	1.35 ± 0.56	2.56 ± 0.67
ประสิทธิภาพการกลืนทำลาย :		
% phagocytosis	1.0 ± 0.5	2.2 ± 1.0
phagocytic index	0.02 ± 0.02	0.11 ± 0.1
จำนวนเม็ดลาเท็กซ์ที่ถูกกินต่อเซลล์	1.6 ± 0.5	2.0 ± 0.4
ฟีนอลออกซิเดส (units/นาที่/มก.โปรตีน)	10.3 ± 9.1	41.0 ± 10.1 *
ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (%การยับยั้ง)	17.9 ± 28.1	32.4 ± 29.1

ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± SD (n = 3)

\* แสดงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

### 2.3 การทดสอบความต้านทานต่อการเหนียวทำให้เกิดโรค

หลังจากเลี้ยงกุ้งเป็นเวลา 90 วัน รวังกุ้งที่เหลือจากการทดลองในแต่ละกลุ่มมาทดสอบความต้านทานต่อการเหนียวทำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 ใช้ความเข้มข้น 100 เท่าของ  $LC_{50}$  ที่ 48 ชม. เติมเชื้อ *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 ในน้ำเลี้ยงกุ้ง 2 ครั้ง ครั้งแรกในวันเริ่มต้นการทดสอบ และครั้งที่ 2 ในวันที่ 4 ของการทดสอบ ผลที่ได้คือ

การตายสะสมของกลุ่มควบคุม ( 64.5 %) สูงกว่าโพรไบโอติก (45.7%) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ดังแสดงในรูปที่ 13.

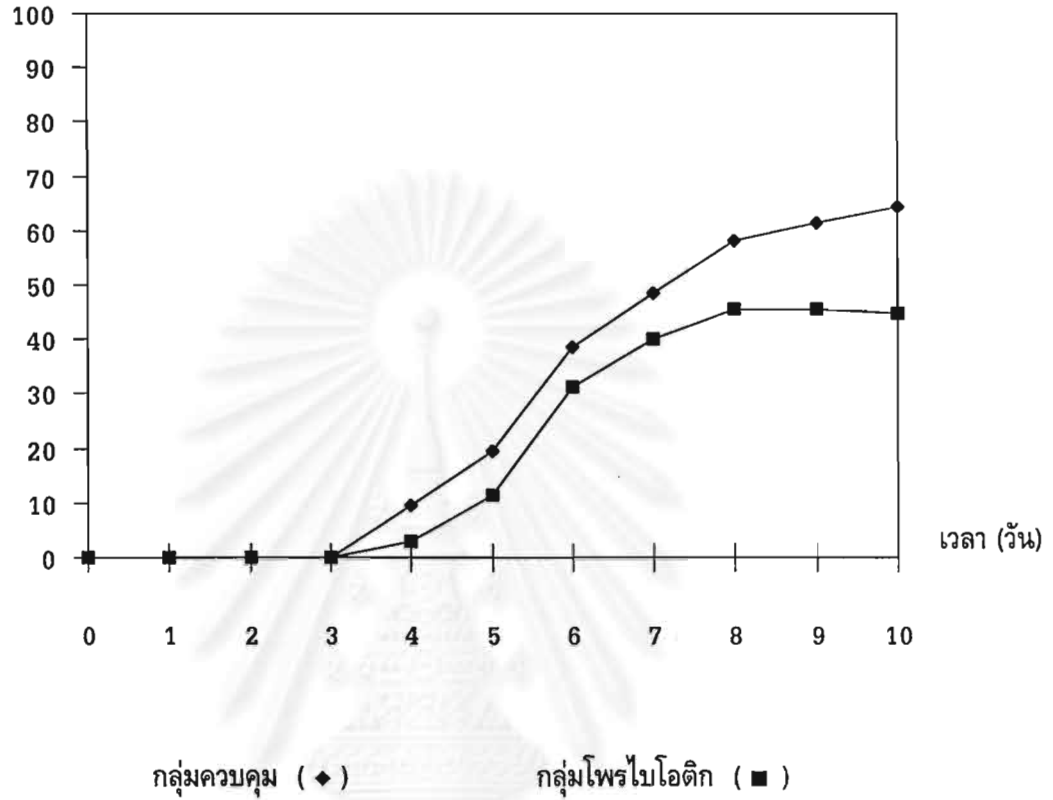
เปรียบเทียบจำนวน *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 และ *Bacillus* สายพันธุ์ S11 ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (รูปที่ 14.) และในลำไส้กุ้งกุลาดำระหว่างการเหนียวทำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 เป็นเวลา 10 วัน (รูปที่ 15.) พบว่าจำนวน *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 ในน้ำเลี้ยงกุ้ง และลำไส้กุ้งของกลุ่มโพรไบโอติก มีจำนวนลดลง และน้อยกว่ากลุ่มควบคุมในวันที่ 10 ของการทดสอบความต้านทานต่อการเหนียวทำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 โดยตรวจพบ *Bacillus* สายพันธุ์ S11 ในกลุ่มโพรไบโอติกทั้งในน้ำ และลำไส้กุ้งตลอดการเหนียวทำให้เกิดโรค และตรวจไม่พบ *Bacillus* สายพันธุ์ S11 ในกลุ่มควบคุมตลอดการทดสอบ (รูปที่ 14. และ 15.)

นำเฮปาทopancreas (hepatopancreas) กุ้งที่ตายมาเพาะแยกเชื้อสาเหตุการเกิดโรค และแยกเชื้อ *Vibrio* spp. โคโลนีสีเขียวที่พบในน้ำและลำไส้กุ้งในระหว่างการเหนียวทำให้เกิดโรค 10 วัน ไปทดสอบลักษณะทางชีวเคมี พบว่าเชื้อที่เป็นสาเหตุการตายของกุ้ง และเชื้อที่พบในน้ำและลำไส้กุ้งระหว่างการเหนียวทำให้เกิดโรค มีลักษณะทางชีวเคมีเหมือน *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 ที่ใช้ในการเหนียวทำให้เกิดโรคทุกประการ แสดงผลในตารางที่ 14.

ทดสอบภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์ และสารน้ำ หลังการเหนียวทำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 เป็นเวลา 10 วัน (ตารางที่ 15.) พบว่า ประสิทธิภาพการกลืนทำลายสิ่งแปลกปลอมโดยวิธีฟาโกไซโตซิส ได้แก่ เปอร์เซ็นต์ฟาโกไซโตซิส, ฟาโกไซติก อินดิเคซ์ และจำนวนเม็ดโลหิตขาว ที่ถูกกินต่อเซลล์ของกลุ่มโพรไบโอติก สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ภาคผนวก ข.) ส่วนจำนวนเม็ดเลือดรวม, ฟีนอลออกซิเดส และฤทธิ์ต้านแบคทีเรียไม่มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างสองกลุ่มทดลอง (ตารางที่ 15.)

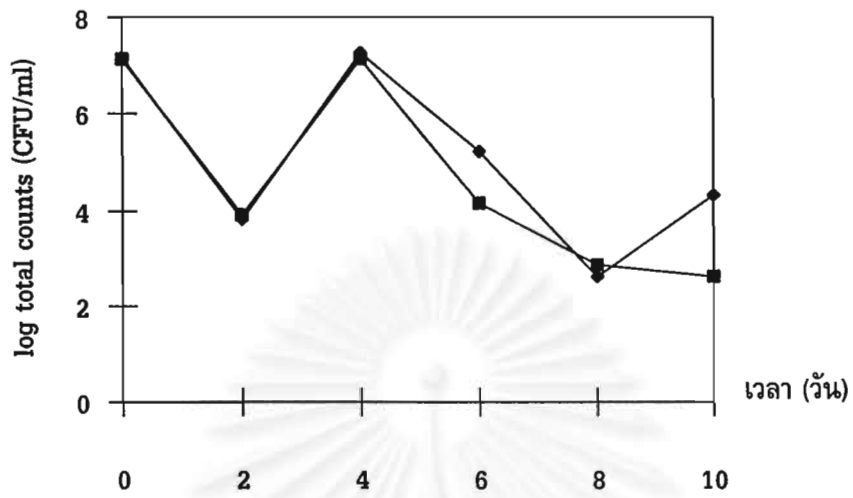
เมื่อรวมกลุ่มควบคุมและกลุ่มโพรไบโอติกเปรียบเทียบปัจจัยทางภูมิคุ้มกันก่อนและหลังเหนียวทำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 เป็นเวลา 10 วัน (ตารางที่ 16.) พบว่าหลังการเหนียวทำให้เกิดโรคด้วยแบคทีเรีย จำนวนเม็ดเลือดรวมจะลดลง ส่วนเปอร์เซ็นต์ฟาโกไซโตซิส, ฟาโกไซติก อินดิเคซ์ และ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจะสูงขึ้น ในขณะที่ฟีนอลออกซิเดส และจำนวนเม็ดโลหิตขาวที่ถูกกินต่อเซลล์ไม่มีการเปลี่ยนแปลง (ตารางที่ 16.)

การตายสะสม (%)

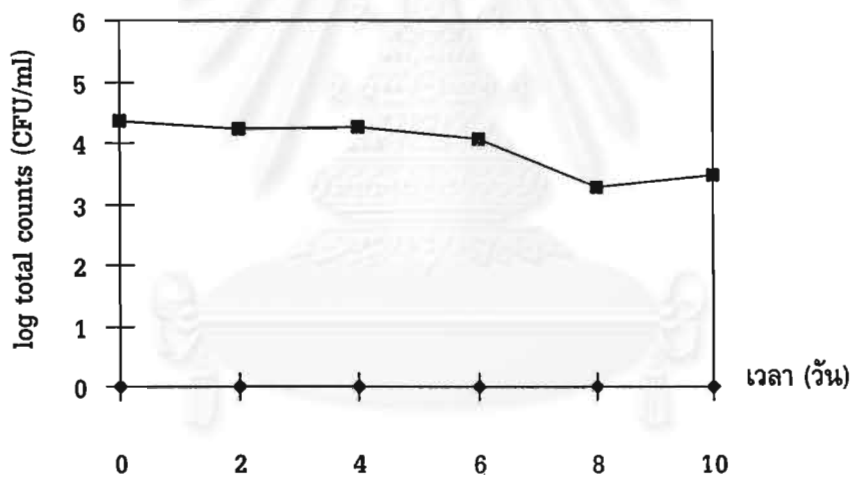


รูปที่ 13. การตายสะสม (cumulative mortality) ของกุ้งกุลาดำ ระหว่างการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 เป็นเวลา 10 วัน แต่ละจุดเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ (กลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่ *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 มีการตายสะสม 0% ข้อมูลไม่ได้แสดงในรูป)

สถาบันนวัตกรรมการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ก

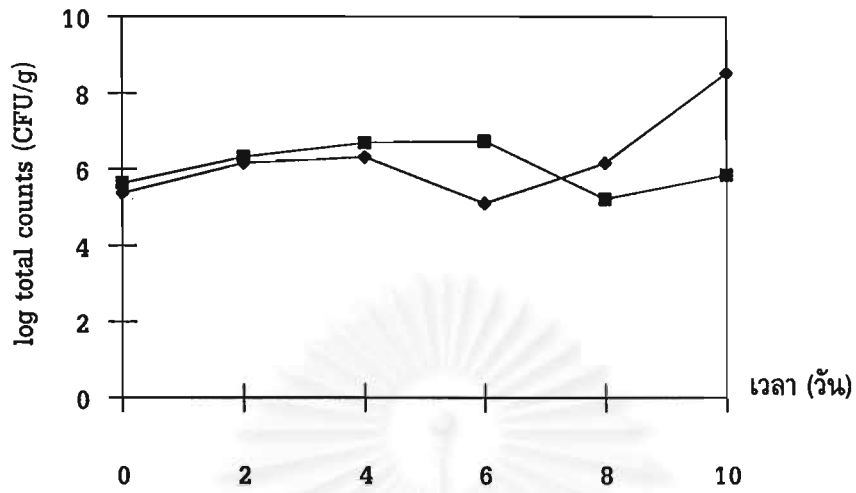


ข

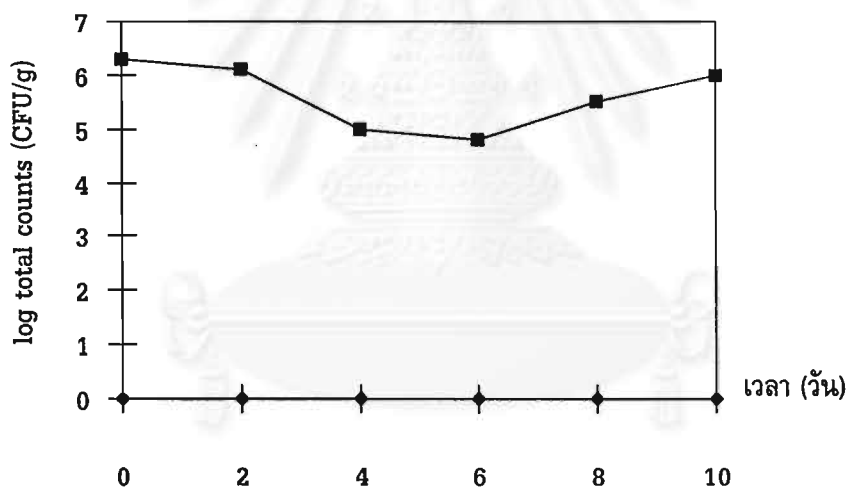
กลุ่มควบคุม (◆)

กลุ่มโพรไบโอติก (■)

รูปที่ 14. จำนวน *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 ( ก ) และ *Bacillus* สายพันธุ์ S11 ( ข ) ในน้ำเลี้ยง กุ้งกุลาดำ ระหว่างการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 เป็นเวลา 10 วัน แต่ละจุดเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ



ก



ข

กลุ่มควบคุม (◆)

กลุ่มโพรไบโอติก (■)

รูปที่ 15. จำนวน *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 ( ก ) และ *Bacillus* สายพันธุ์ S11 ( ข ) ในลำไส้ กุ้งกุลาดำระหว่างการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 เป็นเวลา 10 วัน แต่ละจุดเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ

ตารางที่ 14. ลักษณะรูปร่างและชีวเคมีของ *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526

ลักษณะที่ทดสอบ	<i>V. harveyi</i> สายพันธุ์ 1526
Gram 's stain	negative rod
Pigmentation	-
Swarming on solid complex media	-
Motility	+
Indole	+
Oxidase	+
Reduction of $\text{NO}_3^-$ to $\text{NO}_2^-$	+
Gas from D-glucose	-
Production of acetoin and/or diacetyl	-
$\text{Na}^+$ required for growth :	
0 %	-
1 %	+
3 %	+
6 %	+
8 %	+
10 %	-
Growth at :	
4 °C	-
30 °C	+
37 °C	+
40 °C	-
Utilization of :	
D-glucose	+
L-arabinose	-
D-mannose	+
Sucrose	-
Cellobiose	+
Lactose	-
Citrate	+

+ positive test , - negative test

อาหารที่ใช้ทดสอบทุกชนิดเติม NaCl 1% (w/v) ยกเว้น การทดสอบ  $\text{Na}^+$  required for growth : 0%

ตารางที่ 15. ปัจจัยทางภูมิคุ้มกันของกึ่งกลาดำกลุ่มควบคุม และกลุ่มโพรบิโอติก หลังการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 เป็นเวลา 10 วัน

ปัจจัยทางภูมิคุ้มกัน	กลุ่มควบคุม	กลุ่มโพรบิโอติก
จำนวนเม็ดเลือดรวม ( x 10 <sup>7</sup> เซลล์/มล.)	1.13 ± 0.51	1.11 ± 0.19
ประสิทธิภาพการกลืนทำลาย :		
% phagocytosis	6.0 ± 1.8	10.5 ± 1.8 *
phagocytic index	0.62 ± 0.28	2.73 ± 0.77 *
จำนวนเม็ดลาเท็กซ์ที่ถูกกินต่อเซลล์	1.7 ± 0.3	2.5 ± 0.3 *
ฟีนอลออกซิเดส (units/นาที่/มก.โปรตีน)	7.7 ± 1.0	24.7 ± 12.6
ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (%การยับยั้ง)	70.5 ± 15.2	87.4 ± 9.3

ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± SD (n = 3)

\* แสดงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 16. ปัจจัยทางภูมิคุ้มกันของกึ่งกลาดำ ก่อนและหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 เป็นเวลา 10 วัน

ปัจจัยทางภูมิคุ้มกัน	ก่อนเหนี่ยวนำให้เกิดโรค	หลังเหนี่ยวนำให้เกิดโรค
จำนวนเม็ดเลือดรวม ( x 10 <sup>7</sup> เซลล์/มล.)	1.96 *	1.12
% phagocytosis	1.58	8.25 *
Phagocytic index	0.064	1.678 *
จำนวนเม็ดลาเท็กซ์ที่ถูกกินต่อเซลล์	1.767	2.1
ฟีนอลออกซิเดส (units/นาที่/มก.โปรตีน)	25.65	16.2
ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (%การยับยั้ง)	25.12	78.93 *

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยคิดรวมทั้งสองกลุ่มทดลอง (n = 6)

\* แสดงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

อภิปรายผลการทดลอง



1. ผลของโพรไบโอติกต่อการเจริญเติบโตของกึ่งกุลาดำ

การเลี้ยงกึ่งกุลาดำครั้งที่ 1. ใช้กึ่งกุลาดำระยะวัยรุ่น จากจังหวัดจันทบุรี น้ำหนักตัว 6 - 7 กรัม เลี้ยงในบ่อพลาสติกกลม มีระบบหมุนเวียนน้ำแบบปิด (Closed recirculating water system) ประกอบด้วยระบบกรองชีวภาพอยู่ในบ่อเลี้ยง แบ่งการทดลองเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม (control) ให้อาหารกึ่งสำเร็จรูปโดยไม่ผสมเซลล์ *Bacillus* สายพันธุ์ S11 และกลุ่มโพรไบโอติก (probiotics) ให้อาหารกึ่งสำเร็จรูปผสมเซลล์สด *Bacillus* สายพันธุ์ S11 เลี้ยงกึ่งเป็นเวลา 90 วัน พบว่า น้ำหนักตัวกึ่งกุลาดำ และการรอดชีวิตของกลุ่มโพรไบโอติกสูงกว่ากลุ่มควบคุมแต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ และได้ทำการทดลองซ้ำเลี้ยงกึ่งกุลาดำครั้งที่ 2. ใช้กึ่งกุลาดำระยะ postlarvae จากจังหวัดฉะเชิงเทรา น้ำหนักตัว 0.1 - 0.3 กรัม เลี้ยงในบ่อปูนซีเมนต์ มีระบบหมุนเวียนน้ำแบบปิด ระบบกรองชีวภาพแยกกับระบบเลี้ยง แบ่งเป็น 2 กลุ่ม การทดลองเช่นเดียวกับการเลี้ยงกึ่งครั้งที่ 1. เลี้ยงกึ่งเป็นระยะเวลา 90 วัน พบว่า น้ำหนักตัวกึ่งกุลาดำกลุ่มโพรไบโอติก สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 30 วันของการเลี้ยงกึ่ง การรอดชีวิตของกึ่งกุลาดำกลุ่มโพรไบโอติก สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 60 วัน และ 90 วันของการเลี้ยงกึ่ง จากการเลี้ยงกึ่งทั้งสองครั้ง ซึ่งให้เห็นว่าโพรไบโอติก มีผลกระตุ้นการเจริญเติบโต และอัตราการรอดของกึ่งกุลาดำ เมื่อเสริมโพรไบโอติกตั้งแต่กึ่งยังมีขนาดเล็ก ระยะ postlarvae ซึ่งเป็นระยะที่มีการเจริญเติบโตเร็วกว่ากึ่งระยะวัยรุ่น (รูปที่ 4. และ 10.) ทำให้มีการกินอาหารบ่อยครั้งกว่า โอกาสที่กึ่งจะได้รับโพรไบโอติกจึงมีมากกว่าด้วย สอดคล้องกับ วรณิภา เพ็ชรนัทธ์ (2539) ที่พบว่า *Bacillus* สายพันธุ์ S11 สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโต กึ่งกุลาดำได้ เมื่อเสริม *Bacillus* สายพันธุ์ S11 ในอาหาร และเลี้ยงกึ่งระยะ postlarvae-30 (น้ำหนักตัว 0.66 - 0.85 กรัม) เป็นเวลา 100 วัน

