บทที่ 5
อภิปรายผลการทดลอง

5.1 การทดสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของผลิตภัณฑ์ทางการค้า IE-04

การเสริมด้วยสารกระตุ้น IE-04 ความเข้มข้นต่างๆ คือ 100, 500, 1000 และ 5000 ppm แก่กุ้งกุลาดำเป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นนำมาทดสอบความต้านทานต่อการติดเชื้อแบคทีเรียและไวรัส โดยเหนี่ยวนำด้วยการฉีด *V. parahaemolyticus* ความเข้มข้น $2.23x10^5$ CFU/pc และแช่ด้วย YHV 1: 10,000 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง รวมทั้งตรวจสอบระดับ bactericidin, % phagocytosis และ phagocytic index พบว่าทุกกลุ่มความเข้มข้น มีอัตรารอดของกุ้งหลังเหนี่ยวนำด้วยการฉีด *V. parahaemolyticus* ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับกลุ่มควบคุม ($P<0.05$) แต่เมื่อคำนวนค่า RPS พบว่ากลุ่มที่เสริมด้วยสารกระตุ้น IE-04 ความเข้มข้น 100 ppm มีค่า RPS สูงกว่ากลุ่มอื่นๆโดยมีค่าเท่ากับ 20.05% แสดงว่ากลุ่มที่ได้รับสารกระตุ้น IE-04 ความเข้มข้น 100 ppm มีอัตรารอดหลังเหนี่ยวนำด้วย *V. parahaemolyticus* ดีกว่ากลุ่มควบคุม 20% จัดว่าประสิทธิภาพยังไม่สูงพอ สำหรับประสิทธิภาพที่ดีควรมีค่า RPS มากกว่าหรือเท่ากับ 60% (Ellis, 1988) อาจเนื่องจากวิธีการเหนี่ยวนำโดยการฉีดเชื้อแบคทีเรียเข้ากล้ามเนื้อเป็นวิธีที่แตกต่างจากการเกิดโรคตามธรรมชาติ ทำให้กุ้งได้รับเชื้อในปริมาณสูง (มากกว่า LD_{50}) (Sung และคณะ (1994) และรวดเร็วเกินกว่าจะสามารถกำจัดด้วยกลไกทางด้านภูมิคุ้มกัน (Ellis, 1988) และในทุกกลุ่มไม่พบความต้านทานต่อการติดเชื้อ YHV และมีเพียงกลุ่มความเข้มข้น 100 และ 500 ppm ที่มี %phagocytosis สูงกว่ากลุ่มควบคุม ($P<0.05$) ส่วนระดับ bactericidin นั้นพบว่าสูงขึ้นในทุกกลุ่มความเข้มข้นของสารกระตุ้นและคงอยู่นาน 7 วันหลังได้รับการเสริม แสดงว่าสามารถชักนำให้เกิดการสร้าง bactericidin เพิ่มขึ้นได้ด้วยการเสริมสารกระตุ้น IE-04 ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานอื่นๆ ที่พบว่าสามารถชักนำ bactericidin ให้มีระดับสูงขึ้นได้ (Evans et al.,1968, 1969a; b; 1969; Acton et al., 1969; Weiheinmer et al., 1969; Adams, 1991) แต่ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับความต้านทานต่อการติดเชื้อแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้นอาจเนื่องจากความจำเพาะบางส่วนของกลไกการตอบสนองโดย bactericidin เนื่องจากแบคทีเรียชนิดที่ใช้ในการทดสอบความต้านทานต่อการเกิดโรค คือ *V. parahaemolyticus* เป็นสายพันธุ์ที่แยกจากกุ้งป่วยและมีความรุนแรงกว่า *Vibrio* sp. ที่ใช้ในการตรวจหาระดับ bactericidin เช่นเดียวกับการศึกษาของ Stewart และ Zwicker (1972); Weinheimer และคณะ (1969) McKay และ Jenkin (1969) ในกุ้งมังกร *H. americanus* พบว่ามีระดับ bactericidin ต่อ *P. perolenes* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ไม่ทำให้เกิดโรคที่ไดเตอร์สูงแต่ไม่มีผลต่อ *A.*