การเลี้ยงกึ่งทั้งสองครั้งจะใช้ระบบหมุนเวียนน้ำแบบปิด (Menasveta และคณะ, 1989) มีระบบกรองชีวภาพที่ประกอบด้วย ทราช เปลือกหอย และจุลินทรีย์ช่วยบำบัดน้ำที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติหลังเริ่มเลี้ยงกึ่ง ข้อดีของระบบหมุนเวียนน้ำแบบปิด คือ สามารถควบคุมแอมโมเนีย ไนไตรท์ ไนเตรท และปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำให้อยู่ในเกณฑ์ปกติ และเหมาะสมกับการเลี้ยงกึ่งได้ (ธัญญา พันธุ์ฤทธิธิดา, 2541) นอกจากนี้ยังลดปัญหาโรคติดเชื้อที่มากับน้ำทะเล เพราะระบบหมุนเวียนน้ำแบบปิดจะไม่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำตลอดการเลี้ยงกึ่ง คุณภาพน้ำในบ่อปูนซีเมนต์ที่มีระบบกรองชีวภาพแยกกับระบบเลี้ยง (การเลี้ยงกึ่งครั้งที่ 2.) จะมีคุณภาพน้ำโดยเฉพาะไนไตรท์ดีกว่าในบ่อพลาสติกกลมที่มีระบบกรองชีวภาพในบ่อเลี้ยง (การเลี้ยงกึ่งครั้งที่ 1.) ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจาก บ่อพลาสติกกลมมีระบบกรองชีวภาพที่มีขนาดเล็กไม่สมดุลกับขนาดบ่อเลี้ยงทำให้มีพื้น



ที่อาศัยของแบคทีเรียในกลุ่ม Nitrifying bacteria ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติไม่เพียงพอ ส่งผลให้ประสิทธิภาพการบำบัดน้ำในระบบกรองไม่ได้ประสิทธิภาพสูงสุด ต่างกับบ่อปูนซีเมนต์ที่มีระบบกรองขนาดใหญ่แยกกับระบบเลี้ยง จึงมีพื้นที่อาศัยของ Nitrifying bacteria เป็นจำนวนมากเพียงพอให้เกิดประสิทธิภาพการกรองสมบูรณ์

ก่อนเริ่มต้นการเลี้ยงกุ้งได้ตรวจสอบแบคทีเรียทั้งหมดในอาหารกุ้งกุลาดำสำเร็จรูป พบว่า มีจำนวนแบคทีเรียนับได้  $5.0 \times 10^2$  CFU/g หลังจากนั้นนำอาหารกุ้งผสม *Bacillus* สายพันธุ์ S11 เพื่อเตรียมอาหารกุ้งที่มีโพรไบโอติก พบว่ามีจำนวน *Bacillus* สายพันธุ์ S11  $4.69 \times 10^{10}$  CFU/g โดยจำนวน *Bacillus* สายพันธุ์ S11 จะลดลงไม่ถึงครึ่ง log cycle เมื่อเก็บที่ 4 °ซ เป็นเวลา 90 วัน และตรวจไม่พบ *Vibrio* spp. ทั้งในอาหารกุ้งที่ผสม และไม่ผสม *Bacillus* สายพันธุ์ S11 ซึ่งให้เห็นว่าอาหารกุ้งสำเร็จรูปมีแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในปริมาณน้อย และไม่พบ *Vibrio* spp. ที่อาจเป็นเชื้อก่อโรคในกุ้ง จำนวน *Bacillus* สายพันธุ์ S11 ลดลงไม่ถึงครึ่ง log cycle เมื่อจัดเก็บเป็นเวลา 90 วัน ทำให้มั่นใจว่ามีแบคทีเรียโพรไบโอติกที่มีชีวิตอยู่จริงเมื่อผสมอาหารกุ้ง และนำไปเลี้ยงกุ้ง จึงนับว่าเป็นคุณสมบัติที่ดีข้อหนึ่งของโพรไบโอติก ตลอดการเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 1. และครั้งที่ 2. ตรวจสอบจุลินทรีย์ทั้งสองกลุ่มทดลองในน้ำเลี้ยงกุ้ง ชี้กุ้ง และลำไส้กุ้ง พบว่า ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำมีแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง  $1.52 \times 10^4 - 3.34 \times 10^5$  CFU/ml และ *Vibrio* spp. พบอยู่ในช่วง  $1.0 \times 10^2 - 1.39 \times 10^4$  CFU/ml ในชี้กุ้งมีแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง  $2.27 \times 10^9 - 1.91 \times 10^{12}$  CFU/g และ *Vibrio* spp. พบอยู่ในช่วง  $1.1 \times 10^7 - 9.09 \times 10^8$  CFU/g ส่วนในลำไส้กุ้งกุลาดำตรวจพบแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง  $3.26 \times 10^6 - 3.47 \times 10^8$  CFU/g และ *Vibrio* spp. พบอยู่ในช่วง  $2.83 \times 10^4 - 1.61 \times 10^8$  CFU/g ซึ่งมีค่าสอดคล้องกับ ภัทราพร ยุทธาจิต และคณะ (2533) ที่รายงานพบแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำอยู่ในช่วง  $3.9 \times 10^3 - 5.9 \times 10^3$  CFU/ml และในลำไส้กุ้งอยู่ในช่วง  $7.5 \times 10^6 - 2.1 \times 10^7$  CFU/g โดยพบ *Vibrio* spp. ในจำนวนมากประมาณ  $10^4 - 10^7$  โคโลนีในน้ำเลี้ยงกุ้ง และลำไส้กุ้ง นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับ วรณิกา เพ็ญนัทธ์ (2539) ที่แยกแบคทีเรียจากตัวอย่างกุ้งกุลาดำบริเวณทางเดินอาหาร และนำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง สามารถนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในลำไส้กุ้งได้  $1.2 \times 10^6 - 3.4 \times 10^7$  CFU/g และในน้ำมีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด  $1.0 \times 10^4 - 4.4 \times 10^5$  CFU/ml ตลอดการเลี้ยงกุ้ง จำนวน *Bacillus* สายพันธุ์ S11 ตรวจพบมีจำนวนเพิ่มขึ้นในลำไส้ และชี้กุ้งตามระยะเวลาเพาะเลี้ยง และมีจำนวนมาก ( $2.72 \times 10^5 - 4.11 \times 10^6$  CFU/g ลำไส้ ;  $2.29 \times 10^5 - 4.42 \times 10^{10}$  CFU/g ชี้กุ้ง ) ใกล้เคียงกับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในกลุ่มกุ้งที่ได้รับโพรไบโอติกจากอาหาร โดยตรวจไม่พบ *Bacillus* สายพันธุ์ S11 ในกลุ่มควบคุม ซึ่งให้เห็นว่า *Bacillus* สายพันธุ์ S11 สามารถตั้งรกรากมีชีวิตอยู่รอดได้ในลำไส้กุ้งกุลาดำจึงเป็นลักษณะที่ดีของโพรไบโอติก

เพื่อทดสอบว่า *Bacillus* สายพันธุ์ S11 ที่ตรวจพบในลำไส้กุ้งกุลาดำ เป็น *Bacillus* สายพันธุ์ S11 ที่ตั้งรกรากบนผนังลำไส้จริง ไม่ได้เกิดจากอาหารกุ้งที่ผสม *Bacillus* สายพันธุ์ S11 ที่หลงเหลือในลำไส้ จึงทดสอบเลี้ยงกุ้งกุลาดำ และให้อาหารที่ผสม *Bacillus* สายพันธุ์ S11 ที่มีจำนวน *Bacillus* สายพันธุ์ S11 เท่ากับ  $1.57 \times 10^{10}$  CFU/g อาหารกุ้ง ให้อาหารผสมโพรไบโอติกแก่กุ้งครั้งเดียวตอนเริ่มต้นเลี้ยง หลังจากนั้นให้

อาหารปกติที่ไม่ผสม *Bacillus* สายพันธุ์ S11 ตลอดจนการทดลอง สุ่มเก็บตัวอย่างกุ้ง และน้ำเลี้ยงกุ้ง เพื่อหาจำนวน *Bacillus* สายพันธุ์ S11 ในลำไส้ และน้ำเลี้ยงกุ้งเป็นเวลา 10 วัน (ภาคผนวก จ) พบว่ามีจำนวน *Bacillus* สายพันธุ์ S11 ในลำไส้ และน้ำ  $6.46 \times 10^6$  CFU/g และ  $1.56 \times 10^5$  CFU/ml ตามลำดับ ภายหลังให้โปรไบโอติก 12 ชั่วโมง และพบ *Bacillus* สายพันธุ์ S11 สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ในลำไส้ และน้ำในปริมาณคงที่ตลอดเวลา 10 วันของการเลี้ยง แสดงว่า *Bacillus* สายพันธุ์ S11 สามารถตั้งรกราก และมีชีวิตรอดได้ในลำไส้กุ้งกุลาดำ นอกจากพบ *Bacillus* สายพันธุ์ S11 ในลำไส้และซีกิ้งกลุ่มโปรไบโอติกแล้ว ยังพบ *Bacillus* สายพันธุ์ S11 ในน้ำเลี้ยงกุ้งกลุ่มโปรไบโอติกด้วย แสดงให้เห็นว่า *Bacillus* สายพันธุ์ S11 สามารถมีชีวิตรอดได้ในสภาพแวดล้อมของกุ้ง

## 2. ผลของโปรไบโอติกต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์ และสารน้ำ

ผลของโปรไบโอติกต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรคที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์ และสารน้ำ พบว่าการเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 1. กลุ่มโปรไบโอติกมีจำนวนเม็ดเลือดรวม ฟีนอลออกซิเดสในเม็ดเลือด และฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *V. harveyi* สายพันธุ์ D331 ในพลาสมากุ้งกุลาดำ สูงกว่ากลุ่มควบคุมตลอดระยะเวลา 90 วัน แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ส่วนการทดสอบประสิทธิภาพการกลืนทำลายสิ่งแปลกปลอมโดยวิธีฟาโกไซโตซิสของเม็ดเลือดกุ้ง พบว่าเปอร์เซ็นต์ฟาโกไซโตซิส และ ฟาโกไซติก อินดิเคซ์ ของกลุ่มโปรไบโอติกสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ในวันที่ 60 ของการเพาะเลี้ยง แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติในวันที่ 30 และ 90 ของการเพาะเลี้ยง การเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 2. พบจำนวนเม็ดเลือดรวม ประสิทธิภาพการกลืนทำลายสิ่งแปลกปลอมโดยวิธีฟาโกไซโตซิส และฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ไม่มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มควบคุม และกลุ่มโปรไบโอติกหลังการเลี้ยงกุ้ง 90 วัน แต่พบปริมาณฟีนอลออกซิเดสในเม็ดเลือดกุ้งกลุ่มโปรไบโอติกสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% หลังการเลี้ยงกุ้ง 90 วัน การเลี้ยงกุ้งทั้งสองครั้งให้ผลการกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรคที่แตกต่างกันอาจเป็นเพราะ ขนาดกุ้งทดลอง แหล่งที่มา และสภาพการเลี้ยงแตกต่างกัน

โปรไบโอติกสามารถเพิ่มความต้านทานการติดเชื้อในทางเดินอาหารของสัตว์มีกระดูกสันหลัง โดยป้องกันการจับเกาะผนังลำไส้ของเชื้อก่อโรค และในทางอ้อมมีผลกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นเองในธรรมชาติ (innate immunity) และที่เกิดขึ้นภายหลังจากที่มีการบุกรุกของเชื้อโรค (acquired immunity) (McCracken และ Gaskins, 1999) ฉวยะสำคัญในลำไส้ของสัตว์มีกระดูกสันหลังที่มีบทบาทในการตอบสนองภูมิคุ้มกันคือ gut-associated lymphatic tissues (GALT) ซึ่งเป็นตัวกลางเชื่อมต่อเซลล์ที่ถูกกระตุ้นจากลำไส้ไปส่วนต่างๆของร่างกาย (Famularo และคณะ, 1997 ; Havenaar และ Spanhaak, 1994) โปรไบโอติกมีผลกระตุ้นภูมิคุ้มกันสัตว์มีกระดูกสันหลังโดยกระตุ้นแมโครฟาจ และฟาโกไซโตซิสของเม็ดเลือดขาวในภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นเองโดยธรรมชาติ ส่วนภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นภายหลังจากที่มีการบุกรุกของเชื้อโรคพบการสร้าง secretory IgA (sIgA) และเซลล์สร้าง IgA สูงขึ้นในลำไส้เล็ก (Perdigon และคณะ, 1995)

และพบว่า sIgA มีความจำเพาะต่อเชื้อก่อโรคที่ใช้เหนี่ยวนำให้เกิดโรค (Perdigon และคณะ, 1995) โดย sIgA จะเคลือบผิวแบคทีเรียก่อโรค และป้องกันการจับเกาะที่ผนังลำไส้ (McCracken และ Gaskims, 1999) กลไกการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ โดยโพรไบโอติกยังไม่ทราบแน่ชัดเนื่องจากยังไม่มีผู้ศึกษาผลของ โพรไบโอติกต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ คาดว่าโพรไบโอติกสามารถเพิ่มความต้านทานโรคในกุ้งกุลาดำเหมือนกับสัตว์มีกระดูกสันหลัง คือ ป้องกันการจับเกาะผนังลำไส้ของเชื้อก่อโรค และกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นเองโดยธรรมชาติ ส่วนการกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นภายหลังจากที่มีการบุกรุกของเชื้อโรคอย่างจำเพาะเจาะจงไม่น่าเกิดในกุ้งกุลาดำ เพราะไม่มีรายงานการพบอิมมูโนโกลบูลินในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (Lackie, 1980 ; Ratcliffe และคณะ, 1985 ; Thörnqvist และ Söderhäll, 1997) *Bacillus* สายพันธุ์ S11 สามารถกระตุ้นประสิทธิภาพการกลืนทำลายสิ่งแปลกปลอมโดยวิธีฟาโกไซโตซิส ในการเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 1. และกระตุ้นฟีนอลออกซิเดสในเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 2. อาจเกิดจาก *Bacillus* สายพันธุ์ S11 ลอดทะลุ (penetrate) ผ่านลำไส้ หรือเปปติโดไกลแคนที่เป็นองค์ประกอบของ *Bacillus* สายพันธุ์ S11 เป็นตัวกระตุ้นภูมิคุ้มกัน สอดคล้องกับ Itami และคณะ (1998) ศึกษาประสิทธิภาพของเปปติโดไกลแคนจาก *Bifidobacterium thermophilum* ในกุ้ง *Penaeus japonicus* พบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารผสมเปปติโดไกลแคน จะมีความต้านทานโรคสูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเปปติโดไกลแคนอย่างมีนัยสำคัญหลังเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio penaeicida* และไวรัสก่อโรคดวงขาว เมื่อทดสอบประสิทธิภาพในการกลืนทำลายสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดพบว่า ฟาโกไซติก อินดิคซ์ ในกุ้งที่ได้รับเปปติโดไกลแคน มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ จันทนา นิธิเมธาโชค (2539) ใช้เซลล์ *Clostridium butyricum* ที่ทำให้ตายด้วยฟอร์มัลลินเสริมลงในอาหาร และตรวจสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคในกุ้งกุลาดำ พบว่าการเสริม *C. butyricum* ในอาหาร จะช่วยเพิ่มความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* โดยมีผลกระตุ้นการเกิดฟาโกไซโตซิส และแบคทีเรียชนิดอื่นสูงขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

จากผลการกระตุ้นของ *Bacillus* สายพันธุ์ S11 พบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *V. harveyi* สายพันธุ์ D331 สูงกว่ากลุ่มควบคุมแต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ อาจเป็นเนื่องจากฤทธิ์ต้านแบคทีเรียมีความจำเพาะต่อเชื้อบางส่วน (Weinheimer และคณะ, 1969 ; Adams, 1991) กล่าวคือ ใช้ *Bacillus* สายพันธุ์ S11 ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกเป็นตัวกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และใช้ *V. harveyi* สายพันธุ์ D331 ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ทำให้ไม่พบความแตกต่างของฤทธิ์ต้านแบคทีเรียระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มโพรไบโอติก สอดคล้องกับ Evans และคณะ (1968 , 1969b) ได้ใช้เชื้อแบคทีเรียแกรมลบรูปท่อน EMB-1 ที่แยกได้จากลำไส้ของกุ้งมังกร *Panulirus argus* ที่มีสุขภาพดี ในรูปเซลล์ที่มีชีวิต และเซลล์ที่ถูกฆ่าด้วยฟอร์มัลลิน 0.5% เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยการฉีดเข้าตัวกุ้ง *P. argus* ภายหลังการฉีดจะพบการสร้างแบคทีเรียชนิดยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบรูปท่อน EMB-1 ในน้ำเลือดกุ้ง เมื่อได้รับการกระตุ้นครั้งที่ 2 และ 3 จะพบแบคทีเรียชนิดนี้โตเต็มที่ สูงขึ้นตามลำดับ Adams (1991) แสดงให้เห็นประสิทธิภาพของ *V. alginolyticus* ที่ฆ่าให้ตายด้วยความร้อน ในการชักนำแบคทีเรียชนิดยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบให้สูงขึ้น

ภายใน 1 วันหลังการแช่กุ้งกุลาดำในวัคซีนชนิดนี้ 4 ชม. โดยพบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ *V. alginolyticus* ได้ดีกว่า *V. anguillarum* และ *E. coli* ตามลำดับ

### 3. การทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค

หลังจากการเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 1. เป็นเวลา 90 วัน รวมกุ้งที่เหลือจากการเพาะเลี้ยงในแต่ละกลุ่ม นำมาทดสอบต่อความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค โดยใช้ *V. harveyi* สายพันธุ์ D331 พบว่า *V. harveyi* สายพันธุ์ D331 เป็นสายพันธุ์ที่เก่า และมีความรุนแรงในการติดโรคต่ำลง แม้จะใช้ปริมาณเชื้อที่สูงมากถึง  $5.85 \times 10^7$  CFU/ml จึงเปลี่ยน *V. harveyi* สายพันธุ์ใหม่ที่มีความรุนแรงมาก ได้แก่ *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 เป็นตัวเหนี่ยวนำให้เกิดโรคแทน พบว่า กุ้งทั้งสองกลุ่มตายหมดอย่างรวดเร็วภายใน 1 วัน จึงไม่สามารถตรวจสอบผลต่างระหว่างกุ้งทดลองสองกลุ่มได้ จำเป็นต้องหาค่า  $LC_{50}$  ของ *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 เพื่อนำไปใช้ในการทดลองเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 2.

ผลการหาค่า  $LC_{50}$  ของ *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 พบว่ามีค่า  $7.65 \times 10^5$ ,  $1.3 \times 10^5$ ,  $3.44 \times 10^4$  และ  $1.77 \times 10^4$  CFU/ml ที่ 24, 48, 72 และ 96 ชม. ตามลำดับ นำค่า  $LC_{50}$  ไปใช้ในการทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคหลังการเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 2. ผลปรากฏว่ากุ้งทั้งสองกลุ่มทดลองไม่ตาย เนื่องจากกุ้งหลังการเลี้ยงครั้งที่ 2. มีขนาด 6 - 7 กรัม ใหญ่กว่ากุ้งที่ใช้ทดสอบ  $LC_{50}$  (0.77 กรัม) ทำให้ปริมาณ *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 มีปริมาณน้อยไม่เพียงพอต่อการเกิดโรคในกุ้งหลังการเลี้ยงครั้งที่ 2. จึงเพิ่มปริมาณเชื้อทดสอบเป็น 100 เท่าของ  $LC_{50}$  ที่ 48 ชม. และตรวจสอบการตายสะสมทุกวันเป็นเวลา 10 วัน พบว่าการตายสะสมของกุ้งกลุ่มควบคุม (64.5%) สูงกว่ากลุ่มโปรไบโอติก (45.7%) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% โดยพบ *Bacillus* สายพันธุ์ S11 ทั้งในน้ำ และลำไส้ของกุ้งกลุ่มโปรไบโอติกตลอดการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค ส่วนในกลุ่มควบคุมตรวจไม่พบ *Bacillus* สายพันธุ์ S11 ตรวจนับจำนวน *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 ทั้งในน้ำ และลำไส้กุ้ง พบว่า ในวันที่ 10 ของการทดสอบความต้านทานกับการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค กลุ่มโปรไบโอติกมีจำนวน *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 ลดลง และน้อยกว่ากลุ่มควบคุม แสดงว่า *Bacillus* สายพันธุ์ S11 สามารถลดจำนวน *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 ในลำไส้ได้โดยการสร้างสารต่อต้านจุลชีพ (วรณิกา เพ็ญนัทธ์, 2539) หรือแย่งจับเกาะผนังลำไส้ นำเฮปโทแพนแครีซ (hepatopancreas) กุ้งที่ตายมาเพาะแยกเชื้อสาเหตุการเกิดโรค ไปทดสอบลักษณะทางชีวเคมีพบว่า เชื้อที่เป็นสาเหตุการตายของกุ้งเป็นเชื้อเดียวกับ *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 ที่ใช้ในการเหนี่ยวนำในการเกิดโรค

ทดสอบภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์ และสารน้ำ หลังการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค ด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 เป็นเวลา 10 วัน (ตารางที่ 15.) พบว่า ประสิทธิภาพการกลืนทำลายสิ่งแปลกปลอมโดยวิธีฟาโกไซโตซิส ได้แก่ เปอร์เซ็นต์ฟาโกไซโตซิส, ฟาโกไซติก อินดิคซ์ และจำนวนเม็ดลาเท็กซ์ ที่ถูก

กินต่อเซลล์ของกลุ่มโพรไบโอติก สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ส่วนจำนวนเม็ดเลือดรวม, ฟีนอลออกซิเดส และฤทธิ์ต้านแบคทีเรียไม่มีความแตกต่างระหว่างสองกลุ่มทดลอง แสดงให้เห็นว่าทั้งกลุ่มโพรไบโอติก สามารถต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 เกิดจาก *Bacillus* สายพันธุ์ S11 กระตุ้นภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์ในกุ้งกุลาดำ และ *Bacillus* สายพันธุ์ S11 อาจสร้างสารต่อต้านจุลชีพ หรือแย่งพื้นที่จับผนังลำไส้กับเชื้อก่อโรค เมื่อเปรียบเทียบระหว่างภูมิคุ้มกันหลังการเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 2. หรือก่อนเหนี่ยวนำให้เกิดโรค (ตารางที่ 13.) กับหลังเหนี่ยวนำให้เกิดโรค (ตารางที่ 15.) จะพบว่าโพรไบโอติก สามารถชักนำประสิทธิภาพการกลืนทำลายให้สูงขึ้น แตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในสภาวะที่มีการติดเชื้อ

เมื่อรวมกลุ่มควบคุมและกลุ่มโพรไบโอติกเปรียบเทียบปัจจัยทางภูมิคุ้มกันก่อนและหลังเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 เป็นเวลา 10 วัน (ตารางที่ 16.) พบว่าหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วยแบคทีเรีย จำนวนเม็ดเลือดรวมจะลดลง ส่วนเปอร์เซ็นต์ฟาโกไซโตซิส, ฟาโกไซติก อินดิคซ์ และ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจะสูงขึ้น ในขณะที่ฟีนอลออกซิเดส และจำนวนเม็ดลาเท็กซ์ที่ถูกกินต่อเซลล์ไม่มีการเปลี่ยนแปลง จำนวนเม็ดเลือดที่ลดลงชี้ให้เห็นว่าเกิดการตอบสนองป้องกันสิ่งแปลกปลอมของเซลล์เม็ดเลือดกับเชื้อก่อโรค สอดคล้องกับ Smith และ Söderhäll (1983) ที่รายงานว่า จำนวนเม็ดเลือดรวมในกุ้งน้ำจืด *Astacus astacus* และ ปู *Carcinus maenas* มีจำนวนลดลงเมื่อฉีดสิ่งแปลกปลอมเข้าในตัวสัตว์ แสดงถึงการตอบสนองทางเซลล์กับสิ่งแปลกปลอม ส่วนประสิทธิภาพการกลืนทำลายโดยวิธีฟาโกไซโตซิสที่สูงขึ้น สอดคล้องกับ Hose และคณะ (1990) , McKay และ Jenkin (1970) และ Smith และ Söderhäll (1983) ที่รายงานพบการกลืนทำลายโดยวิธีฟาโกไซโตซิส เกิดขึ้นเมื่อได้รับแบคทีเรียก่อโรค

โดยสรุป *Bacillus* สายพันธุ์ S11 มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกที่ดีสำหรับกุ้งกุลาดำ สอดคล้องกับการรายงานลักษณะที่ดีของโพรไบโอติกโดย Fuller (1989) และ Havenaar และ Huis in't Veld (1992) กล่าวคือ *Bacillus* สายพันธุ์ S11 เป็นสายพันธุ์ที่ให้ประโยชน์ต่อกุ้งกุลาดำช่วยเพิ่มการเจริญเติบโต และกระตุ้นภูมิคุ้มกันเพิ่มความต้านทานต่อโรค (สรุปในตารางที่ 17.) ไม่เป็นสายพันธุ์ที่ก่อโรคในกุ้งและคน อยู่ในลักษณะเซลล์ที่มีชีวิตและมีปริมาณมากในอาหาร สามารถมีชีวิตอยู่ได้ในลำไส้กุ้ง มีชีวิตอยู่ได้นานภายใต้สภาพการเก็บรักษา และผลดีง่าย นอกจากนี้ *Bacillus* สายพันธุ์ S11 ยังสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอส อะไมเลส และไลเปส (วรรณิกา เพ็ญนัทธ์, 2539) ซึ่งช่วยย่อย slime และ biofilms ในบ่อกุ้ง (Moriarty, 1998) โดยเฉพาะ biofilms ที่สร้างโดย *V. harveyi* ตามผิวของบ่อ ซึ่งเป็นตัวการสำคัญในการติดเชื้อของกุ้งวัยอ่อน (Karunasagar และคณะ, 1996)

ตารางที่ 17. สรุปผลการกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรคในกิ้งสุกุลที่เนยสดด้วยองค์ประกอบเซลล์หรือเซลล์ของ  
แบคทีเรียแกรมบวกในตัวสัตว์ทดลอง (*in vivo*)

ชนิดกิ้ง	รูปแบบสารกระตุ้น	ปัจจัยทางภูมิคุ้มกัน ที่ทดสอบ	การเพิ่มของปัจจัย ทางภูมิคุ้มกัน	รายการอ้างอิง
กิ้งกุลาดำ <i>P. monodon</i>	<i>Clostridium</i> <i>butyricum</i> ที่ทำให้ตายด้วย ฟอร์มัลลิน	- เบอร์เซนต์ฟาโกไซโตซิส - ฟาโกไซติก อินดิคซ์ - แบคทีเรียซิน	+ + +	จันทนา นิธิเมธาโชค (2539)
กิ้ง <i>P. japonicus</i>	เปปทิ โดไกลแคน สกัดจาก <i>Bifidobacterium</i> <i>thermophilum</i>	- เบอร์เซนต์ฟาโกไซโตซิส - ฟาโกไซติก อินดิคซ์ - เม็ดลาเท็กซ์ที่ถูกกิน ต่อเซลล์	- + -	Itami และคณะ (1998)
กิ้งกุลาดำ	<i>Bacillus</i> สายพันธุ์ S11 ในรูปเซลล์ที่มี ชีวิต	- เบอร์เซนต์ฟาโกไซโตซิส - ฟาโกไซติก อินดิคซ์ - เม็ดลาเท็กซ์ที่ถูกกิน ต่อเซลล์ - ฟีนอลออกซิเดส - ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย	+ + - + -	สมบัติ รักประทานพร (2542)

+ ให้ผลบวก

- ให้ผลลบ

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการทดลอง

1. *Bacillus* สายพันธุ์ S11 สามารถเพิ่มน้ำหนักตัว และการรอดชีวิตของกุ้งกุลาดำ เมื่อเสริมโปรไบโอติกให้กุ้งระยะ postlarvae แต่ไม่มีผลเพิ่มน้ำหนัก และการรอดชีวิตในกุ้งระยะวัยรุ่น
2. *Bacillus* สายพันธุ์ S11 มีผลกระตุ้นประสิทธิภาพการกินทำลายสิ่งแปลกปลอมโดยวิธีฟาโกไซโตซิส ได้แก่ เปอร์เซ็นต์ฟาโกไซโตซิส และ ฟาโกไซติก อินดิเคซ์ และเพิ่มปริมาณฟีนอลออกซิเดสในเม็ดเลือดกุ้ง
3. ทดสอบความต้านทานต่อการเหนียวน้ำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 พบว่า กุ้งกลุ่มที่ได้รับ *Bacillus* สายพันธุ์ S11 เสริมในอาหาร มีเปอร์เซ็นต์การตายสะสม (45.7%) ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับโปรไบโอติก (64.5%)
4. *Bacillus* สายพันธุ์ S11 สามารถชักนำให้ เปอร์เซ็นต์ฟาโกไซโตซิส, ฟาโกไซติก อินดิเคซ์ และจำนวนเม็ดลาเท็กซ์ที่ถูกกินต่อเซลล์ สูงขึ้นเมื่อเหนียวน้ำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526
5. การเหนียวน้ำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 จะมีผลกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งทั้งสองกลุ่มการทดลอง คือ จำนวนเม็ดเลือดรวมของกุ้งจะลดลง ส่วนเปอร์เซ็นต์ฟาโกไซโตซิส, ฟาโกไซติก อินดิเคซ์ และ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจะสูงขึ้น
6. การเพิ่มความต้านทานต่อการเหนียวน้ำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 ของโปรไบโอติกไม่มีความสัมพันธ์กับภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์ หรือสารน้ำ

## ข้อเสนอแนะ

จากการทดลองพบว่าภูมิคุ้มกันโรคในกลุ่มโพรไบโอติกมีแนวโน้มสูงกว่ากลุ่มควบคุม จึงควรมีการศึกษาต่อเพิ่มเติม ดังนี้

1. ทำการศึกษาซ้ำ โดยใช้กุ้งจากแหล่งต่างๆ เพื่อศึกษาความหลากหลายทางภูมิคุ้มกัน
2. ศึกษาเปรียบเทียบภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์ และสารน้ำอื่นๆ เช่น ซูบเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน, แอคกลูตินิน เป็นต้น
3. ศึกษาการทำงานร่วมกันระหว่างภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์ กับ ภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยสารน้ำ ในกลุ่มที่ได้รับ และไม่ได้รับโพรไบโอติก
4. ศึกษาทากลไกการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของโพรไบโอติกในกุ้งกุลาดำ
5. ศึกษาผลขององค์ประกอบเซลล์ และสารที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ S11 ต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ
6. ศึกษาปริมาณการใช้ *Bacillus* สายพันธุ์ S11 ต่ำสุดผสมในอาหารกุ้ง เพื่อลดต้นทุน และแรงงานในการเตรียมเซลล์ *Bacillus* สายพันธุ์ S11



## รายการอ้างอิง



### ภาษาไทย

- กรมเศรษฐกิจการพาณิชย์. 2542. ยอดส่งออกกุ้งแช่แข็งไทย ปี 2541. วารสารเครือเจริญโภคภัณฑ์ ข่าวกุ้ง 128 : 4.
- คมสัน สีสาคทกิจ. 2539. กฎหมายใหม่ของญี่ปุ่นกับการส่งออกกุ้งกุลาดำของไทย. วิชาการปริทัศน์ 2: 6-8.
- จันทนา นิธิเมธาโชค. 2539. การเสริมภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* โดย *Clostridium butyricum*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ชลอ ลิมสุวรรณ. 2535. คัมภีร์การเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. กรุงเทพมหานคร: ฐานเศรษฐกิจ.
- ทีมงานข่าวกุ้ง. 2542. สถานการณ์เลี้ยงกุ้งโลก ปี 2541. วารสารเครือเจริญโภคภัณฑ์ ข่าวกุ้ง 129 : 1-4.
- ธัญญา พันธุ์ฤทธิ์ดำ. 2541. ระบบหมุนเวียนน้ำแบบปิดที่มีระบบดีไนตริฟิเคชันสำหรับการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*). วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- นันทริกา ชันชื้อ. 2540. ชีววิทยาของกุ้งกุลาดำ. ใน ศุภชัย นิลวานิช (ผู้รวบรวม), กุ้งกุลาดำ ทางเลือก-ทางรอด, หน้า 15-24. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์มติชน.
- ประจวบ หล้าอุบล. 2533. กุ้ง. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ภัทราพร ยุทธชาติ, ศุภยงค์ วรภูมิคุณชัย และ ประเสริฐ สันตินานาเลิศ. 2533. การศึกษาแบคทีเรียที่ประจำอยู่ในทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำ. วารสารสงขลานครินทร์ 12 : 151-157.
- วรรณิกา เพ็ญนัฏกร. 2539. การใช้แบคทีเรียเป็นโปรไบโอติกเสริมในอาหารกุ้ง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- วัลลภ คงเพิ่มพูน. 2534. กุ้งกุลาดำ. กรุงเทพมหานคร: โครงการหนังสือเกษตรชุมชน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์. 2539. จุลินทรีย์กับการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. วารสารวาริชศาสตร์. 3 : 42-51.

### ภาษาอังกฤษ

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

- Adema, C.M., van Deutekom-Mulder, E.C., van der Knaap, W.P.W., Meuleman, E.A. and Sminia, T. 1991. Generation of oxygen radicals in hemocytes of the snail *Lymnaea stagnalis* in relation to the rate of phagocytosis. Dev. Comp. Immunol. 15: 17-26.
- Aspan, A. and Söderhäll, K. 1995. The prophenoloxidase activating system in invertebrates: Assays of the prophenoloxidase activating enzyme (a serine proteinase) and phenoloxidase. In Stolen, J.R., et al (eds.), Techniques in fish immunology-4, pp. 161-171. NJ, USA: SOS Publications.
- Austin, B., Baudet, E. and Stobie, M. 1992. Inhibition of bacterial fish pathogens by *Tetrasetelmis suecica*. J. Fish Dis. 15: 55-61.
- Austin, B., Stuckey, L.F., Robertson, P.A.W., Effendi, I. and Griffith, D.R.W. 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.
- Bachère, E., Mialhe, E. and Rodriguez, J. 1995. Identification of defence effectors in the haemolymph of crustaceans with particular reference to the shrimp *Penaeus japonicus* (Bate): prospects and applications. Fish Shellfish Immunol. 5: 597-612.
- Bang, F.B. 1962. Serological aspects of immunity in invertebrate. Nature. 196: 88-89.
- Baumann, P. and Schubert, H.W. 1986. Vibrionaceae. In Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol 1. USA : Waverly Press, Inc.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.
- Byun, J.W., Park, S.C., Benno, Y. and Oh, T.K. 1997. Probiotic effect of *Lactobacillus* sp. DS-12 in flounder (*Paralichthys olivaceus*). J. Gen. Appl. Microbiol. 43: 305-308.
- Cerenius, L. and Söderhäll, K. 1995. Crustacean immunity and complement; A premature comparison ?. Amer. Zool. 35: 60-67.
- Cerenius, L., Liang, Z., Duvic, B., Keyser, P., Hellman, U., Palva, E.T., Iwanaga, S. and Söderhäll, K. 1994. Structure and biological activity of a 1,3- $\beta$ -D-glucan-binding protein in crustacean blood. J. Biol. Chem. 269: 29462-29467.
- Chen, J.C., Chen, K.W. and Chen, J.M. 1996. Effects of saponin on survival, growth, molting and feeding of *Penaeus japonicus* juveniles. Aquaculture 144 : 165-175.