viridan ที่เป็นสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงต่อการเกิดโรคในกุ้งมังกร และพบว่าการเพิ่มขึ้นของ bactericidin ไม่มีความสัมพันธ์ต่อความต้านทานต่อการติดเชื้อ YHV เช่นเดียวกับการศึกษาของ Sritunyalucksana (1995) พบว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับการเสริมด้วยสารกระตุ้นบางชนิดมีความต้านทานต่อการติดเชื้อ YHV สูงขึ้นเมื่อตรวจสอบการตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกันต่อสารกระตุ้นเดียวกันไม่พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของระดับ bactericidin, agglutinin รวมทั้งเอนไซม์ phenoloxidase

ส่วนกลุ่มความเข้มข้น 100 และ 500 ppm มีการเพิ่มขึ้นของ %phagocytosis โดยไม่พบว่ามีการเพิ่มขึ้นที่ความเข้มข้นที่สูงกว่า (1000 และ 5000 ppm) แสดงว่าการเพิ่มหรือการกระตุ้นภูมิคุ้มกันนั้นขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารกระตุ้น ถ้าความเข้มข้นไม่เหมาะสม คือ ความเข้มข้นสูงหรือต่ำเกินไปจะไม่มีผลต่อการเพิ่มภูมิต้านทานและอาจกดภูมิคุ้มกันได้ (Anderson, 1992) เช่นเดียวกับการศึกษาการกระตุ้นโดยใช้ β-glucan ในกุ้งกุลาดำ พบว่าระดับที่สูงหรือต่ำเกินไปไม่มีผลต่อการเพิ่มความต้านทานโรค (Sung et al., 1994)

ส่วนการเพิ่มขึ้นของ % phagocytosis โดยไม่พบว่ามีความต้านทานต่อการติดเชื้อแบคทีเรียและ YHV เพิ่มขึ้นนั้น อาจเนื่องมาจากการที่ให้สารกระตุ้นผสมอาหาร ส่วนการเหนี่ยวนำด้วย *V. parahaemolyticus* ทำโดยวิธีการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ ซึ่งเป็นวิธีการรับเชื้อที่ต่างจากธรรมชาติ ทำให้ผลในการเพิ่มความต้านทานลดลง และในส่วนของการเหนี่ยวนำด้วยเชื้อ YHV นั้น พบว่าความเข้มข้นและเวลาที่ใช้ในการแช่เชื้อ YHV นั้นอาจจะสูงเกินไปเนื่องจากไม่สามารถกำหนดความเข้มข้นในช่วง LD_{50} ทำให้กุ้งตายอย่างรวดเร็วโดยพบว่าทำให้กุ้งตายหมดหลังการเหนี่ยวนำในเวลา 5 วัน ทำให้ระดับของภูมิต้านทานที่เกิดขึ้นเนื่องจากการเพิ่มระดับของ % phagocytosis นั้นไม่สามารถทำให้เกิดความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นและกลุ่มควบคุมได้ หรือระยะเวลาที่ให้สารกระตุ้น IE-04 อาจสั้นเกินไปหรือยังไม่เหมาะสม อาจต้องมีการเสริมในระยะเวลาที่เหมาะสมจึงจะช่วยเสริมภูมิต้านทานได้ (Anderson 1992) ผลการเสริมด้วยสารกระตุ้น IE-04 ไม่สอดคล้องกับการศึกษาใน *P. japonicus* โดยเสริมด้วยสารกระตุ้นจาก *C. butyricum* เป็นเวลา 7 วัน มี % phagocytosis สูงขึ้น และมีความต้านทานต่อ *Vibrio* sp. สูงขึ้นด้วย อาจเนื่องจากชนิดของสัตว์ทดลอง ชนิดและความเข้มข้นของสารกระตุ้นรวมทั้งสภาพแวดล้อมที่ต่างกันมีผลต่อการเสริมภูคุ้มกัน (Anderson, 1992) จากผลการศึกษาที่ได้ควรใช้ความเข้มข้น 100 ppm ในการศึกษาต่อไป

5.2 การทดสอบการเสริมภูมิคุ้มกันด้วยสารกระตุ้น IE-04 ความเข้มข้น 100 และ 200 ppm เป็นเวลา 30, 60 และ 90 วัน