- Chisholm, J.R.S. and Smith, V.J. 1995. Comparison of antibacterial activity in the hemocytes of different crustacean species. Comp. Biochem. Physiol. 110A : 39-45.
- Destoumieux, D., Bulet, P., Loew, D., Van Dorsselaer, A., Rodriguez, J. and Bachère, E. 1997. Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). J. Bio. Chem. 272 : 28398-28406.
- Douillet, P.A. and Langdon, C.J. 1994. Use of a probiotic for the culture of larvae of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg). Aquaculture. 119: 25-40.
- Evans, E.E., Cushing, J.E., Sawyer, S., Weinheimer, P.F., Acton, R.T. and McNeely, J.L. 1969 a. Induced bactericidal response in the california spiny lobster *Panulirus interruptus*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 132 : 111-113.
- Evans, E.E., Painter, B., Evans, M.L., Weinheimer, P. and Acton, R.T. 1968. An induced bactericidin in the spiny lobster, *Panulirus argus*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 128: 394-397.
- Evans, E.E., Weinheimer, P.F., Painter, B., Acton, R.T. and Evans, M.L. 1969b. Secondary and tertiary responses of the induced bactericidin from the west indian spiny lobster, *Panulirus argus*. J. Bacteriol. 98: 943-946.
- Famularo, G., Moretti, S., Marcellini, S. and De Simone, C. 1997. Stimulation of immunity by probiotics. In Fuller, R. (ed.), Probiotics 2: Applications and practical aspects, pp. 133-161. London : Chapman & Hall.
- Flegal, T.W., Fegan, D.F., Kongsom, S., Vuthikomudomkit, S., Sriurairatana, S., Boonyaratpalin, S., Chantanachookhin, C., Vickers, J.E. and Macdonald, O.D. 1992. Occurrence, diagnosis and treatment of shrimp diseases in Thailand. In Fulks, W. and Main, K.L. (eds.), Diseases of cultured penaeid shrimp in Asia and the United States, pp. 57-112. Hawaii : The Oceanic Institute.
- Fox, S.M. 1988. Probiotics: intestinal inoculants for production animals. Vet. Med. 83: 806-830.
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. J. Appl. Bacteriol. 66: 365-378.
- Fuller, R. 1992. History and development of probiotics. In Fuller, R. (ed.), Probiotics the scientific basis, 1<sup>st</sup> ed, pp. 1-8. London: Chapman & Hall.
- Fuller, R. 1999. Probiotics for farm animals. In Tannock, G.W. (ed.), Probiotics: A critical review, pp. 15-22. Norfolk : Horizon Scientific Press.
- Gildberg, A., Johansen, A. and Børgwald, J. 1995. Growth and survival of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry given diets supplemented with fish protein hydrolysate and lactic

- acid bacteria during a challenge trial with *Aeromonas salmonicida*. Aquaculture. 138: 23-34.
- Gram, L., Melchiorson, J., Spanggaard, B., Huber, I. and Nielsen, T.F. 1999. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. Appl. Environ. Microbiol. 65: 969-973.
- Greenberg, A.E., Clesceri, L.S. and Eaton, A.D. 1992. Standard methods for the examination of water and wastewater. 18<sup>th</sup> ed. , part 8000 toxicity. Washington : American Public Health Association, American Water Works Association and Water Environment Federation.
- Havenaar, R. and Huis in't Veld, J.H.J. 1992. Probiotics: a general views. In Wood, B.J.W. (ed.), The lactic acid bacteria in health & disease, vol 1, pp. 151-170. London: Elsevier Applied Science.
- Havenaar, R. and Spanhaak, S. 1994. Probiotics from an immunological point of view. Current Opinion in Biotechnology. 5 : 320-325.
- Holzapfel, W.H., Haberer,P., Snel, J., Schillinger, U. and Huis in't Veld, J.H.J. 1998. Overview of gut flora and probiotics. Int. J. Food Microbiol. 41: 85-101.
- Hose, J.E., Martin, G.G. and Gerard, A.S. 1990. A decapod hemocyte classification scheme integrating morphology, cytochemistry and function. Biol. Bull. 178 : 33-45.
- Itami, T., Asano, M., Tokushige, K., Kubono, K., Nakagawa, A., Takeno, N., Nishimura, H., Maeda, M., Kondo, M. and Takahashi, Y. 1998. Enhancement of disease resistance of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, after oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. Aquaculture. 164: 277-288.
- Itami, T., Takahashi, Y., Tsuchihira, E. and Igusa, H. 1994. Enhancement of disease resistance of kuruma prawn *Penaeus japonicus* and increase in phagocytic activity of prawn hemocytes after oral administration of  $\beta$ -1,3-glucan (Schizophyllan). In Chou, L.M. et al (eds.), The third asian fisheries forum, pp. 375-379. Manila : Asian Fisheries Society.
- Itami, T., Takahashi, Y., Yoneoka, K. and Yan, Y. 1991. Survival of larval giant tiger prawns *Penaeus monodon* after addition of killed *Vibrio* cells to a microencapsulated diet. J. Aquat. Anim. Health. 3: 151-152.

- Johansson, M.W. 1995. Cellular immune reactions in crustaceans: methods for in vitro studies. In Stolen, J.R., et al (eds.), Techniques in fish immunology-4, pp. 147-154. NJ, USA: SOS Publications.
- Johansson, M.W. and Söderhäll, K. 1989. Cellular immunity in crustaceans and the proPO system. Parasitol. Today. 5: 171-176.
- Karunasagar, I., Otta, S.K. and Karunasagar, I. 1996. Biofilm formation by *Vibrio harveyi* on surfaces. Aquaculture 140 : 241-245.
- Klein, J. 1982. Immunology: The science of self-nonself discrimination. USA : A Wiley-Interscience publication.
- Kuo, M.J. and Alexander, M. 1967. Inhibition of the lysis of fungi by melanins. J. Bacteriol. 94 : 624-629.
- Lackie, A.M. 1980. Invertebrate immunity. Parasitology. 80: 393-412.
- Lilly, D.M. and Stillwell, R.H. 1965. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. Science. 147 : 744-748.
- McCracken, V.J. and Gaskins, H.R. 1999. Probiotics and the immune system. In Tannock, G.W. (ed.), Probiotics: A critical review, pp. 85-111. Norfolk : Horizon Scientific Press.
- McKay, D. and Jenkin, C.R. 1969. Immunity in the invertebrates. II. Adaptive immunity in the crayfish (*Parachaeraps bicarinatus*). Immunology. 17 : 127-137.
- McKay, D. and Jenkin, C.R. 1970. Immunity in the invertebrates. The role of serum factors in phagocytosis of erythrocytes by haemocytes of the freshwater crayfish (*Parachaeraps bicarinatus*). Aust. J. exp. Biol. med. Sci. 48 : 139-150.
- McKay, D., Jenkin, C.R. and Rowley, D. 1969. Immunity in the invertebrates. I. Studies on the naturally occurring haemagglutinins in the fluid from invertebrates. Aust. J. exp. Biol. med. Sci. 47 : 125-134.
- Menasveta, P., Aranyakanonda, P., Rungsupa, S. and Moree, N. 1989. Maturation and larviculture of penaeid prawns in closed recirculation seawater system. Aquaculture Engineering. 8 : 357-368.
- Metchnikoff, E. 1907. The prolongation of life. London: Heinemann. cited in Fuller, R. (ed.), Probiotics the scientific basis. 1<sup>st</sup> ed. London: Chapman & Hall, 1992.
- Moriarty, D.J.W. 1998. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. Aquaculture. 164 : 351-358.
- Nappi, A.J. 1973. The role of melanization in the immune reaction of larvae of *Drosophila algonquin* against *Pseudeucoila bochei*. Parasitology 66 : 23-32.

- Noga, E.J., Arroll, T.A. and Fan, Z. 1996. Specificity and some physicochemical characteristics of the antibacterial activity from blue crab *Callinectes sapidus*. Fish Shellfish Immunol. 6 : 403-412.
- Parker, R.B. 1974. Probiotics, the other half of the antibiotic story. Anim. Nutr. Health. 29 : 4-8.
- Paterson, W.D. and Stewart, J.E. 1974. In vitro phagocytosis by hemocytes of the american lobster (*Homarus americanus*). J. Fish. Res. Board Can. 31 : 1051-1056.
- Pawelek, J.M. and Körner, A.M. 1982. The biosynthesis of mammalian melanin. American Scientist 70 : 136-145.
- Pawelek, J.M. and Lerner, A.B. 1978. 5,6-Dihydroxyindole is a melanin precursor showing potent cytotoxicity. Nature 276 : 627-628.
- Perdigon, G., Alvarez, S., Rachid, M., Agüero, G. and Gobbato, N. 1995. Symposium: Probiotic bacteria for human: Clinical systems for evaluation of effectiveness, Immune system stimulation by probiotics. J. Dairy Sci. 78 : 1597-1606.
- Pick, E. and Keisari, Y. 1980. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. J. Immunol. Methods. 38 : 161-170.
- Pye, A.E. 1974. Microbial activation of prophenoloxidase from immune insect larvae. Nature 251 : 610-612.
- Rafter, J.J. 1995. The role of lactic acid bacteria in colon cancer prevention. Scand. J. Gastroenterol. 30 : 497-502.
- Ratcliffe, N.A., Leonard, C. and Rowley, A.F. 1984. Prophenoloxidase activation: Nonself recognition and cell cooperation in insect immunity. Science 226 : 557-559.
- Ratcliffe, N.A., Rowley, A.F., Fitzgerald, S.W. and Rhodes, C.P. 1985. Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances. Inter. Rev. Cytology. 97 : 183-350.
- Reade, P.C. 1968. Phagocytosis in invertebrates. Aust. J. exp. Biol. med. Sci. 46 : 219-229.
- Rengpipat, S., Phianphak, W., Piyatiratitivorakul, S. and Menasveta, P. 1998a. Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. Aquaculture. 167 : 301-313.
- Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitivorakul, S. and Menasveta, P. 1998b. Probiotics in aquaculture: a case study of probiotics for larvae of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). In Flegel, T.W. (ed.), Advances in shrimp biotechnology, pp. 177-181. Bangkok : National Center for Genetic Engineering and Biotechnology.

- Riquelme, C., Araya, R., Vergara, N., Rojas, A., Guaita, M. and Candia, M. 1997. Potential probiotic strains in the culture of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). Aquaculture. 154 : 17-26.
- Siwicki, A.K., Anderson, D.P. and Rumsey, G.L. 1994. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. Vet. Immunol. Immunopathol. 41 : 125-139.
- Smith, P. and Davey, S. 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 Chisholm, J.R.S. 1992. Non-cellular immunity in crustaceans. Fish Shellfish Immunol. 2 : 1-31.
- Smith, V.J. and Söderhäll, K. 1983.  $\beta$ -1,3-glucan activation of crustacean hemocytes *in vitro* and *in vivo*. Biol. Bull. 164 : 299-314.
- Smith, V.J. and Söderhäll, K. 1991. A comparison of phenoloxidase activity in the blood of marine invertebrates. Dev. Comp. Immunol. 15 : 251-261.
- Snieszko, S.F. 1973. Diseases of fishes and their control in the U.S. In: The Two Lakes Fifth Fishery Management Training Course Report, pp. 55-66. London : Jansen. cited in Lightner, D.V. and Redman, R.M. 1998. Shrimp diseases and current diagnostic methods. Aquaculture. 164 : 201-220.
- Söderhäll, K. 1983.  $\beta$ -1,3-glucan enhancement of protease activity in crayfish hemocyte lysate. Comp. Biochem. Physiol. 74B : 221-224.
- Söderhäll, K. and Unestam, T. 1979. Activation of serum prophenoloxidase in arthropod immunity. The specificity of cell wall glucan activation and activation by purified fungal glycoproteins of crayfish phenoloxidase. Can. J. Microbiol. 25 : 406-414.
- Song, Y.L. and Hsieh, Y.T. 1994. Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances: analysis of reactive oxygen species. Dev. Comp. Immunol. 18 : 201-209.
- Sritunyalucksana, K. 1995. Study of the humoral defense factors in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. Master thesis, Mahidol University.
- Stewart, J.E. and Zwicker, B.M. 1972. Natural and induced bactericidal activities in the hemolymph of the lobster, *Homarus americanus*: products of hemocyte-plasma interaction. Can. J. Microbiol. 18 : 1499-1508.
- Sung, H.H. and Song, Y.L. 1996. Tissue location of *Vibrio* antigen delivered by

- immersion to tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Aquaculture. 145 : 41-54.
- Sung, H.H., Kou, G.H. and Song, Y.L. 1994. Vibriosis resistance induced by glucan treatment in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Fish Pathology. 29 : 11-17.
- Sung, H.H., Song, Y.L. and Kou, G.H. 1991. Potential uses of bacterin to prevent shrimp vibriosis. Fish Shellfish Immunol. 1 : 311-312.
- Sung, H.H., Yang, Y.L. and Song, Y.L. 1996. Enhancement of microbicidal activity in the tiger shrimp *Penaeus monodon* via immunostimulation. J. Crustacean Biol. 16 : 278-284.
- Thörnqvist, P.-O. and Söderhäll, K. 1997. Crustacean immune reactions, a short review. In Flegel, T.W. and MacRae, I.H. (eds.), Diseases in asian aquaculture III, pp.203-218. Manila: Asian Fisheries Society.
- Unestam, T. and Söderhäll, K. 1977. Soluble fragments from fungal cell walls elicit defence reactions in crayfish. Nature. 267 : 45-46.
- Van Harrevald, A. 1936. A physiological solution for freshwater crustacean. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 34 : 428.
- Vargas-Albores, F. 1995. The defense system of brown shrimp (*Penaeus californiensis*): Humoral recognition and cellular responses. J. Mar. Biotechnol. 3: 153-156.
- Vargas-Albores, F., Hernandez-López, J., Gollas-Galvan, T., Montaña-Pérez, K., Jiménez-Vega, F. and Yepiz-Plascencia, G. 1998. Activation of shrimp cellular defence functions by microbial products. In Flegel, T.W. (ed.), Advances in shrimp biotechnology, pp. 161-166. Bangkok : National Center for Genetic Engineering and Biotechnology.
- Weinheimer, P.F., Acton, R.T., Sawyer, S. and Evans, E.E. 1969. Specificity of the induced bactericidin of the west indian spiny lobster, *Panulirus argus*. J. Bacteriol. 98 : 947-948.
- Zlotkin, E., Gurevitz, M. and Shulov, A. 1973. The toxic effects of phenoloxidase from the haemolymph of tenebrionid beetles. J. Insect Physiol. 19 : 1057-1065.



## ภาคผนวก ก

### อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดลอง

#### 1. อาหารแข็งทริปติกชอย (Tryptic soy agar)

ทริปโตน (Tryptone)	17.0	กรัม
ผงสกัดถั่วเหลือง (Soytone)	3.0	กรัม
เดกซ์โทรส (Dextrose)	2.5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ )	2.5	กรัม
วุ้นผง	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มล.
ปรับพีเอชเป็น $7.3 \pm 0.2$		

#### 2. อาหารเหลวทริปติกชอย (Tryptic soy broth)

ทริปโตน (Tryptone)	17.0	กรัม
ผงสกัดถั่วเหลือง (Soytone)	3.0	กรัม
เดกซ์โทรส (Dextrose)	2.5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ )	2.5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มล.
ปรับพีเอชเป็น $7.3 \pm 0.2$		

#### 3. อาหารเหลวนิวเตรียนท์ (Nutrient broth)

เปปโตน (Peptone)	5.0	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	3.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มล.
ปรับพีเอชเป็น 6.8 - 7.0		

#### 4. อาหารแข็งเบรนฮาร์ทอินฟิวชัน (Brain heart infusion broth)

ผงสกัดสมองวัว (Calf Brain, Infusion from)	200.0	กรัม
ผงสกัดเนื้อเยื่อหัวใจ (Beef Heart, Infusion from)	250.0	กรัม
โปรติเอสเปปโตน (Proteose peptone)	10.0	กรัม

เดกซ์โทรส (Dextrose)	2.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	2.5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มล.
ปรับพีเอชเป็น 7.4 ± 0.2		

5. อาหารแข็งไทโอซัลเฟตซิเตรทบายซอลท์ (Thiosulfate citrate bile salt sucrose agar)

ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	5.0	กรัม
โปรติเอสเปปโตน เบอร์ 3 (Proteose peptone No.3)	10.0	กรัม
โซเดียมซิเตรท (HOC(COONa)(CH <sub>2</sub> COONa) <sub>2</sub> )	10.0	กรัม
โซเดียมไทโอซัลเฟต (Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	10.0	กรัม
ออกซ์กอล (Oxgall)	8.0	กรัม
แซคคาโรส	20.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	10.0	กรัม
เฟอร์ริกซิเตรท (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> Fe.5H <sub>2</sub> O)	1.0	กรัม
บรอมไทมอลบลู (Bromthymol blue)	0.04	กรัม
วุ้นผง	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มล.
ปรับพีเอชเป็น 8.6 ± 0.2		

6. อาหารทดสอบการเคลื่อนที่ (Motility medium)

ทริปโตน (Tryptone)	10.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม
วุ้นผง	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มล.
ปรับพีเอชเป็น 7.2 ± 0.2		

7. อาหารทริปโตเฟน (Tryptophane broth)

ทริปโตน (Tryptone)	8.0	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	5.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	2.5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มล.

## 8. อาหารไนเตรท (Nitrate broth)

ผงสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	5.0	กรัม
เปปโตเน (Peptone)	5.0	กรัม
โพแทสเซียมไนเตรท ( $KNO_3$ )	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มล.
ปรับพีเอชให้เป็น $7.0 \pm 0.2$		

## 9. อาหารเอ็มอาร์-วีพี (MR-VP medium)

บัฟเฟอร์เปปโตเน (Buffer peptone)	7.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ )	5.0	กรัม
กลูโคส	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มล.

## 10. อาหารทดสอบน้ำตาล

เปปโตเน (Peptone)	10.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ ( $NaCl$ )	5.0	กรัม
บรอมโทมอลบลู (Bromthymol blue)	0.04	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มล.

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำแบ่งเป็นส่วนๆ และเติมน้ำตาลที่ใช้ทดสอบ 1% ได้แก่ กลูโคส ซูโครส อะราบิโนส แมนโนส แล็กโตส และเซลโลไบโอส นำไปปรับพีเอชเป็น  $7.4 \pm 0.2$  โดยที่แล็กโตส ซูโครส และ อะราบิโนส ทำให้ปลอดเชื้อโดยวิธีการกรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมครอน

## 11. อาหารซิมมอนส์ซิเตรท (Simmon's citrate agar)

แมกนีเซียมซัลเฟต ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	0.2	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต ( $(NH_4)_2SO_4$ )	10.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ )	1.0	กรัม
โซเดียมซิเตรท ( $HOC(COONa)(CH_2COONa)_2$ )	2.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ ( $NaCl$ )	5.0	กรัม
บรอมโทมอลบลู (Bromthymol blue)	0.08	กรัม
วุ้นผง	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มล.
ปรับพีเอชเป็น $8.6 \pm 0.2$		

หมายเหตุ อาหารเลี้ยงเชื้อทุกชนิดนี้ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน (15 ปอนด์/ตารางนิ้ว 121 ° ซ 15 นาที) ยกเว้นอาหารแข็งไทโอซัลเฟตซีเตรทบายซอลท์

12. อาหารเลี้ยงเม็ดเลือด M-199

M-199 (2x)	500	มล.
สารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 11% (w/v)	100	มล.
สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 0.9 % (w/v)	100	มล.
สารละลายแอล-กลูตามีน (L-glutamine) 1.5 % (w/v)		
แบ่งใส่หลอดเล็กๆ เก็บแช่แข็ง	10	มล.
Hepes	2.38	กรัม/ลิตร
สารละลายเกลือแร่ (Salt mixture)*	100	มล.
น้ำกลั่น	190	มล.
ปรับพีเอชเป็น 7.6 ด้วยสารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต ( $\text{NaHCO}_3$ ) 7.5 %		
กรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมครอน เก็บที่ 4 ° ซ		
<u>หมายเหตุ</u> * สารละลายเกลือแร่ ประกอบด้วย		
โปแตสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.4	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	3.0	กรัม
แมกนีเซียมคลอไรด์ ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	3.3	กรัม
โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	0.05	กรัม
น้ำกลั่น	100	มล.

13. อาหารเลี้ยงเม็ดเลือด MC-199 (เตรียมก่อนใช้ทุกครั้ง)

อาหารเลี้ยงเม็ดเลือด M-199	100	มล.
แอล-ซิสเตอีน (L-cysteine)	5	กรัม
ปรับพีเอชเป็น 7.6 ด้วย 6N NaOH กรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมครอน		

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ข

### สารละลายที่ใช้ในการทดลอง

#### 1. สารละลายบัฟเฟอร์ cacodylate (Smith และ Söderhäll, 1991)

sodium cacodylate	0.01	โมลาร์
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	0.45	โมลาร์
แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O)	10	มิลลิโมลาร์
แมกนีเซียมคลอไรด์ (MgCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O)	26	มิลลิโมลาร์
ปรับพีเอชเป็น 7.0 เก็บในขวดสีชาที่ 4 °ซ		

#### 2. สารละลาย Van Harrevald 's salt (Van Harrevald, 1936)

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	0.205	โมลาร์
โปแตสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.0054	โมลาร์
แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl <sub>2</sub> )	0.0135	โมลาร์
แมกนีเซียมคลอไรด์ (MgCl <sub>2</sub> )	0.0026	โมลาร์
โซเดียมไบคาร์บอเนต (NaHCO <sub>3</sub> )	0.0022	โมลาร์
กรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมครอน เก็บที่ 4 °ซ		

#### 3. สารละลายกลูตารัลดีไฮด์ 2.5% (เตรียมก่อนใช้ทุกครั้ง)

กลูตารัลดีไฮด์ 25% (25% glutaraldehyde)	1	มล.
อาหารเลี้ยงเม็ดเลือด M-199	9	มล.
ปรับพีเอชเป็น 7.6 ด้วยสารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต 7.5 % (w/v)		

#### 4. น้ำยาดูดสเปกโตรินโดยวิธี Bradford

สีย้อมโคแมสซีบริลเลียนท์บลู (coomassie brilliant blue G-250)	100	มก.
เอทานอล 95%	50	มล.
กรดฟอสฟอริก 85% (85% phosphoric acid)	100	มล.

ละลายสีย้อมโคแมสซีบริลเลียนท์บลูในเอทานอล 95% หลังจากนั้นเติมกรดฟอสฟอริก ผสมให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร เก็บใส่ขวดสีชาที่ 4 °ซ

## 5. สารละลายแอมโมเนียมออกซาลेटคริสตอลไวโอเล็ต(Ammonium oxalate crystal violet solution)

สารละลาย ก

คริสตอลไวโอเล็ต (Crystal violet)	3.0	กรัม
เอทิลแอลกอฮอล์ 95%	20.0	มล.

สารละลาย ข

แอมโมเนียมออกซาลेट (Ammonium oxalate)	0.8	กรัม
น้ำกลั่น	50.0	มล.

ผสมสารละลาย ก และ ข เข้าด้วยกัน กรองก่อนนำไปใช้

## 6. สารละลายแกรมไอโอดีน (Gram's iodine solution)

ไอโอดีนคริสตอล	1.0	กรัม
โพแทสเซียมไอโอไดด์ (KI)	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	300.0	มล.

ละลายไอโอดีนและโพแทสเซียมไอโอไดด์ในน้ำกลั่นปริมาณน้อยๆ ก่อน แล้วเติมน้ำให้ครบเก็บไว้ในขวดสีชา

## 7. สารละลายอะซิโตนแอลกอฮอล์ (Acetone alcohol solution)

เอทิลแอลกอฮอล์ 95%	400.0	กรัม
อะซิโตน (Acetone)	300.0	กรัม

ผสมให้เข้ากันเก็บไว้ในขวดปิดฝาให้แน่น

## 8. สารละลายซาฟรานิน (Safranin solution)

ซาฟรานิน (Safranin)	0.25	กรัม
เอทิลแอลกอฮอล์ 95%	10.0	มล.
น้ำกลั่น	100.0	มล.

ละลายซาฟรานินด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ เติมน้ำกลั่นลงไปผสมให้เข้ากัน กรองก่อนนำไปใช้

## 9. สารละลายทดสอบเอนไซม์ไซโตโครมออกซิเดส (Cytochrome oxidase test)

N,N,N,N-tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มล.

ละลายส่วนผสมให้เข้ากันเก็บในขวดสีชา เตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง

## 10. สารละลายโคแวกซ์ (Kovac's reagent)

พาราไดเมทิลอะมีโนเบนซาลดีไฮด์	3.0	กรัม
บิวทานอล (Butanol)	75.0	มล.
กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น	25.0	มล.

ละลายพาราไดเมทิลอะมีโนเบนซาลดีไฮด์ในบิวทานอลที่อุณหภูมิ 50-55 °ซ ที่ให้เย็นแล้วเติมกรดไฮโดรคลอริกลงไป เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 °ซ

## 11. สารละลายทดสอบเมธิลคาร์บินอล (VP test solution)

สารละลาย ก

แอลฟาแนพทอล ( $\alpha$ -Naphthol)	5.0	มล.
เอธิลแอลกอฮอล์ 95%	100.0	มล.

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 °ซ

## 12. สารละลายทดสอบไนเตรท (Nitrate reagent)

สายละลาย ก

กรดซัลฟานิลิก (Sulfanilic acid)	8.0	กรัม
กรดอะซิติก (Acetic acid)	285.0	มล.
น้ำกลั่น	715.0	มล.

ละลายกรดซัลฟานิลิกในกรดอะซิติก เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 °ซ

สารละลาย ข

ไดเมทิลลามีน (N,N-dimethyl-1-naphthylamine)	6.0	กรัม
กรดอะซิติก	285.0	มล.
น้ำกลั่น	715.0	มล.

ผสมสารทั้งสองชนิด เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 °ซ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ค

### การให้อาหารกึ่งกุลาดำ



อัตราการให้อาหารสำเร็จรูป สำหรับการเลี้ยงกึ่งกุลาดำ และคุณภาพน้ำอยู่ในเกณฑ์ปกติ

ขนาดกึ่ง (กรัม)	ให้อาหารเป็น % น้ำหนักตัว	จำนวนครั้งที่ให้ต่อวัน
PL15-PL30	50	3-5
PL30 -1	20	3-5
1-5	10	3
5-10	6	3
10-20	4	4
20-30	3	4
มากกว่า 30	2	4

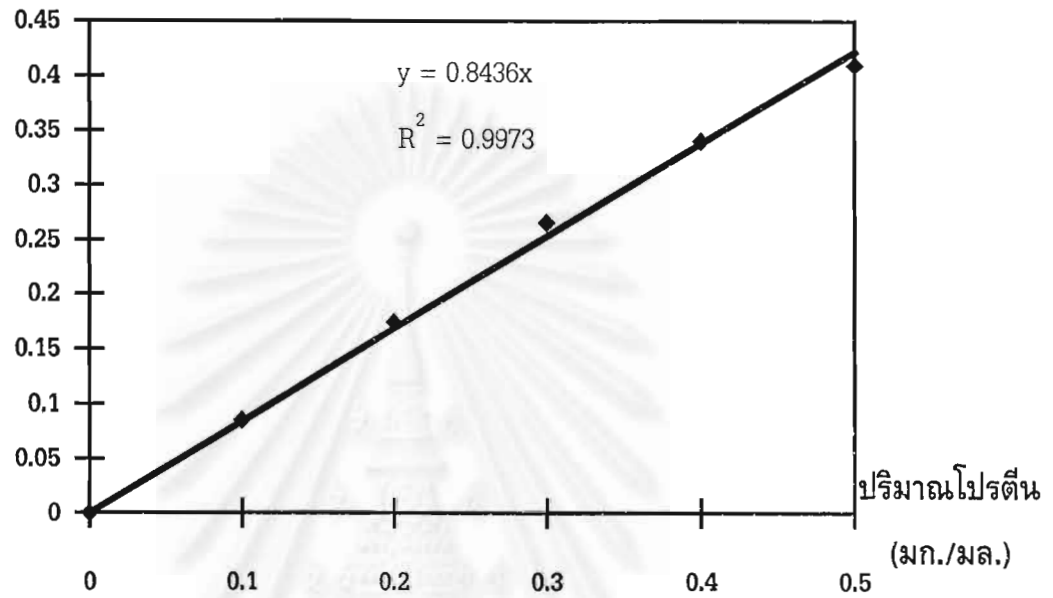
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก ง

กราฟมาตรฐานโปรตีน (bovine serum albumin) โดยวิธี Bradford

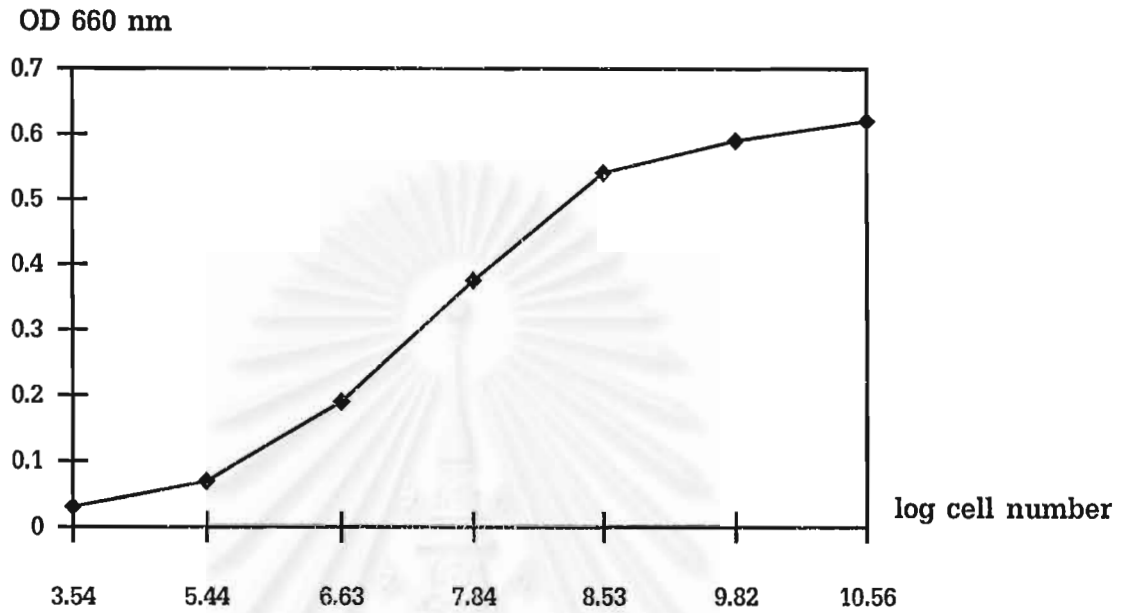
OD 595 nm



ความชัน = 0.8436

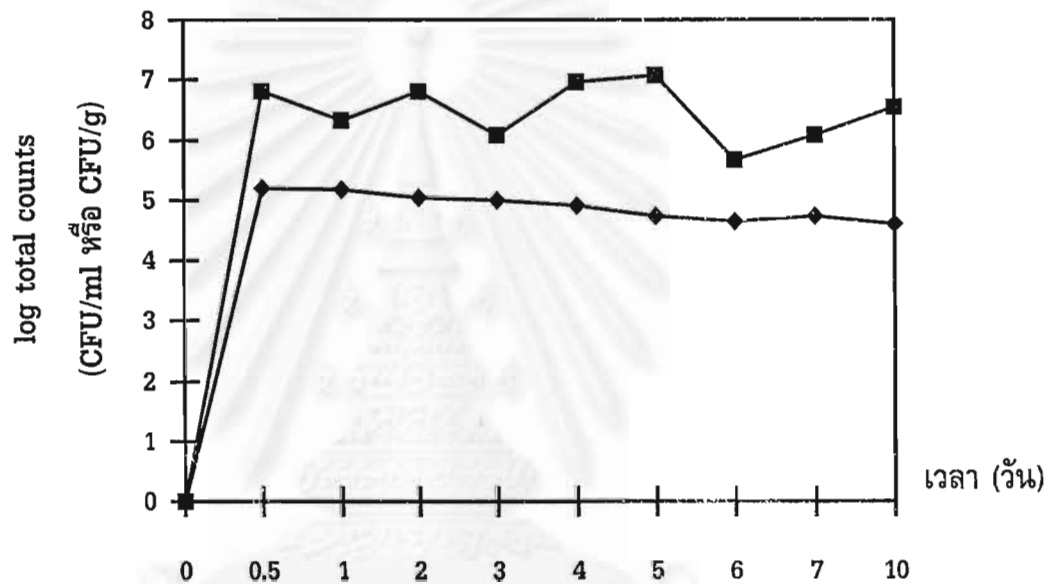
ภาคผนวก จ

กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง OD 660 nm กับ log cell number ของ *V. harveyi* สายพันธุ์ D331



### ภาคผนวก ฉ

กราฟแสดงจำนวน *Bacillus* สายพันธุ์ S11 ในน้ำ (◆) และลำไส้กุ้งกุลาดำ (■) ที่เวลาต่างๆ หลัง จากให้อาหารที่ผสม *Bacillus* สายพันธุ์ S11 (จำนวน *Bacillus* สายพันธุ์ S11 เท่ากับ  $1.57 \times 10^{10}$  CFU/g อาหารกุ้ง) ครั้งเดียวตอนเริ่มการทดลอง หลังจากนั้นให้อาหารปกติที่ไม่ผสม *Bacillus* สายพันธุ์ S11 ตลอด การทดลอง 10 วัน (เลี้ยงในถังพลาสติกขนาดบรรจุน้ำ 7 ลิตร จำนวน 3 ถัง )



ภาคผนวก ข

ค่าสถิติ

ค่า LC50 ที่ 24 ชม.

n	Dose (log CFU/ml)	Mort. corr(%)	probit	Total treated	Killed	Killed expected	CHI2 contribution
1	4.3800	2.4	3.732509	30	4	3.36 *	%29074.6000
2	5.7600	36.2	4.781034	30	13	13.00	0.0000
3	6.5500	96.2	6.818585	30	29	29.00 *	0.0000

Mortality in the control: 3.333334 %  
 Estimation of the natural mortality: 11.2 %  
 Number of iterations: 12  
 CHI2= 29074.6 df= 1  
 Prob= 1

LC	Level of Confidence	Range
1 = 5.11438	.95	4.48758 < LC < 5.38516
2 = 5.19905	.95	4.62288 < LC < 5.44906
3 = 5.25351	.95	4.71052 < LC < 5.49034
4 = 5.29485	.95	4.77736 < LC < 5.52185
5 = 5.32873	.95	4.83226 < LC < 5.54779
10 = 5.44669	.95	5.02422 < LC < 5.63938
20 = 5.59307	.95	5.26187 < LC < 5.75792
30 = 5.70106	.95	5.43347 < LC < 5.85217
40 = 5.79490	.95	5.57602 < LC < 5.94274
50 = 5.88388	.95	5.70117 < LC < 6.04044
60 = 5.97421	.95	5.81446 < LC < 6.15523
70 = 6.07256	.95	5.92114 < LC < 6.29896
80 = 6.18981	.95	6.03058 < LC < 6.49088
90 = 6.35616	.95	6.16644 < LC < 6.78789
95 = 6.49687	.95	6.27207 < LC < 7.05321
96 = 6.53843	.95	6.30231 < LC < 7.13340
97 = 6.58989	.95	6.33928 < LC < 7.23369
98 = 6.65891	.95	6.38821 < LC < 7.36980
99 = 6.76916	.95	6.46507 < LC < 7.59073

Regression line:  $Y = A + \text{Slope} * (X - M)$   
 A = 5.166341 +/- .213076      4.953265 < A < 5.379417      M= 10.77402  
 Slope= 38.22503 +/- 8.893734      29.3313 < B < 47.11877      heterogeneity= 1

ค่า LC50 ที่ 48 ชม.

n	Dose (log CFU/ml)	Mort. corr(%)	probit	Total treated	Killed	Killed expected	CHI2 contribution
1	2.9700	0.0	/	30	1	4.29 *	%150966.300
2	3.6200	2.8	3.906234	30	5	4.33 *	8.2317
3	4.3800	10.6	4.180068	30	7	6.75	0.0240
4	5.7600	80.6	5.943893	30	25	25.93 *	0.2160
5	6.5500	100.0	/	30	30	29.52 *	0.4175

Mortality in the control: 3.333334 %  
 Estimation of the natural mortality: 14.3 %  
 Number of iterations: 31  
 CHI2= 150975.2 df= 3  
 Prob= 1

LC	Level of Confidence	Range
1 = 3.87996	.95	0.00000 < LC < %1.513957E+19
2 = 4.00758	.95	0.00000 < LC < %4.718236E+17
3 = 4.09072	.95	0.00000 < LC < %5.42935E+16
4 = 4.15441	.95	0.00000 < LC < %1.092935E+16
5 = 4.20696	.95	0.00000 < LC < %3017724000000000.00000
10 = 4.39247	.95	0.00000 < LC < %42134160000000.00000
20 = 4.62816	.95	0.00000 < LC < %368421300000.00000
30 = 4.80590	.95	0.00000 < LC < %19128320000.00000
40 = 4.96308	.95	0.00000 < LC < %2412595000.00000
50 = 5.11437	.95	0.00000 < LC < %584159100.00000
60 = 5.27026	.95	0.00000 < LC < %263311100.00000
70 = 5.44263	.95	0.00000 < LC < %246555400.00000

80 = 5.65166	.95	0.00000 < LC < %649367500.00000
90 = 5.95492	.95	0.00000 < LC < %11877420000.00000
95 = 6.21751	.95	0.00000 < LC < %342945200000.00000
96 = 6.29614	.95	0.00000 < LC < %1023838000000.00000
97 = 6.39417	.95	0.00000 < LC < %4151295000000.00000
98 = 6.52683	.95	0.00000 < LC < %28902640000000.00000
99 = 6.74151	.95	0.00000 < LC < %713951500000000.00000

Regression line:  $Y = A + \text{Slope} * (X - M)$  M= 10.73045  
 A= 5.420078 +/- .2071259 5.212952 < A < 5.627204 Variance of the LC50= 1.272136E-04  
 Slope= 19.39556 +/- 729.0859 -709.6903 < B < 748.4815 heterogeneity= 50325.07 with 3  
 df

### ค่า LC50 ที่ 72 ชม.

n	Dose (log CFU/ml)	Mort. corr(%)	probit	Total treated	Killed	Killed expected	CHI2 contribution
1	2.9700	2.0	3.508863	30	3	2.59 *	1.0781
2	3.6200	12.9	4.052044	30	6	4.81 *	0.6035
3	4.3800	34.7	4.691455	30	12	13.90	0.4961
4	5.7600	92.7	6.483293	30	28	27.96 *	0.0006
5	6.5500	100.0	/	30	30	29.64 *	0.3331

Mortality in the control: 3.333334 % CHI2= 2.511445 df= 3  
 Estimation of the natural mortality: 8.2 % Prob= .5267712  
 Number of iterations: 12

LC	Level of Confidence	Range
1 = 3.09084	.95	2.57511 < LC < 3.43115
2 = 3.23297	.95	2.74143 < LC < 3.55698
3 = 3.32654	.95	2.85205 < LC < 3.63980
4 = 3.39872	.95	2.93790 < LC < 3.70376
5 = 3.45858	.95	3.00941 < LC < 3.75689
10 = 3.67226	.95	3.26629 < LC < 3.94782
20 = 3.94886	.95	3.59945 < LC < 4.20094
30 = 4.16113	.95	3.85136 < LC < 4.40392
40 = 4.35139	.95	4.07031 < LC < 4.59633
50 = 4.53676	.95	4.27400 < LC < 4.79668
60 = 4.73003	.95	4.47393 < LC < 5.02137
70 = 4.94631	.95	4.68245 < LC < 5.29205
80 = 5.21220	.95	4.92040 < LC < 5.64897
90 = 5.60477	.95	5.24635 < LC < 6.21270
95 = 5.95107	.95	5.51819 < LC < 6.73667
96 = 6.05589	.95	5.59848 < LC < 6.89926
97 = 6.18728	.95	5.69805 < LC < 7.10544
98 = 6.36635	.95	5.83208 < LC < 7.39038
99 = 6.65912	.95	6.04773 < LC < 7.86546

Regression line:  $Y = A + \text{Slope} * (X - M)$  M= 10.66563  
 A= 5.124038 +/- .1690273 4.955011 < A < 5.293065 Variance of the LC50= .0001484  
 Slope= 13.96039 +/- 2.110997 11.84939 < B < 16.07139  
 heterogeneity= 1