การเสริมด้วยสารกระตุ้น IE-04 ความเข้มข้น 100 และ 200 ppm ติดต่อกัน 30-90 วัน อัตรารอดและน้ำหนักเฉลี่ยของกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารกระตุ้น IE-04 ไม่มีความแตกต่างกัน ($P<0.05$) โดยพบว่าคุณภาพน้ำตลอดการเลี้ยงอยู่ในพิสัยที่ไม่เป็นอันตรายต่อกุ้ง (ชลอ, 2534;Chiang et al, 1989; Boyd, 1989; Chenand Lei, 1990; WetZel, 1975; ภาคผนวก ฉ) และไม่มีความแตกต่างในทุกกลุ่มการทดลอง ดังนั้นคุณภาพน้ำตลอดการเลี้ยงจึงไม่มีผลต่อความแข็งแรงของกุ้งที่ใช้ในการทดสอบ

การเสริมด้วยสารกระตุ้น IE-04 ความเข้มข้น 100 และ 200 ppm ติดต่อกัน 30 วัน ไม่พบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำด้วย *V. parahaemolyticus* (RPS เท่ากับ 2.78 และ 8.33% ตามลำดับ) และพบว่าอัตรารอดหลังการเหนี่ยวนำด้วย YHV ของกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่เสริมด้วยสารกระตุ้นไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) แต่กลุ่มที่เสริมด้วยสารกระตุ้นมีอัตราการตายช้ากว่ากลุ่มควบคุม และมีผลต่อความต้านทานต่อการติดเชื้อ YHV เพิ่มขึ้นเล็กน้อย โดยมีค่า RPS เท่ากับ 37.04 และ 22.22 % ตามลำดับ แสดงว่ากลุ่มที่ได้รับการเสริมด้วยสารกระตุ้น IE-04 ความเข้มข้น 100 และ 200 ppm มีอัตรารอดดีกว่ากลุ่มควบคุม 37.04 และ 22.22% ตามลำดับ แต่ในการทดลองไม่สามารถตรวจสอบระดับ bactericidin และ % phagocytosis เนื่องจากกุ้งยังมีขนาดเล็กจึงไม่สามารถศึกษาความสัมพันธ์ของการตอบสนองภูมิคุ้มกันต่อการต้านทานเชื้อ YHV

หลังการเสริมด้วยสารกระตุ้น IE-04 เป็นเวลา 60 วัน ไม่พบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำด้วย *V. parahaemolyticus* และพบว่าอัตรารอดหลังการเหนี่ยวนำด้วย YHV ของกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่เสริมด้วยสารกระตุ้นไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) แต่กลุ่มที่เสริมด้วยสารกระตุ้นมีอัตราการตายช้ากว่ากลุ่มควบคุม และมีผลต่อความต้านทานต่อการติดเชื้อ YHV เพิ่มขึ้นเล็กน้อย โดยกลุ่มความเข้มข้น 100 ppm จะมีความต้านทานต่อ YHV สูงกว่ากลุ่มความเข้มข้น 200 ppm โดยมีค่า RPS เท่ากับ 43.33 และ 30% ซึ่งสูงกว่าการเสริมด้วยสารกระตุ้นเป็นเวลา 30 วัน และพบระดับ bactericidin เพิ่มขึ้นทั้งสองความเข้มข้น ส่วน % phagocytosis มีค่าลดลงในกลุ่มความเข้มข้น 200 ppm

ส่วนการเสริมด้วยสารกระตุ้น IE-04 เป็นเวลา 90 วัน พบว่าไม่มีความต้านทานต่อ *V. parahaemolyticus* และความต้านทานต่อ YHV ลดลงทั้งสองกลุ่มความเข้มข้น (RPS เท่ากับ -20.83 และ -29.17 ตามลำดับ) และมีระดับ bactericidin เพิ่มขึ้นในกลุ่มความเข้มข้น 100 ppm และลดลงในกลุ่มความเข้มข้น 200 ppm ส่วน % phagocytosis ไม่แตกต่างกันกับกลุ่มควบคุม ($p<0.05$) แสดงว่าการเสริมด้วยสารกระตุ้น IE-04 นาน 90 วัน มีผลต่อการลดความต้านทานต่อ