### ค่า LC50 ที่ 96 ชม.

n	Dose (log CFU/ml)	Mort. corr(%)	probit	Total treated	Killed	Killed expected	CHI2 contribution
1	2.9700	4.2	3.508863	30	3	2.25 *	1.2783
2	3.6200	14.8	4.052044	30	6	6.50	0.0601
3	4.3800	57.4	5.216311	30	18	17.99	0.0000
4	5.7600	96.5	6.818585	30	29	29.09 *	0.0085
5	6.5500	100.0	/	30	30	29.88 *	0.1145

Mortality in the control: 3.333334 % CHI2= 1.461346 df= 3  
 Estimation of the natural mortality: 6.1 % Prob= .3087798  
 Number of iterations: 13

LC	Level of Confidence	Range
1 = 2.89500	.95	2.38965 < LC < 3.21743
2 = 3.02802	.95	2.54797 < LC < 3.33376

3 = 3.11558	.95	2.65339 < LC < 3.41032
4 = 3.18312	.95	2.73528 < LC < 3.46942
5 = 3.23914	.95	2.80355 < LC < 3.51855
10 = 3.43911	.95	3.04898 < LC < 3.69518
20 = 3.69791	.95	3.36751 < LC < 3.92999
30 = 3.89652	.95	3.60790 < LC < 4.11960
40 = 4.07453	.95	3.81569 < LC < 4.30109
50 = 4.24796	.95	4.00729 < LC < 4.49226
60 = 4.42877	.95	4.19331 < LC < 4.70893
70 = 4.63111	.95	4.38544 < LC < 4.97176
80 = 4.87983	.95	4.60336 < LC < 5.31933
90 = 5.24706	.95	4.90132 < LC < 5.86856
95 = 5.57097	.95	5.14993 < LC < 6.37908
96 = 5.66902	.95	5.22339 < LC < 6.53760
97 = 5.79191	.95	5.31454 < LC < 6.73863
98 = 5.95940	.95	5.43725 < LC < 7.01658
99 = 6.23321	.95	5.63466 < LC < 7.48031

Regression line:  $Y = A + \text{Slope} * (X - M)$  M= 10.63296  
 A= 5.066782 +/- .1672863 4.899496 < A < 5.234069 Variance of the LC50= 1.439362E-04  
 Slope= 13.97201 +/- 2.234635 11.73738 < B < 16.20665  
 heterogeneity= 1

**Dependent Variable: WT1**

Class	Levels	Values
REP	8	1 2 3 4 5 6 7 8
DAY	4	0 30 60 90
TRT	2	1 2

----- DAY=0 -----

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	4.90050000	4.90050000	3.04	0.0822
Error	318	512.69137500	1.61223703		
Corrected Total	319	517.59187500			

	R-Square	C.V.	Root MSE	WT Mean
	0.009468	19.50631	1.269739	6.50937500

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	4.90050000	4.90050000	3.04	0.0822
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	4.90050000	4.90050000	3.04	0.0822

Level of TRT	N	Mean	SD
1	160	6.63312500	1.38326575
2	160	6.38562500	1.14501088

----- DAY=30 -----

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	1.94020202	1.94020202	0.68	0.4122
Error	196	563.20565657	2.87349825		
Corrected Total	197	565.14585859			

	R-Square	C.V.	Root MSE	WT Mean
	0.003433	21.64566	1.695140	7.83131313

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	1.94020202	1.94020202	0.68	0.4122
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	1.94020202	1.94020202	0.68	0.4122

Level of TRT	N	Mean	SD
1	99	7.93030303	1.83327824
2	99	7.73232323	1.54469654

----- DAY=60 -----

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	0.25688611	0.25688611	0.04	0.8356
Error	139	826.11857488	5.94329910		
Corrected Total	140	826.37546099			

	R-Square	C.V.	Root MSE	WT Mean
	0.000311	23.88758	2.437888	10.2056738

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	0.25688611	0.25688611	0.04	0.8356
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	0.25688611	0.25688611	0.04	0.8356

Level of	WT				
TRT	N	Mean	SD		
1	72	10.1638889	2.66396430		
2	69	10.2492754	2.17692600		
----- DAY=90 -----					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	26.11472045	26.11472045	2.17	0.1435
Error	105	1262.17929825	12.02075522		
Corrected Total	106	1288.29401869			
	R-Square	C.V.	Root MSE	WT Mean	
	0.020271	24.92973	3.467096	13.9074766	
Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	26.11472045	26.11472045	2.17	0.1435
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	26.11472045	26.11472045	2.17	0.1435
Level of	WT				
TRT	N	Mean	SD		
1	50	13.3800000	3.95448596		
2	57	14.3701754	2.97585311		

### Dependent Variable: SUR1

Class	Levels	Values			
REP	8	1 2 3 4 5 6 7 8			
TRT	2	1 2			
----- DAY=0 -----					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	0	0	99999.99	0.0
Error	14	0	0		
Corrected Total	15	0			
	R-Square	C.V.	Root MSE	SUR Mean	
	0.000000	0	0	100.000000	
Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	0	0	99999.99	0.0
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	0	0	99999.99	0.0
Duncan's Multiple Range Test for variable: SUR					
Alpha= 0.05 df= 14 MSE= 0 Number of Means= 2 Critical Range= 0					
Duncan Grouping		Mean	N	TRT	
A		100.0	8	1	
A					
A		100.0	8	2	
----- DAY=30 -----					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	0.000000	0.000000	0.00	1.0000
Error	14	3643.750000	260.267857		
Corrected Total	15	3643.750000			
	R-Square	C.V.	Root MSE	SUR Mean	
	0.000000	26.07324	16.13282	61.8750000	
Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	0	0	0.00	1.0000
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	0	0	0.00	1.0000
Duncan's Multiple Range Test for variable: SUR					
Alpha= 0.05 df= 14 MSE= 260.2679 Number of Means = 2 Critical Range = 17.27					
Duncan Grouping		Mean	N	TRT	
A		61.875	8	1	
A					
A		61.875	8	2	
----- DAY=60 -----					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	14.06250000	14.06250000	0.09	0.7691
Error	14	2196.87500000	156.91964286		
Corrected Total	15	2210.93750000			
	R-Square	C.V.	Root MSE	SUR Mean	
	0.006360	28.42952	12.52676	44.0625000	
Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	14.06250000	14.06250000	0.09	0.7691
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	14.06250000	14.06250000	0.09	0.7691

Duncan's Multiple Range Test for variable: SUR  
 Alpha= 0.05 df= 14 MSE= 156.9196 Number of Means = 2 Critical Range = 13.41

Duncan Grouping	Mean	N	TRT
A	45.000	8	1
A	43.125	8	2

----- DAY=90 -----

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	76.56250000	76.56250000	0.52	0.4825
Error	14	2059.37500000	147.09821429		
Corrected Total	15	2135.93750000			

	R-Square	C.V.	Root MSE	SUR Mean	
	0.035845	36.27187	12.12841	33.4375000	
Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	76.56250000	76.56250000	0.52	0.4825
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	76.56250000	76.56250000	0.52	0.4825

Duncan's Multiple Range Test for variable: SUR  
 Alpha= 0.05 df= 14 MSE= 147.0982 Number of Means = 2 Critical Range = 12.98

Duncan Grouping	Mean	N	TRT
A	35.625	8	2
A	31.250	8	1

**Dependent Variable: THC1**

Class	Levels	Values
DAY	3	30 60 90
TRT	2	1 2

----- DAY=30 -----

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	4.36906667	4.36906667	1.20	0.3343
Error	4	14.52626667	3.63156667		
Corrected Total	5	18.89533333			

	R-Square	C.V.	Root MSE	THC Mean	
	0.231225	55.02407	1.905667	3.46333333	
Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	4.36906667	4.36906667	1.20	0.3343
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	4.36906667	4.36906667	1.20	0.3343

Duncan's Multiple Range Test for variable: THC  
 Alpha= 0.05 df= 4 MSE= 3.631567 Number of Means = 2 Critical Range = 4.328

Duncan Grouping	Mean	N	TRT
A	4.317	3	2
A	2.610	3	1

----- DAY=60 -----

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	10.32281667	10.32281667	6.44	0.0642
Error	4	6.41453333	1.60363333		
Corrected Total	5	16.73735000			

	R-Square	C.V.	Root MSE	THC Mean	
	0.616753	30.40448	1.266346	4.16500000	
Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	10.32281667	10.32281667	6.44	0.0642
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	10.32281667	10.32281667	6.44	0.0642

Duncan's Multiple Range Test for variable: THC  
 Alpha= 0.05 df= 4 MSE= 1.603633 Number of Means = 2 Critical Range = 2.876

Duncan Grouping	Mean	N	TRT
A	5.477	3	2
A	2.853	3	1

----- DAY=90 -----

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	10.70670417	10.70670417	4.83	0.0929
Error	4	8.86848333	2.21712083		
Corrected Total	5	19.57518750			

	R-Square	C.V.	Root MSE	THC Mean	
	0.546953	45.01889	1.489000	3.30750000	
Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	10.70670417	10.70670417	4.83	0.0929
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	10.70670417	10.70670417	4.83	0.0929



Duncan's Multiple Range Test for variable: THC  
 Alpha= 0.05 df= 4 MSE= 2.217121 Number of Means = 2 Critical Range = 3.382

Duncan Grouping	Mean	N	TRT
A	4.643	3	2
A	1.972	3	1

**Dependent Variable: PHA1**

Class	Levels	Values
DAY	3	30 60 90
TRT	2	1 2

----- DAY=30 -----

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	2.16000000	2.16000000	0.23	0.6551
Error	4	37.22000000	9.30500000		
Corrected Total	5	39.38000000			

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	2.16000000	2.16000000	0.23	0.6551

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	2.16000000	2.16000000	0.23	0.6551

Duncan's Multiple Range Test for variable: PHA

Alpha= 0.05 df= 4 MSE= 9.305 Number of Means = 2 Critical Range = 6.928

Duncan Grouping	Mean	N	TRT
A	4.400	3	2
A	3.200	3	1

----- DAY=60 -----

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	112.6666667	112.6666667	36.54	0.0038
Error	4	12.3333333	3.0833333		
Corrected Total	5	125.0000000			

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	112.6666667	112.6666667	36.54	0.0038

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	112.6666667	112.6666667	36.54	0.0038

Duncan's Multiple Range Test for variable: PHA

Alpha= 0.05 df= 4 MSE= 3.083333 Number of Means = 2 Critical Range = 3.988

Duncan Grouping	Mean	N	TRT
A	16.333	3	2
B	7.667	3	1

----- DAY=90 -----

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	1.00000000	1.00000000	8.00	0.1056
Error	2	0.25000000	0.12500000		
Corrected Total	3	1.25000000			

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	1.00000000	1.00000000	8.00	0.1056

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	1.00000000	1.00000000	8.00	0.1056

Duncan's Multiple Range Test for variable: PHA

Alpha= 0.05 df= 2 MSE= 0.125 Number of Means = 2 Critical Range = 1.521

Duncan Grouping	Mean	N	TRT
A	6.750	2	2
A	5.750	2	1

**Dependent Variable: PI1**

Class	Levels	Values
DAY	3	30 60 90
TRT	2	1 2

----- DAY=30 -----

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	0.12041667	0.12041667	0.51	0.5141
Error	4	0.94186667	0.23546667		
Corrected Total	5	1.06228333			

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	0.12041667	0.12041667	0.51	0.5141

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	0.12041667	0.12041667	0.51	0.5141

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	0.12041667	0.12041667	0.51	0.5141
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	0.12041667	0.12041667	0.51	0.5141

Duncan's Multiple Range Test for variable: PI  
 Alpha= 0.05 df= 4 MSE= 0.235467 Number of Means = 2 Critical Range = 1.102

Duncan Grouping	Mean	N	TRT
A	0.503	3	2
A	0.220	3	1

----- DAY=60 -----

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	134.6160667	134.6160667	12.41	0.0244
Error	4	43.3974667	10.8493667		
Corrected Total	5	178.0135333			

R-Square	C.V.	Root MSE	PI Mean
0.756213	40.78214	3.293838	8.07666667

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	134.6160667	134.6160667	12.41	0.0244
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	134.6160667	134.6160667	12.41	0.0244

Duncan's Multiple Range Test for variable: PI  
 Alpha= 0.05 df= 4 MSE= 10.84937 Number of Means = 2 Critical Range = 7.481

Duncan Grouping	Mean	N	TRT
A	12.813	3	2
B	3.340	3	1

----- DAY=90 -----

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	0.45562500	0.45562500	2.91	0.2300
Error	2	0.31285000	0.15642500		
Corrected Total	3	0.76847500			

R-Square	C.V.	Root MSE	PI Mean
0.592895	28.30097	0.395506	1.39750000

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	0.45562500	0.45562500	2.91	0.2300
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	0.45562500	0.45562500	2.91	0.2300

Duncan's Multiple Range Test for variable: PI  
 Alpha= 0.05 df= 2 MSE= 0.156425 Number of Means = 2 Critical Range = 1.702

Duncan Grouping	Mean	N	TRT
A	1.735	2	2
A	1.060	2	1

**Dependent Variable: ABP1**

Class	Levels	Values
	DAY	3 30 60 90
	TRT	2 1 2

----- DAY=30 -----

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	0.42666667	0.42666667	0.94	0.3861
Error	4	1.80666667	0.45166667		
Corrected Total	5	2.23333333			

R-Square	C.V.	Root MSE	ABP Mean
0.191045	36.00329	0.672062	1.86666667

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	0.42666667	0.42666667	0.94	0.3861
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	0.42666667	0.42666667	0.94	0.3861

Duncan's Multiple Range Test for variable: ABP  
 Alpha= 0.05 df= 4 MSE= 0.451667 Number of Means = 2 Critical Range = 1.526

Duncan Grouping	Mean	N	TRT
A	2.133	3	2
A	1.600	3	1

----- DAY=60 -----

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	1.50000000	1.50000000	0.34	0.5910
Error	4	17.63333333	4.40833333		
Corrected Total	5	19.13333333			

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	1.50000000	1.50000000	0.34	0.5910

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	1.50000000	1.50000000	0.34	0.5910

Duncan's Multiple Range Test for variable: ABP  
 Alpha= 0.05 df= 4 MSE= 4.408333 Number of Means = 2 Critical Range = 4.768

Duncan Grouping	Mean	N	TRT
A	5.867	3	1
A	4.867	3	2

----- DAY=90 -----

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	0.72250000	0.72250000	5.45	0.1446
Error	2	0.26500000	0.13250000		
Corrected Total	3	0.98750000			

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	0.72250000	0.72250000	5.45	0.1446

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	0.72250000	0.72250000	5.45	0.1446

Duncan's Multiple Range Test for variable: ABP  
 Alpha= 0.05 df= 2 MSE= 0.1325 Number of Means = 2 Critical Range = 1.566

Duncan Grouping	Mean	N	TRT
A	3.550	2	2
A	2.700	2	1

**Dependent Variable: PO1**

Class	Levels	Values
DAY	3	30 60 90
TRT	2	1 2

----- DAY=30 -----

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	75.74427273	75.74427273	0.16	0.7000
Error	9	4305.66300000	478.40700000		
Corrected Total	10	4381.40727273			

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	75.74427273	75.74427273	0.16	0.7000

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	75.74427273	75.74427273	0.16	0.7000

Duncan's Multiple Range Test for variable: PO  
 Alpha= 0.05 df= 9 MSE= 478.407 Number of Means = 2 Critical Range = 29.91

Duncan Grouping	Mean	N	TRT
A	38.95	6	2
A	33.68	5	1

----- DAY=60 -----

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	351.12500000	351.12500000	0.00	0.9686
Error	6	1254792.690000	209132.115000		
Corrected Total	7	1255143.815000			

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	351.12500000	351.12500000	0.00	0.9686

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	351.12500000	351.12500000	0.00	0.9686

Duncan's Multiple Range Test for variable: PO  
 Alpha= 0.05 df= 6 MSE= 209132.1 Number of Means= 2 Critical Range= 791.3

Duncan Grouping	Mean	N	TRT
A	763.8	4	1
A	750.5	4	2

----- DAY=90 -----

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	45566.24006	45566.24006	0.30	0.6013
Error	7	1065613.93550	152230.56221		
Corrected Total	8	1111180.17556			

	R-Square	C.V.	Root MSE	PO Mean	
	0.041007	55.44688	390.1674	703.677778	
Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	45566.24006	45566.24006	0.30	0.6013
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	45566.24006	45566.24006	0.30	0.6013

Duncan's Multiple Range Test for variable: PO

Alpha= 0.05 df= 7 MSE= 152230.6 Number of Means = 2 Critical Range = 618.4

Duncan Grouping	Mean	N	TRT
A	767.3	5	2
A	624.1	4	1

**Dependent Variable: IN1**

Class	Levels	Values
	DAY	3 30 60 90
	TRT	2 1 2

----- DAY=30 -----

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	3403.401667	3403.401667	3.12	0.1522
Error	4	4367.006667	1091.751667		
Corrected Total	5	7770.408333			

	R-Square	C.V.	Root MSE	IN Mean	
	0.437995	138.7334	33.04167	23.8166667	
Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	3403.401667	3403.401667	3.12	0.1522
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	3403.401667	3403.401667	3.12	0.1522

Duncan's Multiple Range Test for variable: IN

Alpha= 0.05 df= 4 MSE= 1091.752 Number of Means = 2 Critical Range 75.04

Duncan Grouping	Mean	N	TRT
A	47.63	3	2
A	0.00	3	1

----- DAY=60 -----

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	85.12666667	85.12666667	2.57	0.1844
Error	4	132.66666667	33.16666667		
Corrected Total	5	217.79333333			

	R-Square	C.V.	Root MSE	IN Mean	
	0.390860	6.241746	5.759051	92.2666667	
Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	85.12666667	85.12666667	2.57	0.1844
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	85.12666667	85.12666667	2.57	0.1844

Duncan's Multiple Range Test for variable: IN

Alpha= 0.05 df= 4 MSE= 33.16667 Number of Means = 2

Critical Range = 13.08

Duncan Grouping	Mean	N	TRT
A	96.033	3	2
A	88.500	3	1

----- DAY=90 -----

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	975.3750000	975.3750000	6.42	0.0644
Error	4	607.5800000	151.8950000		
Corrected Total	5	1582.9550000			

	R-Square	C.V.	Root MSE	IN Mean	
	0.616174	14.57666	12.32457	84.5500000	
Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	975.3750000	975.3750000	6.42	0.0644
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	975.3750000	975.3750000	6.42	0.0644