การติดเชื้อ YHV เนื่องจาก RPS มีค่าในทางลบ คือ กลุ่มที่เสริมด้วยสารกระตุ้นมีอัตรารอดต่ำกว่ากลุ่มควบคุม เนื่องจากระยะเวลาที่ให้สารกระตุ้นนานเกินไปจึงมีผลต่อการยับยั้งกลไกทางด้านภูมิคุ้มกันได้ (Anderson, 1992)

การเสริมด้วยสารกระตุ้น IE-04 เป็นเวลา 30 และ 60 วัน มีผลต่อการเพิ่มความต้านทานต่อเชื้อ YHV โดยไม่พบว่าการเสริมด้วย IE-04 เป็นเวลานานจะช่วยเพิ่มความต้านทานต่อ *V. parahaemolyticus* ถึงแม้ว่าระดับของ bactericidin จะสูงขึ้นก็ตาม แสดงว่า bactericidin ที่สูงขึ้นนั้นไม่น่าจะมีความเกี่ยวข้องกับความต้านทานต่อการติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้กล่าวข้างต้น (ข้อ 5.1) และสอดคล้องกับรายงานอื่นๆ (McKay and Jenkin, 1969; Weinheimer et al., 1969; Stewart and Zwicker, 1972) ส่วนการเพิ่มความต้านทานต่อ YHV โดยไม่พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของ %phagocytosis ไม่สอดคล้องกับการรายงานของ Boonyarataparin และคณะ (1993) ที่เสริม peptidoglycan ลงในอาหารให้กุ้งกุลาดำกินและพบว่ามีความต้านทานต่อ YHV เพิ่มขึ้น และมี % phagocytosis สูงขึ้นด้วย อาจเนื่องจากสารกระตุ้นที่ใช้ต่างชนิดกันจึงมีผลต่อการตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกันแตกต่างกันไปรวมทั้งวิธีการเหนี่ยวนำและวิธีการตรวจสอบที่ต่างกันทำให้พบการตอบสนองของ phagocytosis ต่างกัน (Anderson, 1992)

การกระตุ้นด้วย IE-04 ความเข้มข้น 100 และ 200 ppm มีผลต่อการเสริมภูมิต้านทานต่อ YHV ได้สูงขึ้นเมื่อให้การเสริมติดต่อกันเป็นเวลา 30-60 วัน แต่มีผลในทางตรงข้ามเมื่อให้การเสริมเป็นเวลานาน 90 วัน เนื่องจากถ้าให้การกระตุ้นในความเข้มข้นและระยะเวลาที่ไม่เหมาะสมจะมีผลต่อการเสริมภูมิคุ้มกันและยังอาจจะไปลดความต้านทานลงได้ (Anderson, 1992) และจากการตรวจสอบการตอบสนองโดยเซลล์ คือ phagocytosis ไม่พบการเพิ่มขึ้นหลังการเสริมด้วยสารกระตุ้น แต่พบความต้านทานต่อการติดเชื้อ YHV อาจเนื่องจากสารกระตุ้นนี้มีผลต่อการเพิ่มการตอบสนองของภูมิคุ้มกันชนิดอื่น และพบว่าความเข้มข้น 100 ppm จะให้ความต้านทานต่อเชื้อ YHV ได้มากกว่าความเข้มข้น 200 ppm และพบการเพิ่มขึ้นของ bactericidin จึงเลือกใช้ความเข้มข้น 100 ppm ในการทดสอบเปรียบเทียบกับเซลล์ของ *C. butyricum*

5.3 การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของเซลล์ *C. butyricum* ต่อการเสริมภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ

เมื่อทำการเสริมด้วยเซลล์ของ *C. butyricum* ความเข้มข้น 100, 200 และ 500 ppm ลงในอาหารกุ้งติดต่อกันเป็นเวลา 7 วัน และทำการตรวจสอบความต้านทานต่อการเกิดโรคติดเชื้อแบคทีเรียและไวรัส ระดับ bactericidin และ % phagocytosis พบว่าหลังการเสริมด้วยเซลล์ของ *C.butyricum* เป็นเวลา 7 วัน ระดับ bactericidin และ % phagocytosis ในกลุ่มความเข้มข้น 200 และ 500 ppm สูงขึ้นโดยไม่ได้ทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำด้วยแบคทีเรียและไวรัส เนื่องจากขัดข้องในเรื่องสถานที่และอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง แสดงว่า bactericidin และ % phagocytosis สามารถชักนำให้เพิ่มขึ้นได้เช่นเดียวกับการรายงานอื่นๆ (McKay and Jenkin, 1970; Paterson et al., 1976; Goldenberg et al., 1984) โดยการกระตุ้นด้วยเซลล์ของ *C. butyricum* ซึ่งผนังเซลล์มีส่วนประกอบของ peptidoglycan (Commins and Johnson, 1971; Schleifer and Kandler, 1972; Sleytr et al., 1988)

หลังจากหยุดให้เซลล์ของ *C. butyricum* เป็นเวลา 7 วัน ไม่พบการเพิ่มความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำด้วย *V. parahaemolyticus* ในทุกกลุ่มความเข้มข้นและพบว่าระดับ bactericidin และ % phagocytosis มีค่าลดลง แต่การเสริมด้วยเซลล์ของ *C. butyricum* มีผลต่อการเพิ่มความต้านทานต่อ YHV โดยมีอัตราการตายช้ากว่ากลุ่มควบคุม กลุ่มความเข้มข้น 100 , 200 และ 500 ppm มีค่า RPS เท่ากับ 57.15%, 14.29% และ 0% ตามลำดับ แสดงว่ากลุ่มที่เสริมด้วยเซลล์ของ *C. butyricum* ความเข้มข้น 100 ppm มีประสิทธิภาพค่อนข้างดีเนื่องจาก RPS มีค่าใกล้เคียง 60 % และมีผลต่อการเพิ่มความต้านทานต่อ YHV ดีกว่าความเข้มข้นอื่น คือ มีอัตรารอดดีกว่ากลุ่มควบคุม 57.15% และลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์ของ *C. butyricum* ส่วนความเข้มข้นที่สูงที่สุด คือ 500 ppm ไม่มีผลต่อการเพิ่มความต้านทานต่อ YHV แสดงว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ทดสอบต่อไป คือ 100 ppm เนื่องจากถ้าความเข้มข้นของสารกระตุ้นสูงเกินไปอาจมีผลในการลดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้ (Anderson, 1992;) สอดคล้องกับการรายงานของ Sung และคณะ (1994) ที่ศึกษาการกระตุ้นในกุ้งกุลาดำด้วย β-glucan และพบว่าที่ความเข้มข้นสูงหรือต่ำเกินไปไม่มีผลต่อการเพิ่มความต้านทานโรค Soderhall และ Hall (1983) ใช้สารกระตุ้น LPS ใน crayfish พบว่ามีการกระตุ้นของระบบ ProPO เมื่อใช้สารกระตุ้นความเข้มข้นต่ำๆ แต่ไม่พบการกระตุ้นที่ความเข้มข้นสูง และจากการทดลองพบว่าความต้านทานต่อ YHV ที่เพิ่มขึ้นไม่มีส่วนสัมพันธ์กับระดับของ bactericidin และ % phagocytosis รวมทั้งภูมิต้านทานที่เกิดขึ้นจะอยู่ได้นาน 7 วันหลังได้รับเซลล์ของ *C. butyricum* โดยพบว่าหลังได้รับเสริมด้วยเซลล์ของ *C. butyricum* เป็นเวลา 14 วัน ความต้านทานต่อ YHV จะลดลง (RPS มีค่าลบ) (Anderson, 1992)

5.4 การทดสอบเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารกระตุ้น IE-04 และเซลล์ของ *C. butyricum* ต่อการเสริมภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ

หลังการเสริมด้วยสารกระตุ้น IE-04 และเซลล์ของ *C. butyricum* ความเข้มข้น 100 ppm ติดต่อกันเป็นเวลา 30 วัน โดยพบว่าคุณภาพน้ำตลอดการเลี้ยงอยู่ในพิสัยที่ไม่เป็นอันตรายต่อกุ้ง (ชลอ, 2534;Chiang et al, 1989; Boyd, 1989; Chenand Lei, 1990; WetZel, 1975; ภาคผนวก ฉ) และไม่มีความแตกต่างในทุกกลุ่มการทดลอง ดังนั้นคุณภาพน้ำตลอดการเลี้ยงจึงไม่มีผลต่อความแข็งแรงของกุ้งที่ใช้ในการทดสอบ

หลังการเสริมด้วยสารกระตุ้น IE-04 และเซลล์ของ *C. butyricum* ความเข้มข้น 100 ppm ติดต่อกันเป็นเวลา 30 วัน ความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำโดยการแช่ด้วย *V. harveyi* สูงขึ้น โดยมีค่า RPS เท่ากับ 37.93 และ 27.59% ตามลำดับ ส่วนความต้านทานต่อ YHV พบว่ามีเพิ่มขึ้นเล็กน้อย RPS เท่ากับ 16 และ 20% ตามลำดับ แต่ไม่พบการเพิ่ม % phagocytosis และพบว่ามีการเพิ่มระดับ bactericidin ในกลุ่มที่ได้รับการเสริมด้วยสารกระตุ้น IE-04 แต่ไม่พบการเพิ่มระดับ bactericidin ต่อ *Vibrio sp.* ในกลุ่มที่เสริมด้วยเซลล์ของ *C. butyricum* แสดงว่าระดับของ bactericidin และ % phagocytosis นั้นไม่มีผลต่อการเพิ่มความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำด้วย *V. harveyi* และ YHV สำหรับในการทดลองที่ผ่านมาพบว่า IE-04 และเซลล์ของ *C. butyricum* ไม่มีผลต่อการเพิ่มความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำด้วย *V. parahaemolyticus* โดยการฉีด เมื่อให้ในระยะเวลาสั้น คือ 7 วัน และในระยะเวลานาน 30-90 วัน แต่ในการทดลองนี้พบว่ามีผลในการเพิ่มความต้านทานต่อ *V. harveyi* แสดงว่าอาจเกิดจากความจำเพาะต่อชนิดของเชื้อ หรือระยะเวลาที่ให้สารกระตุ้นอย่างเหมาะสม (Anderson, 1992) รวมทั้งอาจเนื่องจากวิธีเหนี่ยวนำที่ต่างออกไป ในการทดลองที่ผ่านมาเหนี่ยวนำด้วย *V. parahaemolyticus* โดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ ซึ่งอาจเป็นการให้เชื้อที่แตกต่างจากการได้รับสารกระตุ้นทางการกิน รวมทั้งวิธีการเหนี่ยวนำโดยการฉีดเป็นวิธีที่ต่างจากการรับเชื้อในธรรมชาติ ทำให้ผลต่อความต้านทาน *V. parahaemolyticus* ในการทดสอบที่ผ่านมาไม่ให้ผลดีนัก ส่วนในการทดลองนี้ใช้ *V. harveyi* โดยวิธีการแช่ ซึ่งเป็นวิธีการให้เชื้อที่เหมือนในธรรมชาติ โดยกุ้งจะค่อยๆ ได้รับเชื้อผ่านทางเหงือก, ทางเดินอาหารอย่างช้าๆ ทำให้ภูมิคุ้มกันที่ได้รับการกระตุ้นสามารถเพิ่มความต้านทานได้ดีขึ้น (Ellis, 1988) และพบว่าความต้านทานต่อ *V. harveyi* นี้จะคงอยู่ได้หลังได้รับสารกระตุ้น IE-04 หรือเซลล์ของ *C. butyricum* เท่านั้น โดยไม่พบว่ามีผลต่อความต้านทานหลังจากหยุดให้การเสริมเป็นเวลา 7 วัน แสดงว่าภูมิคุ้มกันที่ได้รับการกระตุ้นให้มีต่อการติดเชื้อ *V. harveyi* จะคงอยู่ได้เป็นเวลาสั้นหลังการกระตุ้น โดยไม่พบความสัมพันธ์กับระดับ bactericidin ที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากหลังหยุดได้รับสารกระตุ้นเป็นเวลา 7 วัน ระดับ bactericidin ของกลุ่มที่ได้รับการเสริมด้วย IE-04 และ เซลล์ของ *C. butyricum* มีค่าสูงขึ้น