Duncan's Multiple Range Test for variable: IN

Alpha= 0.05 df= 4 MSE= 151.895 Number of Means = 2 Critical Range = 27.99

Duncan Grouping	Mean	N	TRT
A	97.30	3	2
A	71.80	3	1

**Dependent Variable: WT2**

Class	Levels	Values
-------	--------	--------

	TRT	2	1	2		
	REP	3	1	2	3	
----- DAY=0 -----						
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F	
Model	3	0.01024500	0.00341500	1.12	0.3415	
Error	236	0.71935333	0.00304811			
Corrected Total	239	0.72959833				
	R-Square	C.V.	Root MSE	WT Mean		
	0.014042	29.85651	0.055210	0.18491667		
Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F	
REP	2	0.00320333	0.00160167	0.53	0.5920	
TRT	1	0.00704167	0.00704167	2.31	0.1299	
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F	
REP	2	0.00320333	0.00160167	0.53	0.5920	
TRT	1	0.00704167	0.00704167	2.31	0.1299	
Duncan's Multiple Range Test for variable: WT						
Alpha= 0.05 df= 236 MSE= 0.003048 Number of Means = 2 Critical Range = .0142						
Duncan Grouping						
		Mean	N	TRT		
	A	0.19033	120	2		
	A	0.17950	120	1		
----- DAY=30 -----						
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F	
Model	3	4.46844111	1.48948037	4.64	0.0040	
Error	138	44.30594199	0.32105755			
Corrected Total	141	48.77438310				
	R-Square	C.V.	Root MSE	WT Mean		
	0.091615	46.93185	0.566619	1.20732394		
Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F	
REP	2	0.25636645	0.12818322	0.40	0.6716	
TRT	1	4.21207466	4.21207466	13.12	0.0004	
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F	
REP	2	0.19297487	0.09648743	0.30	0.7409	
TRT	1	4.21207466	4.21207466	13.12	0.0004	
Duncan's Multiple Range Test for variable: WT						
Alpha= 0.05 df= 138 MSE= 0.321058 Number of Means = 2 Critical Range= 0.190						
Duncan Grouping						
		Mean	N	TRT		
	A	1.3623	79	2		
	B	1.0130	63	1		
----- DAY=60 -----						
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F	
Model	3	9.83212150	3.27737383	1.75	0.1623	
Error	101	189.51613184	1.87639734			
Corrected Total	104	199.34825333				
	R-Square	C.V.	Root MSE	WT Mean		
	0.049321	48.07498	1.369817	2.84933333		
Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F	
REP	2	5.79375747	2.89687873	1.54	0.2186	
TRT	1	4.03836403	4.03836403	2.15	0.1455	
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F	
REP	2	5.46132105	2.73066052	1.46	0.2382	
TRT	1	4.03836403	4.03836403	2.15	0.1455	
Duncan's Multiple Range Test for variable: WT						
Alpha= 0.05 df= 101 MSE= 1.876397 Number of Means = 2 Critical Range = 0.547						
Duncan Grouping						
		Mean	N	TRT		
	A	3.009	65	2		
	A	2.589	40	1		
----- DAY=90 -----						
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F	
Model	3	18.24894520	6.08298173	0.94	0.4258	
Error	66	426.49391194	6.46202897			
Corrected Total	69	444.74285714				
	R-Square	C.V.	Root MSE	WT Mean		
	0.041033	39.89768	2.542052	6.37142857		
Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F	
REP	2	2.61750457	1.30875229	0.20	0.8172	
TRT	1	15.63144063	15.63144063	2.42	0.1247	
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F	
REP	2	1.49103339	0.74551669	0.12	0.8912	
TRT	1	15.63144063	15.63144063	2.42	0.1247	
Duncan's Multiple Range Test for variable: WT						

Alpha= 0.05 df= 66 MSE= 6.462029 Number of Means = 2 Critical Range = 1.232

Duncan Grouping	Mean	N	TRT
A	6.783	41	2
A	5.790	29	1

**Dependent Variable: SUR2**

Class	Levels	Values
	REP	3 1 2 3
	DAY	4 0 30 60 90
	TRT	2 1 2

----- DAY=0 -----

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	0	0	99999.99	0.0
Error	4	0	0		
Corrected Total	5	0			

	R-Square	C.V.	Root MSE	SUR Mean
	0.000000	0	0	100.000000

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	0	0	99999.99	0.0

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	0	0	99999.99	0.0

Duncan's Multiple Range Test for variable: SUR  
Alpha= 0.05 df= 4 MSE= 0 Number of Means= 2 Critical Range = 0

Duncan Grouping	Mean	N	TRT
A	100.0	3	1
A	100.0	3	2

----- DAY=30 -----

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	266.6666667	266.6666667	3.66	0.1284
Error	4	291.6666667	72.9166667		
Corrected Total	5	558.3333333			

	R-Square	C.V.	Root MSE	SUR Mean
	0.477612	14.43233	8.539126	59.1666667

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	266.6666667	266.6666667	3.66	0.1284

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	266.6666667	266.6666667	3.66	0.1284

Duncan's Multiple Range Test for variable: SUR  
Alpha= 0.05 df= 4 MSE= 72.91667 Number of Means = 2 Critical Range = 19.39

Duncan Grouping	Mean	N	TRT
A	65.833	3	2
A	52.500	3	1

----- DAY=60 -----

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	651.0416667	651.0416667	9.19	0.0387
Error	4	283.3333333	70.8333333		
Corrected Total	5	934.3750000			

	R-Square	C.V.	Root MSE	SUR Mean
	0.696767	19.23715	8.416254	43.7500000

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	651.0416667	651.0416667	9.19	0.0387

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	651.0416667	651.0416667	9.19	0.0387

Duncan's Multiple Range Test for variable: SUR  
Alpha= 0.05 df= 4 MSE= 70.83333 Number of Means = 2 Critical Range =19.11

Duncan Grouping	Mean	N	TRT
A	54.167	3	2
B	33.333	3	1

----- DAY=90 -----

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	150.0000000	150.0000000	10.29	0.0327
Error	4	58.3333333	14.5833333		
Corrected Total	5	208.3333333			

	R-Square	C.V.	Root MSE	SUR Mean
	0.720000	13.09307	3.818813	29.1666667

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	150.0000000	150.0000000	10.29	0.032

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	150.0000000	150.0000000	10.29	0.0327

Duncan's Multiple Range Test for variable: SUR  
 Alpha= 0.05 df= 4 MSE= 14.58333 Number of Means = 2 Critical Range= 8.673

Duncan Grouping		Mean	N	TRT
A	34.167	3	2	
B	24.167	3	1	

**Dependent Variable: THC2**

Class	Levels	Values
DAY	2	1 2
TRT	2	1 2

----- DAY=1 -----

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	2.22041667	2.22041667	5.86	0.0727
Error	4	1.51513333	0.37878333		
Corrected Total	5	3.73555000			

R-Square	C.V.	Root MSE	THC Mean
0.594402	31.48101	0.615454	1.95500000

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	2.22041667	2.22041667	5.86	0.0727

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	2.22041667	2.22041667	5.86	0.0727

Duncan's Multiple Range Test for variable: THC  
 Alpha= 0.05 df= 4 MSE= 0.378783 Number of Means = 2 Critical Range = 1.398

Duncan Grouping		Mean	N	TRT
A	2.563	3	2	
A	1.347	3	1	

----- DAY=2 -----

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	0.00080083	0.00080083	0.01	0.9369
Error	3	0.32467917	0.10822639		
Corrected Total	4	0.32548000			

R-Square	C.V.	Root MSE	THC Mean
0.002460	29.45191	0.328978	1.11700000

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	0.00080083	0.00080083	0.01	0.9369

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	0.00080083	0.00080083	0.01	0.9369

Duncan's Multiple Range Test for variable: THC  
 Alpha= 0.05 df= 3 MSE= 0.108226 Number of Means = 2 Critical Range = 0.955

Duncan Grouping		Mean	N	TRT
A	1.133	2	1	
A	1.107	3	2	

**Dependent Variable: PHA2**

Class	Levels	Values
DAY	2	1 2
TRT	2	1 2

----- DAY=1 -----

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	2.04166667	2.04166667	3.06	0.1550
Error	4	2.66666667	0.66666667		
Corrected Total	5	4.70833333			

R-Square	C.V.	Root MSE	PHA Mean
0.433628	51.56821	0.816497	1.58333333

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	2.04166667	2.04166667	3.06	0.1550

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	2.04166667	2.04166667	3.06	0.1550

Duncan's Multiple Range Test for variable: PHA  
 Alpha= 0.05 df= 4 MSE= 0.666667 Number of Means = 2 Critical Range = 1.854

Duncan Grouping		Mean	N	TRT
A	2.167	3	2	
A	1.000	3	1	

----- DAY=2 -----

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	30.37500000	30.37500000	9.35	0.0378

Error	4	13.00000000	3.25000000		
Corrected Total	5	43.37500000			
		R-Square	C.V.	Root MSE	PHA Mean
		0.700288	21.85183	1.802776	8.25000000
Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	30.37500000	30.37500000	9.35	0.0378
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	30.37500000	30.37500000	9.35	0.0378

Duncan's Multiple Range Test for variable: PHA  
 Alpha= 0.05 df= 4 MSE= 3.25 Number of Means = 2 Critical Range= 4.094

Duncan Grouping	Mean	N	TRT
A	10.500	3	2
B	6.000	3	1

**Dependent Variable: PI2**

Class	Levels	Values		
	DAY	2	1	2
	TRT	2	1	2

----- DAY=1 -----

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	0.01260417	0.01260417	2.67	0.1779
Error	4	0.01891667	0.00472917		
Corrected Total	5	0.03152083			
		R-Square	C.V.	Root MSE	PI Mean
		0.399868	107.1724	0.068769	0.06416667
Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	0.01260417	0.01260417	2.67	0.1779
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	0.01260417	0.01260417	2.67	0.1779

Duncan's Multiple Range Test for variable: PI  
 Alpha= 0.05 df= 4 MSE= 0.004729 Number of Means = 2 Critical Range = 0.156

Duncan Grouping	Mean	N	TRT
A	0.1100	3	2
A	0.0183	3	1

----- DAY=2 -----

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	6.67815000	6.67815000	19.78	0.0113
Error	4	1.35073333	0.33768333		
Corrected Total	5	8.02888333			
		R-Square	C.V.	Root MSE	PI Mean
		0.831766	34.62395	0.581105	1.67833333
Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	6.67815000	6.67815000	19.78	0.0113
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	6.67815000	6.67815000	19.78	0.0113

Duncan's Multiple Range Test for variable: PI  
 Alpha= 0.05 df= 4 MSE= 0.337683 Number of Means = 2 Critical Range = 1.320

Duncan Grouping	Mean	N	TRT
A	2.733	3	2
B	0.623	3	1

**Dependent Variable: ABP2**

Class	Levels	Values		
	DAY	2	1	2
	TRT	2	1	2

----- DAY=1 -----

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	0.24000000	0.24000000	1.24	0.3276
Error	4	0.77333333	0.19333333		
Corrected Total	5	1.01333333			
		R-Square	C.V.	Root MSE	ABP Mean
		0.236842	24.88850	0.439697	1.76666667
Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	0.24000000	0.24000000	1.24	0.3276
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	0.24000000	0.24000000	1.24	0.3276



Duncan Grouping	Mean	N	TRT
A	1.967	3	2
A	1.567	3	1

----- DAY=2 -----

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	0.96000000	0.96000000	12.00	0.0257
Error	4	0.32000000	0.08000000		
Corrected Total	5	1.28000000			

	R-Square	C.V.	Root MSE	ABP Mean
	0.750000	13.46870	0.282843	2.10000000

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	0.96000000	0.96000000	12.00	0.0257

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	0.96000000	0.96000000	12.00	0.0257

Duncan's Multiple Range Test for variable: ABP

Alpha= 0.05 df= 4 MSE= 0.08 Number of Means = 2 Critical Range = 0.642

Duncan Grouping	Mean	N	TRT
A	2.500	3	2
B	1.700	3	1

**Dependent Variable: PO2**

Class	Levels	Values
	DAY	2 1 2
	TRT	2 1 2

----- DAY=1 -----

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	1407.601667	1407.601667	15.28	0.0174
Error	4	368.533333	92.133333		
Corrected Total	5	1776.135000			

	R-Square	C.V.	Root MSE	PO Mean
	0.792508	37.42149	9.598611	25.6500000

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	1407.601667	1407.601667	15.28	0.0174

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	1407.601667	1407.601667	15.28	0.0174

Duncan's Multiple Range Test for variable: PO

Alpha= 0.05 df= 4 MSE= 92.13333 Number of Means = 2 Critical Range = 21.80

Duncan Grouping	Mean	N	TRT
A	40.967	3	2
B	10.333	3	1

----- DAY=2 -----

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	289.0000000	289.0000000	3.63	0.1972
Error	2	159.4000000	79.7000000		
Corrected Total	3	448.4000000			

	R-Square	C.V.	Root MSE	PO Mean
	0.644514	55.10794	8.927486	16.2000000

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	289.0000000	289.0000000	3.63	0.1972

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	289.0000000	289.0000000	3.63	0.1972

Duncan's Multiple Range Test for variable: PO

Alpha= 0.05 df= 2 MSE= 79.7 Number of Means = 2 Critical Range = 38.41

Duncan Grouping	Mean	N	TRT
A	24.700	2	2
A	7.700	2	1

**Dependent Variable: IN2**

Class	Levels	Values
	DAY	2 1 2
	TRT	2 1 2

----- DAY=1 -----

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	315.3750000	315.3750000	0.39	0.5683
Error	4	3271.7533333	817.9383333		
Corrected Total	5	3587.1283333			

	R-Square	C.V.	Root MSE	IN Mean
	0.087919	113.8671	28.59962	25.1166667

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	315.3750000	315.3750000	0.39	0.5683
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	315.3750000	315.3750000	0.39	0.5683

Duncan's Multiple Range Test for variable: IN

Alpha= 0.05 df= 4 MSE= 817.9383 Number of Means = 2 Critical Range = 64.95

Duncan Grouping	Mean	N	TRT
A	32.37	3	2
A	17.87	3	1

----- DAY=2 -----

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	426.7266667	426.7266667	2.69	0.1762
Error	4	633.9466667	158.4866667		
Corrected Total	5	1060.6733333			

R-Square	C.V.	Root MSE	IN Mean
0.402317	15.94909	12.58915	78.9333333

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	426.7266667	426.7266667	2.69	0.1762
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	1	426.7266667	426.7266667	2.69	0.1762

Duncan's Multiple Range Test for variable: IN

Alpha= 0.05 df= 4 MSE= 158.4867 Number of Means = 2 Critical Range = 28.59

Duncan Grouping	Mean	N	TRT
A	87.37	3	2
A	70.50	3	1

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

น้ำหนักตัว และการรอดชีวิตของกุ้งกุลาดำกลุ่มโพรไบโอติก และกลุ่มควบคุมระหว่างการเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 1 (ทำการทดลอง 8 ซ้ำ แสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  SD)

	กลุ่มทดลอง	0 วัน	30 วัน	60 วัน	90 วัน
น้ำหนักตัว (กรัม)	กลุ่มควบคุม	6.64 $\pm$ 1.38	7.96 $\pm$ 1.83	10.32 $\pm$ 1.75	13.68 $\pm$ 2.0
	กลุ่มโพรไบโอติก	6.39 $\pm$ 1.15	7.69 $\pm$ 1.55	10.26 $\pm$ 1.1	14.47 $\pm$ 1.73
การรอดชีวิต (%)	กลุ่มควบคุม	100 $\pm$ 0	61.9 $\pm$ 18.11	45.0 $\pm$ 15.81	31.3 $\pm$ 15.29
	กลุ่มโพรไบโอติก	100 $\pm$ 0	61.9 $\pm$ 13.87	43.1 $\pm$ 7.99	35.6 $\pm$ 7.76

จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด *Bacillus* สายพันธุ์ S11 และ *Vibrio* spp. ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำระหว่างการเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 1 (ทำการทดลอง 8 ซ้ำ แสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  SD)

	กลุ่มทดลอง	0 วัน	30 วัน	60 วัน	90 วัน
จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด	กลุ่มควบคุม	3.34 $\pm$ 1.2 x10 <sup>5</sup>	5.23 $\pm$ 0.5 x10 <sup>4</sup>	1.0 $\pm$ 0.1 x10 <sup>5</sup>	6.44 $\pm$ 0.4 x10 <sup>4</sup>
	กลุ่มโพรไบโอติก	1.82 $\pm$ 0.2 x10 <sup>5</sup>	4.09 $\pm$ 0.3 x10 <sup>4</sup>	6.2 $\pm$ 0.6 x10 <sup>4</sup>	9.75 $\pm$ 0.3 x10 <sup>4</sup>
<i>Bacillus</i> สายพันธุ์ S11	กลุ่มควบคุม	0	0	0	0
	กลุ่มโพรไบโอติก	0	7.53 $\pm$ 1.3 x10 <sup>2</sup>	1.25 $\pm$ 0.8 x10 <sup>3</sup>	9.19 $\pm$ 2.1 x10 <sup>4</sup>
<i>Vibrio</i> spp.	กลุ่มควบคุม	1.23 $\pm$ 0.9 x10 <sup>4</sup>	3.6 $\pm$ 1.0 x10 <sup>3</sup>	5.5 $\pm$ 0.7 x10 <sup>3</sup>	1.39 $\pm$ 0.6 x10 <sup>4</sup>
	กลุ่มโพรไบโอติก	1.29 $\pm$ 0.3 x10 <sup>4</sup>	7.24 $\pm$ 0.2 x10 <sup>3</sup>	4.17 $\pm$ 2.4 x10 <sup>3</sup>	1.27 $\pm$ 0.4 x10 <sup>4</sup>

จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด *Bacillus* สายพันธุ์ S11 และ *Vibrio* spp. ในซี้กุ้งกุลาดำระหว่างการเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 1 (ทำการทดลอง 8 ซ้ำ แสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  SD)

		0 วัน	30 วัน	60 วัน	90 วัน
จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด	กลุ่มควบคุม	2.27 $\pm$ 0.5 x10 <sup>9</sup>	2.26 $\pm$ 0.1 x10 <sup>10</sup>	5.64 $\pm$ 0.3x10 <sup>11</sup>	1.91 $\pm$ 1.2 x10 <sup>12</sup>
	กลุ่มโพรไบโอติก	3.01 $\pm$ 0.1 x10 <sup>9</sup>	2.12 $\pm$ 0.4 x10 <sup>10</sup>	3.1 $\pm$ 1.0 x10 <sup>11</sup>	2.03 $\pm$ 0.8 x10 <sup>11</sup>
<i>Bacillus</i> สายพันธุ์ S11	กลุ่มควบคุม	0	0	0	0
	กลุ่มโพรไบโอติก	0	2.29 $\pm$ 1.0 x10 <sup>5</sup>	6.61 $\pm$ 3.6 x10 <sup>5</sup>	4.42 $\pm$ 2.3 x10 <sup>10</sup>
<i>Vibrio</i> spp.	กลุ่มควบคุม	1.48 $\pm$ 0.6 x10 <sup>7</sup>	8.88 $\pm$ 6.0 x10 <sup>7</sup>	2.74 $\pm$ 0.6 x10 <sup>8</sup>	9.09 $\pm$ 3.4 x10 <sup>8</sup>
	กลุ่มโพรไบโอติก	1.10 $\pm$ 2.5 x10 <sup>7</sup>	3.73 $\pm$ 0.8 x10 <sup>8</sup>	1.2 $\pm$ 0.8 x10 <sup>8</sup>	2.74 $\pm$ 0.9 x10 <sup>8</sup>

จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด *Bacillus* สายพันธุ์ S11 และ *Vibrio* spp. ในลำไส้กุ้งกุลาดำระหว่างการเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 1 (ทำการทดลอง 8 ซ้ำ แสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  SD)