แต่พบว่าความต้านทานต่อการติดเชื้อ *V. harveyi* กลับลดลง ซึ่งอาจเนื่องมาจากความจำเพาะบางส่วนของ bactericidin ที่มีต่อ *Vibrio* sp. ที่ใช้ในการทดสอบซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ไม่มีความรุนแรงต่อการเกิดโรคในกุ้งกุลาดำ ส่วน *V. harveyi* เป็นสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงในการก่อโรคในกุ้งกุลาดำ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Cornick และ Stewart (1968) ในกุ้งมังกร *H. americanus* ที่พบว่ามี bactericidin ในระดับสูงต่อการยับยั้ง *P. perolens* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ไม่ทำให้เกิดโรค แต่ไม่มีผลต่อ *Aerococcus viridan* var *hamori* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในกุ้งมังกร

ส่วนความต้านทานต่อการติดเชื้อ YHV หลังได้รับการเสริม IE-04 หรือเซลล์ของ *C. butyricum* เป็นเวลา 30 วัน และคงอยู่หลังหยุดการเสริมเป็นเวลา 7 วัน มีค่า RPS เท่ากับ 46.18 และ 15.37% ตามลำดับ โดยไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับ % phagocytosis เนื่องจากไม่พบว่ามีการเพิ่มของ % phagocytosis ในทุกกลุ่มการทดลอง

การเสริมด้วยสารกระตุ้น IE-04 เป็นเวลา 30 วัน จะเพิ่มความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำด้วย *V. harveyi* และ YHV โดยวิธีการแช่ ได้ดีกว่าการเสริมด้วยเซลล์ของ *C. butyricum* ด้วยความเข้มข้นและระยะเวลาเท่ากัน (100 ppm เป็นเวลา 30 วัน) เพียงเล็กน้อย อาจเนื่องจากเตรียมจากแบคทีเรียแกรมบวกเหมือนกัน คือ *C. butyricum* แต่ต่างสายพันธุ์ทำให้องค์ประกอบของเซลล์และผนังเซลล์มีความแตกต่างกันไม่มากนักหรืออาจเนื่องจากวิธีที่ใช้ในการเตรียมสารกระตุ้นที่ต่างกัน คือ สารกระตุ้น IE-04 ใช้วิธี spray dry ส่วนเซลล์ของ *C. butyricum* เตรียมโดยการใช้ฟอร์มาลิน ทำให้คุณสมบัติบางอย่างแตกต่างกัน จึงได้ทำการศึกษาต่อโดยนำเซลล์ของ *C. butyricum* และสารกระตุ้น IE-04 มาผสมกันและดูผลต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำต่อไป

5.5 การทดสอบเปรียบเทียบผลของสารกระตุ้น IE-04, เซลล์ของ *C. butyricum* และ สารผสมระหว่างสารกระตุ้น IE-04, เซลล์ของ *C. butyricum* ในอัตราส่วน 1:1 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) เป็นเวลาติดต่อกัน 7 วัน และหลังหยุดการเสริมเป็นเวลา 7 และ 14 วัน

หลังการเสริมด้วยสารกระตุ้น IE-04 ความเข้มข้น 100 ppm , เซลล์ของ *C. butyricum* ความเข้มข้น 100 ppm และ สารผสมความเข้มข้น 100 และ 200 ppm เป็นเวลา 7 วัน พบว่าทุกกลุ่มที่เสริมด้วยสารกระตุ้นมีระดับ bactericidin ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม แต่มี % phagocytosis ไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม ยกเว้นในกลุ่มที่เสริมด้วยเซลล์ของ *C. butyricum* มีค่า phagocytosis สูงกว่ากลุ่มควบคุม และพบว่ากลุ่มที่เสริมด้วยสารผสม ความเข้มข้น 100 ppm มีความต้านทานต่อ *V. harveyi* โดยมีค่า RPS เท่ากับ 26.32%) และลดลงหลังหยุดให้การเสริม 7-14 วัน ส่วนกลุ่มที่ให้สารผสมความเข้มข้น 200 ppm มีความต้านทานต่อ *V. harveyi* หลังหยุดการเสริม 7 วัน โดยมีค่า RPS เท่ากับ 46.67%น ส่วนความต้านทานต่อ YHV นั้นพบว่ากลุ่มที่เสริมด้วยเซลล์ของ *C.*

butyricum และสารผสมความเข้มข้น 100 ppm มีความต้านทานเพิ่มขึ้น (RPS= 20, และ 25% ตามลำดับ) โดยพบว่ากลุ่มที่เสริมด้วยเซลล์ของ *C. butyricum* มีความต้านทานต่อ YHV สูงขึ้นหลังหยุดการเสริมเป็นเวลา 7 วัน (RPS เท่ากับ 53.85%) และมี% phagocytosis สูงขึ้นด้วย โดยไม่พบหลังหยุดการเสริมเป็นเวลา 14 วัน ส่วนกลุ่มที่เสริมด้วยสารผสมยังคงมีความต้านทานต่อ YHV อยู่ 7 วันหลังหยุดการเสริม และพบว่ากลุ่มที่เสริมด้วยสารกระตุ้น IE-04 มีความต้านทานต่อ YHV สูงขึ้นหลังหยุดการเสริม 7-14 วัน (RPR เท่ากับ 38.46 และ 27.32% ตามลำดับ) จากผลการทดลองแสดงว่าไม่มีความสัมพันธ์ของความต้านทานการติดเชื้อ *V. harveyi* กับระดับ bactericidin ส่วน % phagocytosis ที่เพิ่มขึ้นนั้นอาจสัมพันธ์กับความต้านทานการติดเชื้อ YHV ได้ และการผสมระหว่างเซลล์ของ *C. butyricum* กับสารกระตุ้น IE-04 ไม่มีส่วนช่วยในการเพิ่มความต้านทานต่อ YHV แต่มีผลต่อการเพิ่มความต้านทานต่อ *V. harveyi* อาจเนื่องมาจากสารกระตุ้น IE-04 นั้นเตรียมจาก *C. butyricum* ต่างสายพันธุ์ จึงอาจมีส่วนประกอบที่แตกต่างและมีผลต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำต่างไปจากเดิมเมื่อนำมาผสมกัน จากการทดสอบนี้พบว่าการใช้เซลล์ของ *C. butyricum* เสริมในอาหารเป็นเวลา 7 วัน เพื่อช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำจะให้ผลต่อการเหนี่ยวนำด้วย YHV ดีกว่าการใช้สารจากผลิตภัณฑ์ทางการค้า IE-04 ซึ่งแตกต่างจากผลการทดสอบที่ผ่านมา (ข้อ 5.4) ที่พบว่าการเสริมด้วยสารกระตุ้น IE-04 ความเข้มข้น 100 ppm เป็นเวลา 30 วัน จะให้ผลดีกว่าการเสริมด้วยเซลล์ของ *C. butyricum* ความเข้มข้นและระยะเวลาเท่ากัน อาจเนื่องมาจากระยะเวลาที่ให้การเสริมสารกระตุ้นในการทดสอบนี้เป็นระยะสั้น ดังนั้นสารกระตุ้น IE-04 จะมีผลต่อการเสริมภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำเมื่อใการเสริมเป็นระยะเวลานาน (30-60 วัน) ส่วนการเสริมด้วยเซลล์ของ *C. butyricum* จะมีผลต่อการเสริมภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำเมื่อให้ในระยะสั้นเป็นระยะเวลา 7 วัน และพบว่ายังคงมีผลต่อการเพิ่มภูมิคุ้มกันต้านาน 7 วันหลังหยุดการเสริม ดังนั้นอาจทำการเสริมด้วยเซลล์ของ *C. butyricum* เป็นเวลา 7 วัน และ หยุดการเสริมเป็นเวลา 7 วัน ตลอดการเลี้ยง และต่อไปควรมีการศึกษาถึงองค์ประกอบของส่วนประกอบของผนังเซลล์ รวมทั้งทดสอบการกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยเซลล์และโดยสารน้ำชนิดอื่น เพื่อนำผลที่ได้มาเป็นแนวทางในการเสริมภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำต่อไป