		0 วัน	30 วัน	60 วัน	90 วัน
จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด	กลุ่มควบคุม	$1.74 \pm 0.2 \times 10^8$	$1.69 \pm 0.7 \times 10^7$	$5.87 \pm 0.8 \times 10^7$	$1.06 \pm 0.1 \times 10^7$
	กลุ่มโพรไบโอติก	$8.22 \pm 0.3 \times 10^7$	$3.34 \pm 1.6 \times 10^7$	$4.90 \pm 0.5 \times 10^7$	$3.26 \pm 1.3 \times 10^6$
<i>Bacillus</i> สายพันธุ์ S11	กลุ่มควบคุม	0	0	0	0
	กลุ่มโพรไบโอติก	0	$4.11 \pm 0.9 \times 10^6$	$2.86 \pm 1.1 \times 10^6$	$1.88 \pm 0.6 \times 10^5$
<i>Vibrio</i> spp.	กลุ่มควบคุม	$4.17 \pm 1.8 \times 10^6$	$1.61 \pm 0.3 \times 10^8$	$2.85 \pm 0.7 \times 10^6$	$2.36 \pm 0.4 \times 10^6$
	กลุ่มโพรไบโอติก	$1.19 \pm 0.1 \times 10^6$	$2.94 \pm 0.6 \times 10^7$	$1.21 \pm 0.5 \times 10^7$	$4.58 \pm 0.4 \times 10^5$

จำนวนเม็ดเลือดรวม (เซลล์/มล.) ในน้ำเลือดกุ้งกุลาดำระหว่างการเลี้ยงกุ้งกุลาดำครั้งที่ 1

กลุ่มทดลอง	No.	0 วัน	30 วัน	60 วัน	90 วัน
กลุ่มควบคุม	1	ND	$2.78 \times 10^7$	$2.50 \times 10^7$	$2.8 \times 10^7$
	2	ND	$2.3 \times 10^7$	$2.13 \times 10^7$	$4.35 \times 10^6$
	3	ND	$2.75 \times 10^7$	$3.93 \times 10^7$	$2.68 \times 10^7$
	ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD		$2.61 \pm 0.27 \times 10^7$	$2.85 \pm 0.95 \times 10^7$	$1.97 \pm 1.33 \times 10^7$
กลุ่มโพรไบโอติก	1	ND	$4.1 \times 10^7$	$3.75 \times 10^7$	$4.2 \times 10^7$
	2	ND	$7.1 \times 10^7$	$6.08 \times 10^7$	$6.45 \times 10^7$
	3	ND	$1.75 \times 10^7$	$6.6 \times 10^7$	$3.28 \times 10^7$
	ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD		$4.32 \pm 2.68 \times 10^7$	$5.48 \pm 1.52 \times 10^7$	$4.64 \pm 1.63 \times 10^7$

เปอร์เซ็นต์ฟาโกไซโตซิส ของเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำระหว่างการเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 1

กลุ่มทดลอง	No.	0 วัน	30 วัน	60 วัน	90 วัน
กลุ่มควบคุม	1	ND	4.8	9.5	5.5
	2	ND	3.3	5.0	6.0
	3	ND	1.5	8.5	ND
	ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD			$3.2 \pm 1.7$	$7.7 \pm 2.4$
กลุ่มโพรไบโอติก	1	ND	2.2	16.5	6.5
	2	ND	2.0	17.0	7.0
	3	ND	9.0	15.5	ND
	ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD			$4.4 \pm 4.0$	$16.3 \pm 0.8$

ฟาร์โกไซติก อินดิเคซ์ ของเม็ดเลือดกึ่งกลาดำระหว่างการเลี้ยงกึ่งครั้งที่ 1

กลุ่มทดลอง	No.	0 วัน	30 วัน	60 วัน	90 วัน
กลุ่มควบคุม	1	ND	0.38	5.37	1.04
	2	ND	0.24	2.15	1.08
	3	ND	0.04	2.5	ND
	ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD		0.22 $\pm$ 0.17	3.34 $\pm$ 1.77	1.06 $\pm$ 0.03
กลุ่มโพรไบโอติก	1	ND	0.09	17.63	1.34
	2	ND	0.15	9.32	2.13
	3	ND	1.27	11.49	ND
	ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD		0.5 $\pm$ 0.66	12.81 $\pm$ 4.31	1.74 $\pm$ 0.56

จำนวนเม็ดโลหิตที่ถูกกินต่อเซลล์เม็ดเลือดกึ่งกลาดำระหว่างการเลี้ยงกึ่งครั้งที่ 1

กลุ่มทดลอง	No.	0 วัน	30 วัน	60 วัน	90 วัน
กลุ่มควบคุม	1	ND	1.6	5.4	2.8
	2	ND	1.8	8.6	2.6
	3	ND	1.4	3.6	ND
	ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD		1.6 $\pm$ 0.2	5.9 $\pm$ 2.5	2.7 $\pm$ 0.1
กลุ่มโพรไบโอติก	1	ND	1.5	6.4	3.2
	2	ND	3.2	3.3	3.9
	3	ND	1.7	4.9	ND
	ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD		2.1 $\pm$ 0.9	4.9 $\pm$ 1.6	3.9 $\pm$ 0.5

ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง) ในพลาสมากึ่งกลาดำระหว่างการเลี้ยงกึ่งครั้งที่ 1

กลุ่มทดลอง	No.	0 วัน	30 วัน	60 วัน	90 วัน
กลุ่มควบคุม	1	ND	0	81.8	89.0
	2	ND	0	87.2	54.2
	3	ND	0	96.5	72.2
	ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD		0 $\pm$ 0	88.5 $\pm$ 7.4	71.8 $\pm$ 17.4
กลุ่มโพรไบโอติก	1	ND	0	92.2	98.3
	2	ND	49.5	97.8	96.4
	3	ND	93.4	98.1	97.2
	ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD		47.6 $\pm$ 46.7	96.0 $\pm$ 3.3	97.3 $\pm$ 1.0

ปริมาณฟีนอลออกซิเดส (units/นาฬิกา/มก.โปรตีน) ในเม็ดเลือดกึ่งกลาดาระหว่างการเลี้ยงกึ่งครั้งที่ 1

กลุ่มทดลอง	No.	0 วัน	30 วัน	60 วัน	90 วัน
กลุ่มควบคุม	1	ND	19.6	234.1	1388.9
	2	ND	43.9	1468.3	332.2
	3	ND	24.2	1142.3	294.1
	4	ND	22.0	210.5	481.3
	5	ND	58.7	ND	ND
	ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD			33.7 $\pm$ 17.0	763.8 $\pm$ 639.4
กลุ่มโพรไบโอติก	1	ND	54.1	800.9	317.3
	2	ND	25.3	ND	828.5
	3	ND	20.1	856.8	824.7
	4	ND	11.4	706.9	903.8
	5	ND	78.9	637.6	962.3
	6	ND	43.9	ND	ND
	ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD			39.0 $\pm$ 25.1	750.6 $\pm$ 97.4

น้ำหนักตัว และการรอดชีวิตของกึ่งกลาดาระหว่างการเลี้ยงกึ่งครั้งที่ 2 (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แสดงค่าเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  SD)

	กลุ่มทดลอง	0 วัน	30 วัน	60 วัน	90 วัน
น้ำหนักตัว (กรัม)	กลุ่มควบคุม	0.18 $\pm$ 0.05	1.03 $\pm$ 0.3	2.77 $\pm$ 0.8	5.87 $\pm$ 1.01
	กลุ่มโพรไบโอติก	0.19 $\pm$ 0.04	1.36 $\pm$ 0.4	3.01 $\pm$ 0.1	6.79 $\pm$ 0.89
การรอดชีวิต (%)	กลุ่มควบคุม	100 $\pm$ 0	52.5 $\pm$ 2.5	33.3 $\pm$ 2.1	24.2 $\pm$ 5.1
	กลุ่มโพรไบโอติก	100 $\pm$ 0	65.8 $\pm$ 1.3	54.2 $\pm$ 1.6	34.2 $\pm$ 3.6

จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด *Bacillus* สายพันธุ์ S11 และ *Vibrio* spp. ในน้ำเลี้ยงกึ่งกลาดาระหว่างการเลี้ยงกึ่งครั้งที่ 2. (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แสดงค่าเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  SD)

		0 วัน	30 วัน	60 วัน	90 วัน
จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด	กลุ่มควบคุม	1.59 $\pm$ 0.1 x10 <sup>4</sup>	8.9 $\pm$ 1.7 x10 <sup>4</sup>	3.06 $\pm$ 2.1 x10 <sup>4</sup>	1.52 $\pm$ 0.6 x10 <sup>4</sup>
	กลุ่มโพรไบโอติก	2.6 $\pm$ 0.1 x10 <sup>3</sup>	2.5 $\pm$ 1.4 x10 <sup>5</sup>	2.43 $\pm$ 1.8 x10 <sup>4</sup>	2.97 $\pm$ 0.2 x10 <sup>4</sup>
<i>Bacillus</i> สายพันธุ์ S11	กลุ่มควบคุม	0	0	0	0
	กลุ่มโพรไบโอติก	0	3.53 $\pm$ 0.2 x10 <sup>4</sup>	1.01 $\pm$ 0.6 x10 <sup>4</sup>	5.7 $\pm$ 1.2 x10 <sup>3</sup>
<i>Vibrio</i> spp.	กลุ่มควบคุม	90 $\pm$ 25	4.0 $\pm$ 1.2 x10 <sup>3</sup>	4.87 $\pm$ 2.4 x10 <sup>3</sup>	2.6 $\pm$ 1.0 x10 <sup>3</sup>
	กลุ่มโพรไบโอติก	90 $\pm$ 36	2.15 $\pm$ 1.3 x10 <sup>3</sup>	6.0 $\pm$ 3.5 x10 <sup>3</sup>	2.73 $\pm$ 0.9 x10 <sup>3</sup>

จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด *Bacillus* สายพันธุ์ S11 และ *Vibrio* spp. ในลำไส้กุ้งกุลาดำระหว่างการเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 2. (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แสดงค่าเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  SD)

	กลุ่มทดลอง	0 วัน	30 วัน	60 วัน	90 วัน
จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด	กลุ่มควบคุม	ND	$7.18 \pm 3.1 \times 10^7$	$1.3 \pm 0.8 \times 10^8$	$9.03 \pm 2.1 \times 10^7$
	กลุ่มโพรไบโอติก	ND	$6.28 \pm 2.2 \times 10^7$	$2.48 \pm 0.9 \times 10^8$	$3.47 \pm 1.0 \times 10^8$
<i>Bacillus</i> สายพันธุ์ S11	กลุ่มควบคุม	ND	0	0	0
	กลุ่มโพรไบโอติก	ND	$1.21 \pm 0.3 \times 10^5$	$2.72 \pm 0.5 \times 10^5$	$2.06 \pm 1.3 \times 10^6$
<i>Vibrio</i> spp.	กลุ่มควบคุม	ND	$7.97 \pm 2.6 \times 10^4$	$1.98 \pm 1.1 \times 10^6$	$2.8 \pm 0.3 \times 10^6$
	กลุ่มโพรไบโอติก	ND	$2.83 \pm 0.2 \times 10^4$	$3.74 \pm 0.1 \times 10^6$	$4.77 \pm 0.6 \times 10^6$

จำนวนเม็ดเลือดรวมในน้ำเลือดกุ้งกุลาดำ หลังการเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 2 เป็นเวลา 90 วัน และหลังเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 เป็นเวลา 10 วัน

กลุ่มทดลอง	No.	หลังการเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 2	หลังเหนี่ยวนำให้เกิดโรค
กลุ่มควบคุม	1	$1.64 \times 10^7$	$7.75 \times 10^6$
	2	$1.70 \times 10^7$	$1.49 \times 10^7$
	3	$7.0 \times 10^6$	ND
	ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD	$1.36 \pm 0.56 \times 10^7$	$1.13 \pm 0.51 \times 10^7$
กลุ่มโพรไบโอติก	1	$2.7 \times 10^7$	$1.16 \times 10^7$
	2	$1.84 \times 10^7$	$1.26 \times 10^7$
	3	$3.15 \times 10^7$	$9.0 \times 10^6$
	ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD	$2.56 \pm 0.67 \times 10^7$	$1.11 \pm 0.19 \times 10^7$

เปอร์เซ็นต์ฟาโกไซโตซิสของเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำ หลังการเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 2 เป็นเวลา 90 วัน และหลังเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 เป็นเวลา 10 วัน

กลุ่มทดลอง	No.	หลังการเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 2	หลังเหนี่ยวนำให้เกิดโรค
กลุ่มควบคุม	1	1.0	4.0
	2	0.5	6.5
	3	1.5	7.5
	ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD	$1.0 \pm 0.5$	$6.0 \pm 1.8$
กลุ่มโพรไบโอติก	1	1.0	8.5
	2	3.0	12.0
	3	2.5	11.0
	ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD	$2.2 \pm 1.0$	$10.5 \pm 1.8$

ฟาโกไซติก อินเด็กซ์ ของเม็ดเลือดกึ่งกลาดำ หลังการเลี้ยงกึ่งครั้งที่ 2 เป็นเวลา 90 วัน และหลังเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 เป็นเวลา 10 วัน

กลุ่มทดลอง	No.	หลังการเลี้ยงกึ่งครั้งที่ 2	หลังเหนี่ยวนำให้เกิดโรค
กลุ่มควบคุม	1	0.01	0.3
	2	0.005	0.78
	3	0.04	0.79
	ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD	0.02 $\pm$ 0.02	0.62 $\pm$ 0.28
กลุ่มโพรไบโอติก	1	0.02	2.0
	2	0.21	3.54
	3	0.10	2.66
	ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD	0.11 $\pm$ 0.10	2.73 $\pm$ 0.77

จำนวนเม็ดลาเท็กซ์ที่ถูกกินต่อเซลล์เม็ดเลือดกึ่งกลาดำ หลังการเลี้ยงกึ่งครั้งที่ 2 เป็นเวลา 90 วัน และหลังเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 เป็นเวลา 10 วัน

กลุ่มทดลอง	No.	หลังการเลี้ยงกึ่งครั้งที่ 2	หลังเหนี่ยวนำให้เกิดโรค
กลุ่มควบคุม	1	1.0	1.9
	2	2.0	1.8
	3	1.7	1.4
	ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD	1.6 $\pm$ 0.5	1.7 $\pm$ 0.3
กลุ่มโพรไบโอติก	1	2.0	2.8
	2	2.3	2.5
	3	1.6	2.2
	ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD	2.0 $\pm$ 0.4	2.5 $\pm$ 0.3

ปริมาณฟีนอลออกซิเดส(units/นาที/มก.โปรตีน) ในเม็ดเลือดกึ่งกลาดำ หลังการเลี้ยงกึ่งครั้งที่ 2 เป็นเวลา 90 วัน และหลังเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 เป็นเวลา 10 วัน

กลุ่มทดลอง	No.	หลังการเลี้ยงกึ่งครั้งที่ 2	หลังเหนี่ยวนำให้เกิดโรค
กลุ่มควบคุม	1	2.1	8.4
	2	8.8	7.0
	3	20.1	ND
	ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD	10.3 $\pm$ 9.1	7.7 $\pm$ 1.0
กลุ่มโพรไบโอติก	1	52.6	33.6
	2	35.2	15.8
	3	35.1	ND
	ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD	41.0 $\pm$ 10.1	24.7 $\pm$ 12.6



ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง) ในพลาสมากุ้งกุลาดำ หลังการเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 2 เป็นเวลา 90 วันและ หลังเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 เป็นเวลา 10 วัน

กลุ่มทดลอง	No.	หลังการเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 2	หลังเหนี่ยวนำให้เกิดโรค
กลุ่มควบคุม	1	3.4	87.4
	2	50.2	66.0
	3	0	58.1
	ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD	$17.9 \pm 28.1$	$70.5 \pm 15.2$
กลุ่มโพรไบโอติก	1	56.5	84.5
	2	40.6	79.8
	3	0	97.8
	ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD	$32.4 \pm 29.1$	$87.4 \pm 9.3$

การตายสะสมของกุ้งกุลาดำระหว่างการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 เป็นเวลา 90 วัน

	0 วัน	1 วัน	2 วัน	3 วัน	4 วัน	5 วัน	6 วัน	7 วัน	8 วัน	9 วัน	10 วัน
กลุ่มควบคุม	0	0	0	0	9.7	19.4	38.7	48.4	58.1	61.3	64.5
กลุ่มโพรไบโอติก	0	0	0	0	2.9	11.4	31.4	40.0	45.7	45.7	45.7

จำนวน *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 และ *Bacillus* สายพันธุ์ S11 ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ระหว่างการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 เป็นเวลา 10 วัน (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  SD)

		0 วัน	2 วัน	4 วัน	6 วัน	8 วัน	10 วัน
<i>V. harveyi</i> สายพันธุ์ 1526	กลุ่มควบคุม	$1.55 \pm 0.1$ $\times 10^7$	$6.5 \pm 2.8$ $\times 10^3$	$1.75 \pm 0.6$ $\times 10^7$	$1.61 \pm 0.8$ $\times 10^5$	$4.0 \pm 2.1$ $\times 10^2$	$2.01 \pm 1.7$ $\times 10^4$
	กลุ่มโพรไบโอติก	$1.29 \pm 0.3$ $\times 10^7$	$8.0 \pm 2.8$ $\times 10^3$	$1.35 \pm 0.5$ $\times 10^7$	$1.38 \pm 0.1$ $\times 10^4$	$7.5 \pm 1.0$ $\times 10^2$	$4.2 \pm 0.9$ $\times 10^2$
<i>Bacillus</i> สายพันธุ์ S11	กลุ่มควบคุม	0	0	0	0	0	0
	กลุ่มโพรไบโอติก	$2.23 \pm 0.3$ $\times 10^4$	$1.73 \pm 0.5$ $\times 10^4$	$1.82 \pm 0.5$ $\times 10^4$	$1.15 \pm 0.4$ $\times 10^4$	$1.91 \pm 1.0$ $\times 10^3$	$2.98 \pm 0.2$ $\times 10^3$

จำนวน *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 และ *Bacillus* สายพันธุ์ S11 ในลำไส้กุ้งกุลาดำ ระหว่างการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 เป็นเวลา 10 วัน (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  SD)

		0 วัน	2 วัน	4 วัน	6 วัน	8 วัน	10 วัน
<i>V. harveyi</i> สายพันธุ์ 1526	กลุ่ม ควบคุม	$2.4 \pm 0.1$ $\times 10^5$	$1.5 \pm 0.5$ $\times 10^6$	$2.1 \pm 1.1$ $\times 10^6$	$1.33 \pm 1.6$ $\times 10^5$	$1.53 \pm 0.4$ $\times 10^6$	$3.41 \pm 0.1$ $\times 10^8$
	กลุ่ม โพรไบโอติก	$4.23 \pm 2.1$ $\times 10^5$	$2.0 \pm 1.8$ $\times 10^6$	$5.0 \pm 0.1$ $\times 10^6$	$5.81 \pm 0.1$ $\times 10^6$	$1.67 \pm 0.3$ $\times 10^5$	$7.27 \pm 0.2$ $\times 10^5$
<i>Bacillus</i> สายพันธุ์ S11	กลุ่ม ควบคุม	0	0	0	0	0	0
	กลุ่ม โพรไบโอติก	$1.98 \pm 0.3$ $\times 10^6$	$1.3 \pm 0.5$ $\times 10^6$	$1.0 \pm 0.3$ $\times 10^5$	$6.4 \pm 1.3$ $\times 10^4$	$3.32 \pm 1.5$ $\times 10^5$	$9.9 \pm 3.2$ $\times 10^5$



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ประวัติผู้เขียน

นายสมบัติ รักประทานพร เกิดเมื่อวันที่ 5 กุมภาพันธ์ 2515 ที่กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2538 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2539 และสำเร็จการศึกษาในภาคต้น ปีการศึกษา 2542.



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย