

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การหาภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของ *Bacillus subtilis* P11 (BSP11)

4.1.1 ความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *B. subtilis* P11

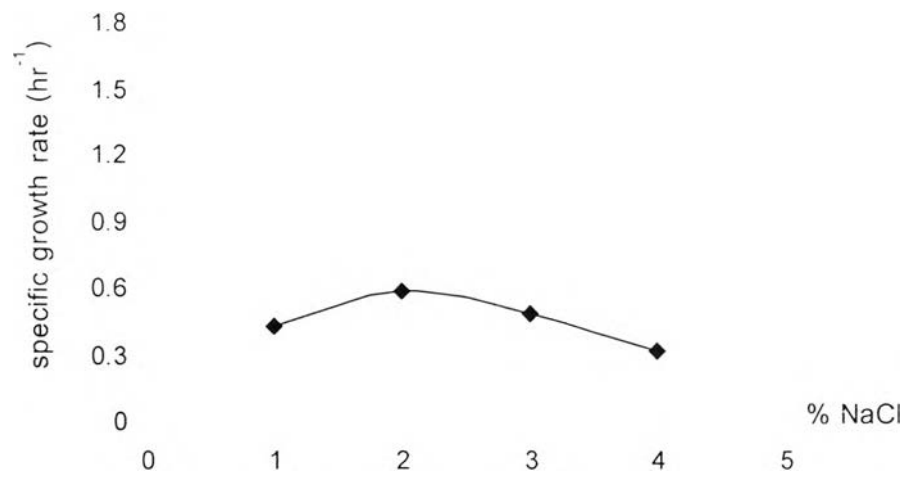
เมื่อถ่าย *B. subtilis* P11 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีเปอร์เซ็นต์เกลือ NaCl ต่างๆ กัน ณ อุณหภูมิห้อง และ pH 7 ผลจากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD 660 กับเวลา ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มี % เกลือ NaCl 1%, 2%, 3% และ 4% พบว่า *B. subtilis* P11 มีค่า specific growth rate (μ) เท่ากับ 0.430, 0.588, 0.489, 0.327 hr^{-1} ตามลำดับ (ภาคผนวก ข รูปที่ 24-27) และจากความสัมพันธ์ระหว่าง ค่า specific growth rate กับ %NaCl ต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB (รูปที่ 4) สามารถสรุปได้ว่า ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *B. subtilis* P11 มากที่สุดคือ 2% NaCl

4.1.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *B. subtilis* P11

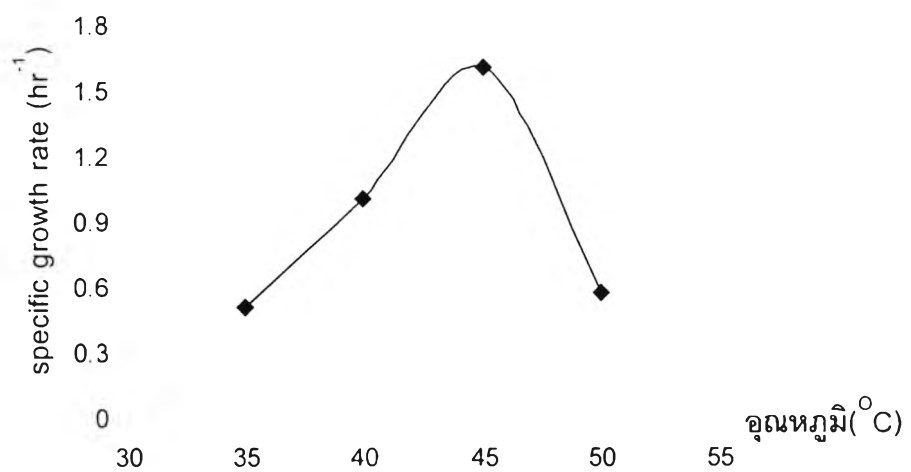
เมื่อถ่าย *B. subtilis* P11 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB และนำไปบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ กัน ณ pH 7 ผลจากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD 660 กับเวลา ที่อุณหภูมิ, 35, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส พบว่า *B. subtilis* P11 มีค่า specific growth rate (hr^{-1}) เท่ากับ 0.520, 1.016, 1.612, 0.580 hr^{-1} ตามลำดับ (รูปที่ 28-31) และจากความสัมพันธ์ระหว่าง ค่า specific growth rate (μ) กับ อุณหภูมิ (รูปที่ 5) สามารถสรุปได้ว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *B. subtilis* P11 มากที่สุดคือ 45 องศาเซลเซียส

4.1.3 ค่าพีเอช (pH) ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *B. subtilis* P11

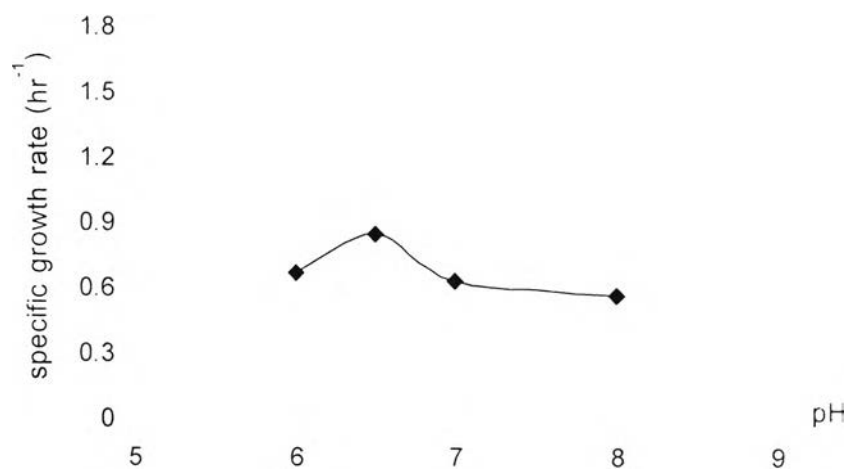
เมื่อถ่าย *B. subtilis* P11 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB และนำไปบ่มที่ค่า pH ต่างๆ กัน ณ อุณหภูมิห้อง ผลจากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD 660 กับเวลา ที่ค่า pH 6, 6.5, 7 และ 8 พบว่า *B. subtilis* P11 มีค่า specific growth rate (μ) เท่ากับ 0.671, 0.854, 0.638, 0.572 hr^{-1} ตามลำดับ (รูปที่ 32-35) และจากความสัมพันธ์ระหว่าง ค่า specific growth rate กับ ค่า pH (รูปที่ 6) สามารถสรุปได้ว่า ค่า pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *B. subtilis* P11 มากที่สุดคือ 6.5



รูปที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่าง specific growth rate ของ *B. subtilis* P11 กับอาหาร TSB ที่ % NaCl ต่างๆ



รูปที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่าง specific growth rate ของ *B. subtilis* P11 ที่อุณหภูมิต่างๆ



รูปที่ 6 ความสัมพันธ์ระหว่าง specific growth rate ของ *B. subtilis* P11 ที่ค่า pH ต่างๆ



4.2 การเลี้ยงกุ้งกุลาดำครั้งที่ 1

4.2.1 เปรียบเทียบผลของโพรไบโอติกต่อการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ

การเลี้ยงกุ้งกุลาดำเป็นระยะเวลา 120 วัน แบ่งการทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม (กลุ่มละ 10 กระชัง) คือ

กลุ่มควบคุม ให้อาหารกุ้งสำเร็จรูป โดยไม่ผสม *B. subtilis* P11 ทุกวัน วันละ 3 มื้อ

กลุ่มโพรไบโอติก ให้อาหารกุ้งกุลาดำสำเร็จรูปผสม *B. subtilis* P11 ทุกวัน วันละ 3 มื้อ

เลี้ยงกุ้งกุลาดำระยะ โพลลว้า 30 (PL30) ในกระชังพื้นที่ 2.25 ตร.ม. จำนวน 150 ตัวต่อกระชัง ในบ่อดินขนาดประมาณ 1000 ตร.ม. ติดตามผลการเติบโตของกุ้งกุลาดำ พบว่าอัตราเฉลี่ยของการเจริญเติบโตของกุ้งทั้ง 2 กลุ่มทดลอง (รูปที่ 7) แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยที่คุณภาพน้ำในบ่ออยู่ในช่วงเกณฑ์ปกติที่ปลอดภัยสำหรับการเลี้ยงกุ้ง (ตารางที่ 3)

ผลการติดตามปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด และ *Vibrio spp.* ในน้ำเลี้ยงกุ้ง (ตารางที่ 4) ดินตะกอนในบ่อเลี้ยงกุ้ง (ตารางที่ 5) และลำไส้กุ้งจากทั้ง 2 กลุ่มการทดลอง (ตารางที่ 6) พบว่าในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำตรวจพบแบคทีเรียทั้งหมดในช่วง $1.6 \times 10^3 - 8.3 \times 10^3$ CFU/ml และ *Vibrio spp.* อยู่ในช่วง $4.3 \times 10^2 - 8.56 \times 10^2$ CFU/ml (ตารางที่ 4) ดินตะกอนจากบ่อเลี้ยงกุ้งมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง $5.9 \times 10^4 - 5.76 \times 10^7$ CFU/g และ *Vibrio spp.* อยู่ในช่วง $5.0 \times 10^2 - 1.44 \times 10^4$ CFU/g (ตารางที่ 5) ลำไส้กุ้งกลุ่มควบคุมปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่ตรวจพบอยู่ในช่วง $1.01 \times 10^7 - 3.0 \times 10^7$ CFU/ml และ *Vibrio spp.* อยู่ในช่วง $2.3 \times 10^3 - 7.54 \times 10^3$ CFU/ml ส่วนลำไส้กุ้งกลุ่มโพรไบโอติกพบปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง $2.19 \times 10^7 - 4.85 \times 10^8$ CFU/ml ปริมาณ *B. subtilis* P11 อยู่ในช่วง $6.82 \times 10^6 - 8.37 \times 10^7$ CFU/ml และ *Vibrio spp.* อยู่ในช่วง $3.0 \times 10^3 - 5.38 \times 10^4$ CFU/ml (ตารางที่ 6)

หลังจากเลี้ยงกุ้งเป็นเวลา 120 วัน พบว่าการรอดชีวิตของกุ้งในแต่ละกลุ่มไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยกลุ่มควบคุมมีอัตราการรอดชีวิตประมาณ 48.13% ส่วนกลุ่มโพรไบโอติกมีอัตราการรอดชีวิตประมาณ 51.93% ตามลำดับ (รูปที่ 8)

ตารางที่ 3. คุณภาพน้ำระหว่างการเพาะเลี้ยงกุ้งในการทดลองครั้งที่ 1

คุณภาพน้ำ	ช่วงคุณภาพน้ำ (ต่ำสุด-สูงสุด)	
	กระชังกลุ่มควบคุม	กระชังกลุ่มโพรไบโอติก
แอมโมเนีย (mg/l)	< 0.1	< 0.1
ไนไตรท์ (mg/l)	0.1 - 0.3	0.1 - 0.3
ฟอสเฟต(mg/l)	0.1 - 0.25	0.1 - 0.25
อัลคาไลน์นิตี (m/l)	102 - 220	102 - 220
อุณหภูมิ(°C)	31.3 - 35.6	31.5 - 36.1
พีเอช (pH)	7.27 - 8.18	7.26 - 8.17
ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ(mg/l)	5.5 - 10.2	7.8 - 9.7
ความเค็ม(ppt)	9.6 - 11.6	9.3 - 11.7

ตารางที่ 4. ปริมาณแบคทีเรีย (Log CFU/ml) ในน้ำระหว่างการเพาะเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 1

ชนิดแบคทีเรีย	ปริมาณแบคทีเรีย (ต่ำสุด-สูงสุด)	
	กระชังกุ้งกลุ่มควบคุม	กระชังกุ้งกลุ่มโพรไบโอติก
ปริมาณแบคทีเรียรวม	2.3 - 3.92	2.3 - 3.92
<i>Vibrio</i> spp.	ND - 2.93	ND - 2.93

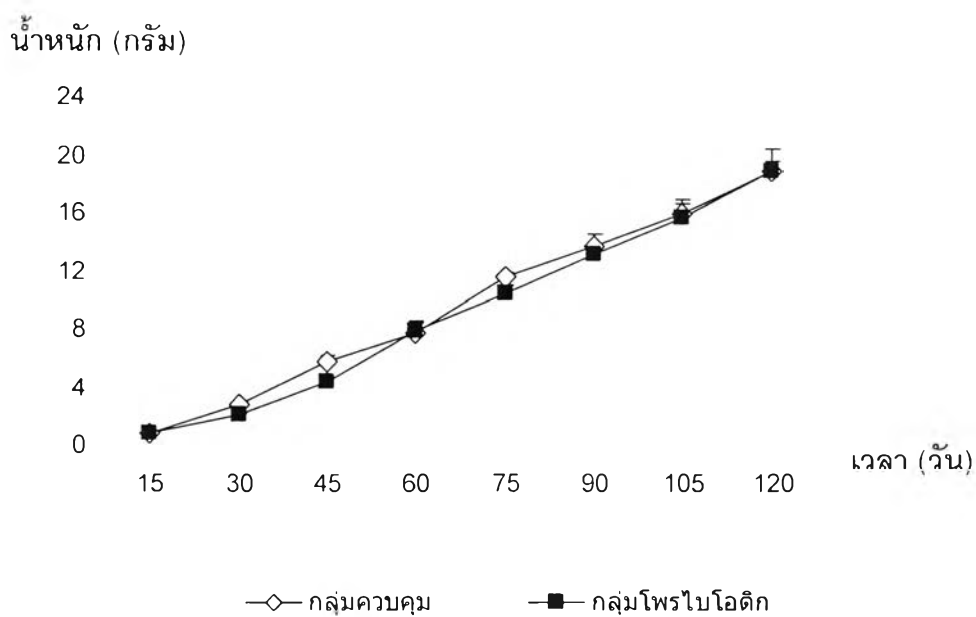
หมายเหตุ : ND หมายถึงตรวจไม่พบ

ตารางที่ 5. ปริมาณแบคทีเรีย (Log CFU/ml) ในตะกอนดินระหว่างการเพาะเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 1

ชนิดแบคทีเรีย	ปริมาณแบคทีเรีย (ต่ำสุด-สูงสุด)	
	กระชังกุ้งกลุ่มควบคุม	กระชังกุ้งกลุ่มโพรไบโอติก
ปริมาณแบคทีเรียรวม	4.42 - 6.88	4.62 - 6.76
<i>Vibrio</i> spp.	3.50 - 3.81	3.06 - 3.86

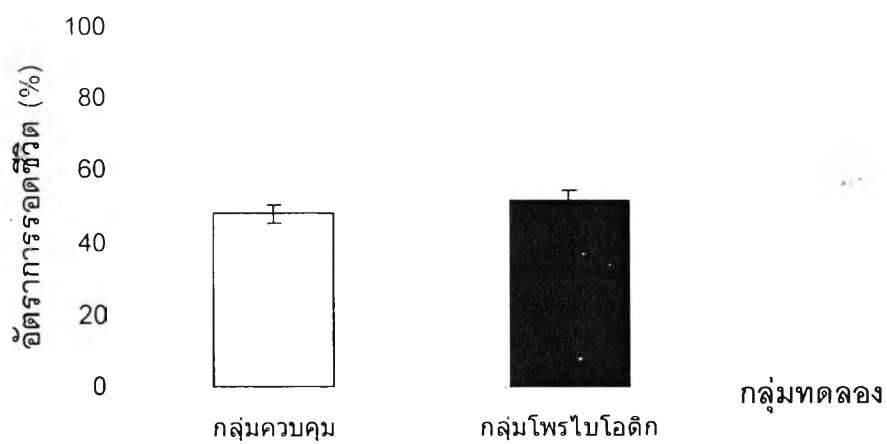
ตารางที่ 6. ปริมาณแบคทีเรีย (Log CFU/ml) ในลำไส้กุ้งระหว่างการเพาะเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 1

ชนิดแบคทีเรีย	ปริมาณแบคทีเรีย (ต่ำสุด-สูงสุด)	
	กุ้งกลุ่มควบคุม	กุ้งกลุ่มโพรไบโอติก
ปริมาณแบคทีเรียรวม	7 – 7.48	7.34 – 8.68
BSP 11	-	6.83 – 7.92
<i>Vibrio</i> spp.	3.36 – 3.88	3.48 – 4.73



หมายเหตุ: |-----| ค่าความแปรปรวนของกลุ่มประชากร (SD)

รูปที่ 7 น้ำหนักตัวของกิ้งกูด้า กลุ่มควบคุมและกลุ่มโพรไบโอติก ระหว่างการทดลองครั้งที่ 1



หมายเหตุ: |-----| ค่าความแปรปรวนของกลุ่มประชากร (SD)

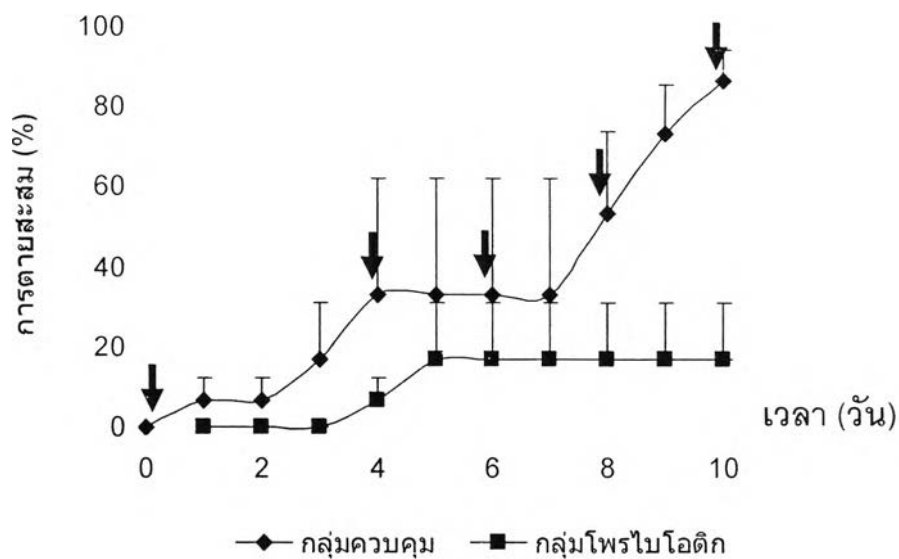
รูปที่ 8 การรอดชีวิตของกิ้งกูด้าเมื่อสิ้นสุดการทดลอง 120 วัน ของกลุ่มควบคุมและกลุ่มโพรไบโอติก ของการทดลองครั้งที่ 1

4.2.2 การทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค

รวบรวมกุ้งที่เหลือจากการเพาะเลี้ยง 120 วัน ในแต่ละกลุ่มทดลองมาทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค โดยใช้ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 เป็นเชื้อก่อโรค และใช้กุ้งในแต่ละกลุ่มทดลองที่มีขนาดและน้ำหนักใกล้เคียงกันมาทดสอบ โดยการแช่กุ้งในแต่ละกลุ่ม กลุ่มละ 30 ตัว ในน้ำที่มี *Vibrio harveyi* 639 ความเข้มข้น 10^7 CFU/ml พบว่ากุ้งกลุ่มที่ให้อาหารผสมโปรไบโอติกมีการตายสะสมน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ในวันที่ 10 (รูปที่ 9) โดยกุ้งกลุ่มควบคุมมีอัตราการตายสะสม 86.67% ส่วนกุ้งกลุ่มให้อาหารผสมโปรไบโอติกมีอัตราการตายสะสม 16.67 % ตามลำดับ

ติดตามจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (รูปที่ 10) ระหว่างการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 เป็นเวลา 10 วัน พบว่าน้ำเลี้ยงกุ้งในแต่ละแต่ละกลุ่มการทดลองมีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด 1.10×10^8 - 4.18×10^9 CFU/ml และ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 5.18×10^3 - 1.10×10^7 CFU/ml ตามลำดับ

ติดตามจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด *B. subtilis* P11 และ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 ในลำไส้กุ้งกุลาดำ (รูปที่ 11) ระหว่างการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 พบว่าลำไส้กุ้งกลุ่มควบคุมมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด 9.57×10^7 CFU/ml และ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 4.36×10^6 CFU/ml โดยตรวจไม่พบ *B. subtilis* P11 ส่วนกุ้งกลุ่มให้อาหารผสมโปรไบโอติกมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด 3.23×10^8 CFU/ml *B. subtilis* P11 2.07×10^7 CFU/ml และ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 8.40×10^6 CFU/ml ตามลำดับ

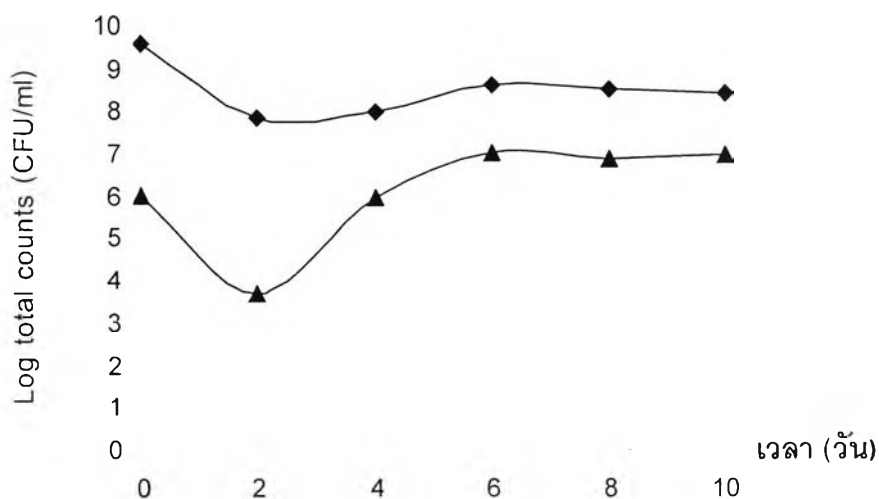


หมายเหตุ : |-----| ค่าความแปรปรวนของกลุ่มประชากร (SD)

→ วันที่เติมเชื้อ *V. harveyi* 639 ลงในน้ำ

รูปที่ 9 การตายสะสมของกุ้งกุลาดำ จากการทดลองครั้งที่ 1 หลังการชักนำให้เกิดโรคด้วย

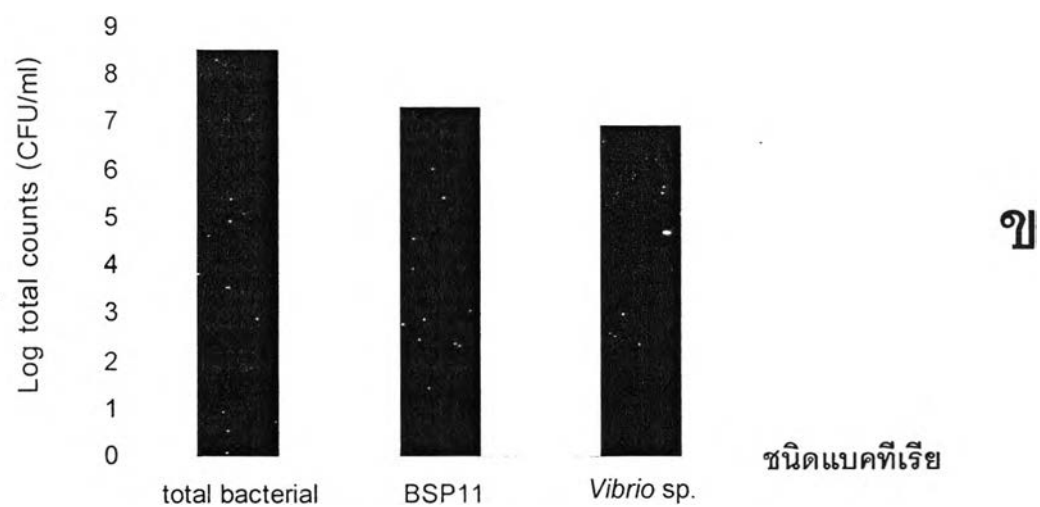
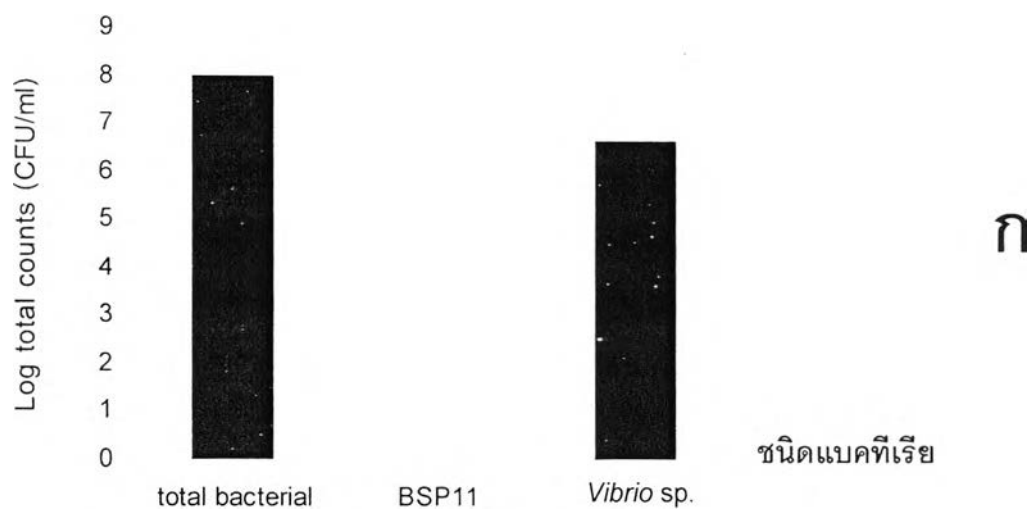
Vibrio harveyi 639



รูปที่ 10 ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด (-◆-) และ *Vibrio* spp. (-▲-) ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำหลังจาก

ชักนำให้เกิดโรคเป็นเวลา 10 วันจากการทดลองครั้งที่ 1

แต่ละจุดเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ



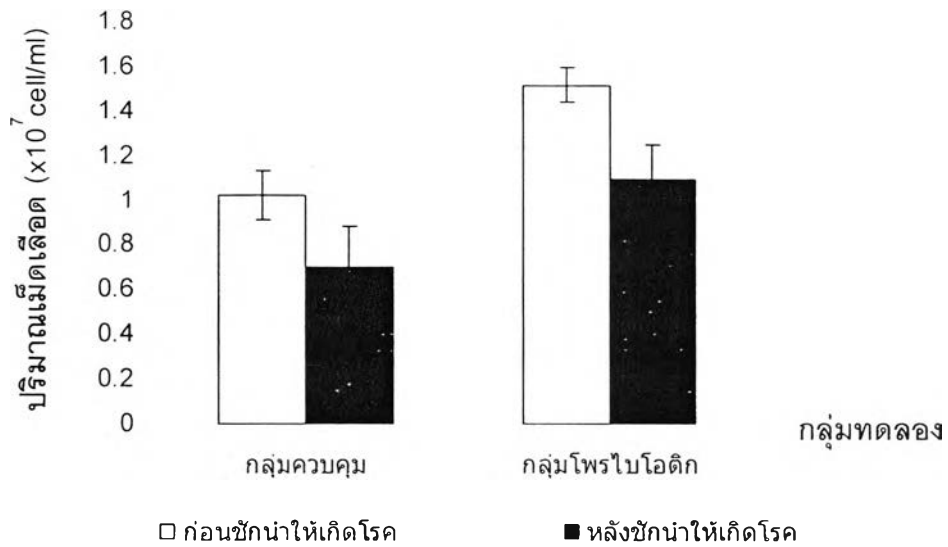
กลุ่มควบคุม (ก) กลุ่มโพรไบโอติก (ข)

รูปที่ 11 ปริมาณแบคทีเรียในลำไส้กุลาหลังจากชักนำให้เกิดโรค เป็นเวลา 2 วันจากการทดลองครั้งที่ 1

4.2.3 การตรวจสอบปัจจัยทางภูมิคุ้มกัน

จากการทดลองเปรียบเทียบความสามารถในการสร้างภูมิคุ้มกันที่ป้องกันถึงแปลกปลอม โดยเซลล์ โดยเปรียบเทียบจากปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งแต่ละกลุ่มทดลอง หลังการเลี้ยงกุ้งอายุ 120 วัน และหลังจากการชักนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* 639 เป็นเวลา 2 วัน เมื่อกุ้งอายุ 120 วัน จากการทดลองปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งในแต่ละกลุ่มทดลองไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยกลุ่มควบคุมมีปริมาณเม็ดเลือดรวม $\sim 1.02 \times 10^7$ cell/ml และหลังการชักนำให้เกิดโรคลดลงเหลือ $\sim 6.99 \times 10^6$ cell/ml ส่วนกลุ่มโพรไบโอติกมีปริมาณเม็ดเลือดรวม $\sim 1.52 \times 10^7$ cell/ml และหลังการชักนำให้เกิดโรคลดลงเหลือ $\sim 1.10 \times 10^7$ cell/ml (รูปที่ 12)

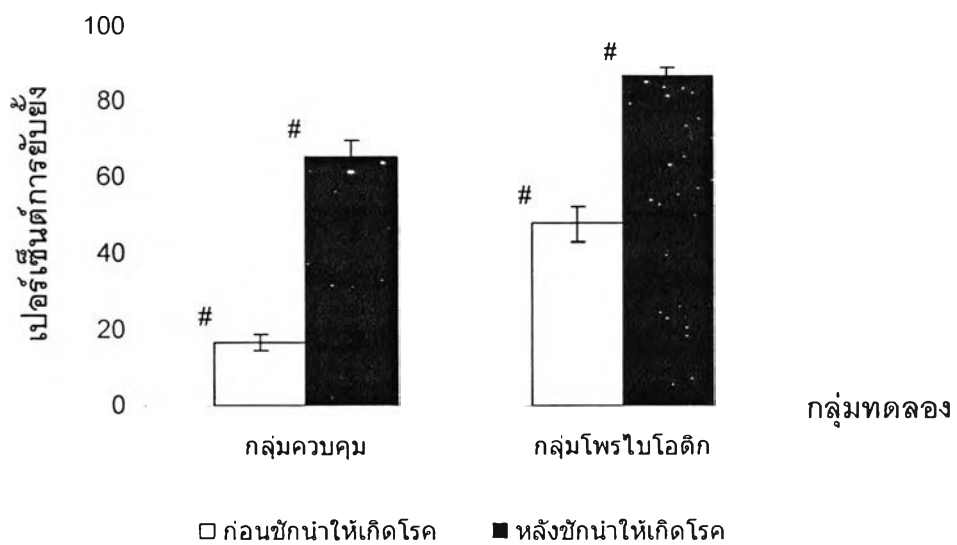
จากการทดลองเปรียบเทียบความสามารถในการสร้างภูมิคุ้มกันที่ป้องกันถึงแปลกปลอม โดยสารน้ำ โดยเปรียบเทียบจากความสามารถในการต้านทานเชื้อก่อโรค จากการสร้างสารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในเลือดกุ้งก่อนและหลังการชักนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* 639 เมื่อกุ้งอายุ 120 วัน พบว่าก่อนและหลังการชักนำให้เกิดโรคกุ้งกลุ่มควบคุมสร้างสารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในเลือด 16.78 และ 65.30 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกุ้งกลุ่มโพรไบโอติกสร้างสารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในเลือด 47.91 และ 87.09 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (รูปที่ 13) ซึ่งมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



หมายเหตุ : |-----| ค่าความแปรปรวนของกลุ่มประชากร (SD)

รูปที่ 12 แสดงปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้ง ก่อนและหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย

Vibrio harveyi 639 ในการทดลองครั้งที่ 1 เมื่อกุ้งอายุ 120 วัน



หมายเหตุ : |-----| ค่าความแปรปรวนของกลุ่มประชากร (SD)

แสดงค่าความแตกต่างระหว่าง 2 กลุ่มทดลองในแต่ละช่วงเวลาอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

รูปที่ 13 ความสามารถในการต้านทานเชื้อก่อโรค จากการสร้างสารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในเลือดกุ้งก่อนและหลังการชักนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* 639 ในการทดลองครั้งที่ 1 เมื่อกุ้งอายุ 120 วัน

4.3 การเลี้ยงกุ้งกุลาดำครั้งที่ 2

4.3.1 เปรียบเทียบผลของโพรไบโอติกต่อการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ

ทำการเลี้ยงกุ้งกุลาดำเป็นระยะเวลา 80 วัน โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม (กลุ่มละ 5 กระชัง) คือ

กลุ่มควบคุม ให้อาหารกุ้งสำเร็จรูป โดยไม่ผสม *B. subtilis* P11 ทุกวัน วันละ 3 มื้อ

กลุ่มโพรไบโอติก ให้อาหารกุ้งกุลาดำสำเร็จรูปผสม *B. subtilis* P11 ทุกวัน วันละ 3 มื้อ

เลี้ยงกุ้งกุลาดำระยะ โพลลวรา 50 (PL50) ในกระชังพื้นที่ 1.5 ตร.ม. จำนวน 100 ตัวต่อกระชัง ในบ่อดินขนาดประมาณ 1000 ตร.ม. ติดตามผลการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ พบว่า อัตราเฉลี่ยของการเจริญเติบโตของกุ้งกลุ่มโพรไบโอติกมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) (รูปที่ 14) โดยที่คุณภาพน้ำในบ่ออยู่ในช่วงเกณฑ์ปกติที่ปลอดภัยสำหรับการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (ตารางที่ 7)

ผลการติดตามปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด และ *Vibrio spp.* ในน้ำเลี้ยงกุ้ง (ตารางที่ 8) ดินตะกอนในบ่อเลี้ยงกุ้ง (ตารางที่ 9) และลำไส้กุ้งจากทั้ง 2 กลุ่มการทดลอง (ตารางที่ 10) พบว่าในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำตรวจพบแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง $1.36 \times 10^3 - 4.49 \times 10^3$ CFU/ml และ *Vibrio spp.* อยู่ในช่วง $2.29 \times 10^2 - 7.34 \times 10^2$ CFU/ml (ตารางที่ 8) ดินตะกอนจากบ่อเลี้ยงกุ้งมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง $8.33 \times 10^3 - 9.23 \times 10^5$ CFU/g และ *Vibrio spp.* อยู่ในช่วง $1.47 \times 10^2 - 9.81 \times 10^2$ CFU/g (ตารางที่ 9) ลำไส้กุ้งกลุ่มควบคุมปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่ตรวจพบอยู่ในช่วง $4.49 \times 10^6 - 3.05 \times 10^7$ CFU/ml ปริมาณ *B. subtilis* P11 อยู่ในช่วง $5.81 \times 10^3 - 6.97 \times 10^5$ CFU/ml และ *Vibrio spp.* อยู่ในช่วง $5 \times 10^2 - 8.47 \times 10^3$ CFU/ml ส่วนลำไส้กุ้งกลุ่มโพรไบโอติกพบปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง $3.09 \times 10^6 - 5.73 \times 10^7$ CFU/ml ปริมาณ *B. subtilis* P11 อยู่ในช่วง $2.70 \times 10^6 - 4.39 \times 10^7$ CFU/ml และ *Vibrio spp.* อยู่ในช่วง $4.99 \times 10^2 - 4.58 \times 10^4$ CFU/ml (ตารางที่ 10)

หลังจากเลี้ยงกุ้งเป็นเวลา 80 วัน พบว่าการรอดชีวิตของกุ้งในแต่ละกลุ่มไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยกลุ่มควบคุมมีอัตราการรอดชีวิตประมาณ 72.80% ส่วนกลุ่มโพรไบโอติกมีอัตราการรอดชีวิตประมาณ 73.00% ตามลำดับ (รูปที่ 15)

ตารางที่ 7. คุณภาพน้ำระหว่างการเพาะเลี้ยงกึ่งในการทดลองครั้งที่ 2

คุณภาพน้ำ	ช่วงคุณภาพน้ำ (ต่ำสุด-สูงสุด)	
	กระชังกลุ่มควบคุม	กระชังกลุ่มโพรไบโอติก
แอมโมเนีย (mg/l)	0	0
ไนโตรท์ (mg/l)	0.1	0.1
ฟอสเฟต(mg/l)	0.25 – 1	0.25 – 1
อัลคาไลน์นิตี (m/l)	119 - 136	119 - 136
อุณหภูมิ(°C)	28.4 – 31.4	28.4 – 31.4
พีเอช (pH)	7.65 - 8.43	7.65 - 8.43
ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ(mg/l)	6.1 – 7.7	6.1 – 7.7
ความเค็ม(ppt)	6.1 – 7.2	6.1 – 7.2

ตารางที่ 8. ปริมาณแบคทีเรีย (LogCFU/ml) น้ำระหว่างการเพาะเลี้ยงกึ่งในการทดลองครั้งที่ 2

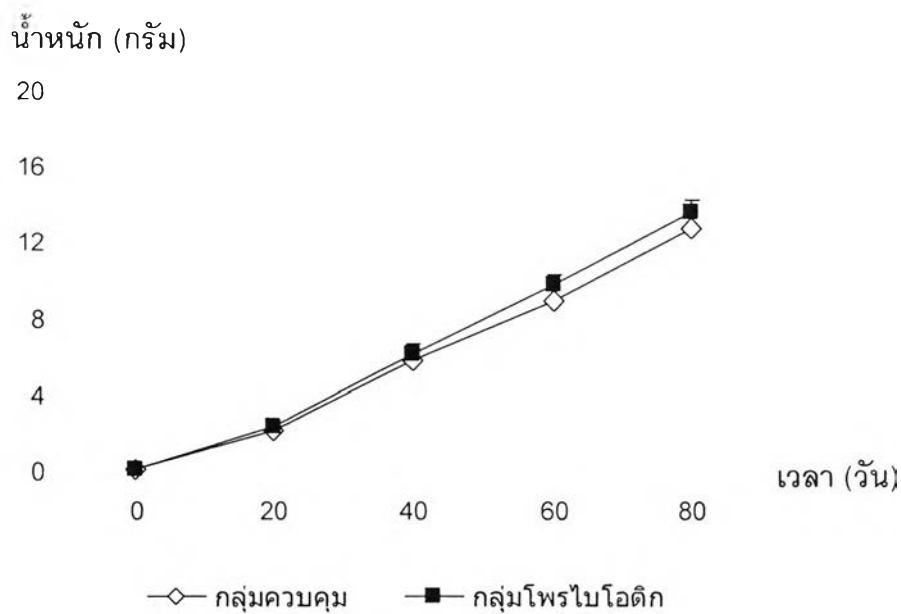
ชนิดแบคทีเรีย	ปริมาณแบคทีเรีย (ต่ำสุด-สูงสุด)	
	กระชังกึ่งกลุ่มควบคุม	กระชังกึ่งกลุ่มโพรไบโอติก
ปริมาณแบคทีเรียรวม	3.13 – 3.65	3.13 – 3.65
BSP 11	2.64 – 3.29	2.64 – 3.29
<i>Vibrio</i> spp.	2.36 – 2.86	2.36 – 2.86

ตารางที่ 9. ปริมาณแบคทีเรีย (LogCFU/ml) ในตะกอนดินระหว่างการเพาะเลี้ยงกึ่งในการทดลองครั้งที่ 2

ชนิดแบคทีเรีย	ปริมาณแบคทีเรีย (ต่ำสุด-สูงสุด)	
	กระชังกึ่งกลุ่มควบคุม	กระชังกึ่งกลุ่มโพรไบโอติก
ปริมาณแบคทีเรียรวม	3.92 – 5.96	3.92 – 5.96
BSP 11	3.13 – 5.49	3.13 – 5.49
<i>Vibrio</i> spp.	2.17 – 2.99	2.17 – 2.99

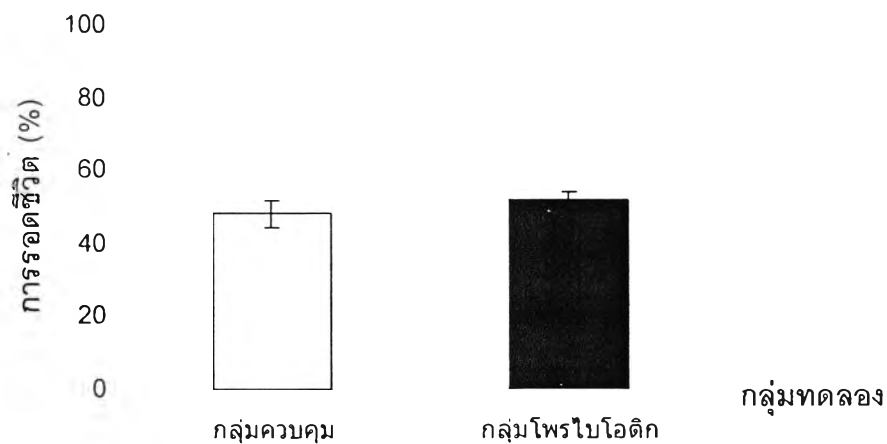
ตารางที่ 10. ปริมาณแบคทีเรีย (LogCFU/ml) ในลำไส้กุ้งระหว่างการเพาะเลี้ยงกุ้งในการทดลองครั้งที่ 2

ชนิดแบคทีเรีย	ปริมาณแบคทีเรีย (ต่ำสุด-สูงสุด)	
	กุ้งกลุ่มควบคุม	กุ้งกลุ่มโพรไบโอติก
ปริมาณแบคทีเรียรวม	6.65 – 7.48	6.49 – 7.76
BSP 11	3.76 – 5.84	6.43 – 7.64
<i>Vibrio</i> spp.	2.70 – 3.93	2.70 – 4.66



หมายเหตุ : |-----| ค่าความแปรปรวนของกลุ่มประชากร (SD)

รูปที่ 14 น้ำหนักตัวของกิ้งกูดดำ กลุ่มควบคุมและกลุ่มโพรไบโอติก ระหว่างการทดลองครั้งที่ 2



หมายเหตุ : |-----| ค่าความแปรปรวนของกลุ่มประชากร (SD)

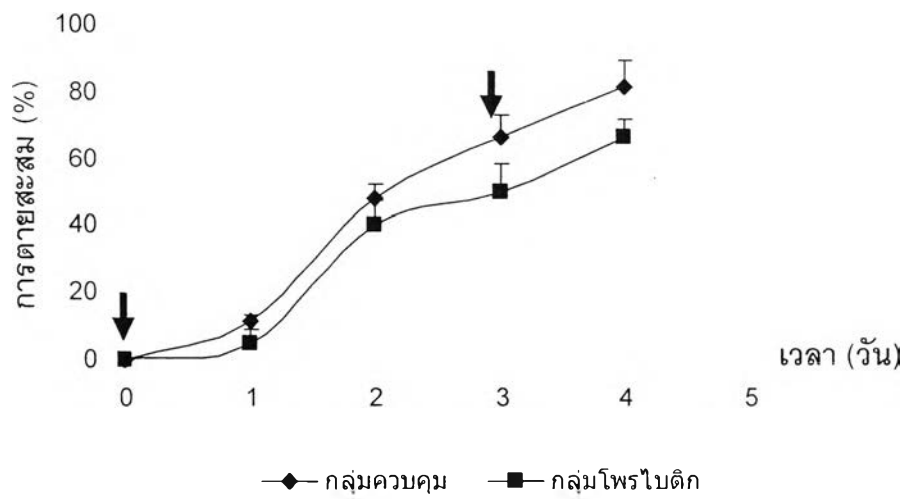
รูปที่ 15 การรอดชีวิตของกิ้งกูดดำ กลุ่มควบคุมและกลุ่มโพรไบโอติก ระหว่างการทดลองครั้งที่ 2

4.3.2 การทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค

รวบรวมกุ้งที่เหลือจากการเพาะเลี้ยง 80 วัน ในแต่ละกลุ่มทดลองมาทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค โดยใช้ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 เป็นเชื้อก่อโรค และใช้กุ้งในแต่ละกลุ่มทดลองที่มีขนาดและน้ำหนักใกล้เคียงกันมาทดสอบ โดยการแช่กุ้งในแต่ละกลุ่ม กลุ่มละ 60 ตัว ในน้ำที่มี *Vibrio harveyi* 639 ความเข้มข้น 10^7 CFU/ml พบว่ากุ้งกลุ่มที่ให้อาหารผสมโปรไบโอติกควบคุมมีการตายสะสมน้อยกว่ากลุ่มควบคุม (รูปที่ 16) โดยกุ้งกลุ่มควบคุมมีอัตราการตายสะสม 81.67% ส่วนกุ้งกลุ่มให้อาหารผสมโปรไบโอติกมีอัตราการตายสะสม 66.67 % ตามลำดับ

ติดตามจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (รูปที่ 17) ระหว่างการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 เป็นเวลา 4 วัน พบว่าน้ำเลี้ยงกุ้งในกลุ่มการทดลองมีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด 1.35×10^5 - 1.09×10^8 CFU/ml และ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 3.4×10^3 - 2.05×10^7 CFU/ml ตามลำดับ โดยตรวจไม่พบ *B. subtilis* P11 ส่วนน้ำเลี้ยงกุ้งในกลุ่มโปรไบโอติกมีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด 2.95×10^5 - 9.45×10^7 CFU/ml ปริมาณ *B. subtilis* P11 อยู่ในช่วง 2.70×10^5 - 3.80×10^5 CFU/ml และ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 3.4×10^3 - 2.05×10^7 CFU/ml

ติดตามจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด *B. subtilis* P11 และ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 ในลำไส้กุ้งกุลาดำ (รูปที่ 18) ระหว่างการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 พบว่าลำไส้กุ้งกลุ่มควบคุมมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด 1.07×10^7 CFU/ml ปริมาณ *B. subtilis* P11 3.18×10^5 CFU/ml และ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 1.07×10^7 CFU/ml ส่วนกุ้งกลุ่มให้อาหารผสมโปรไบโอติกมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด 1.08×10^8 CFU/ml *B. subtilis* P11 1.28×10^7 CFU/ml และ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 1.03×10^7 CFU/ml ตามลำดับ

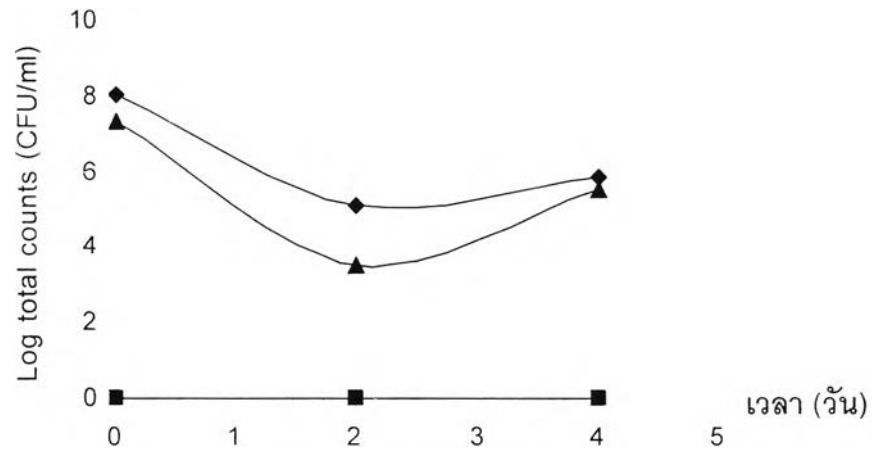


หมายเหตุ: |-----| ค่าความแปรปรวนของกลุ่มประชากร (SD)

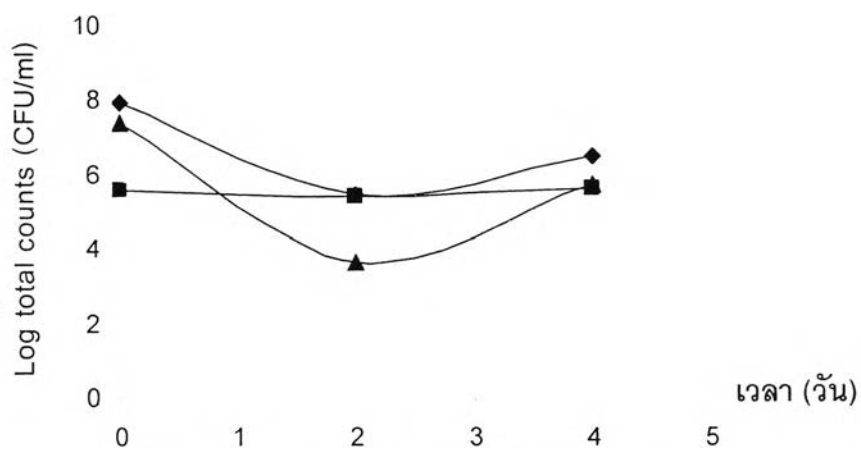
→ วันที่เติมเชื้อ *V. harveyi* 639 ลงในน้ำ

รูปที่ 16 การตายสะสมของกุ้งกุลาดำ จากการทดลองครั้งที่ 2 หลังการชักนำให้เกิดโรคด้วย

Vibrio harveyi 639



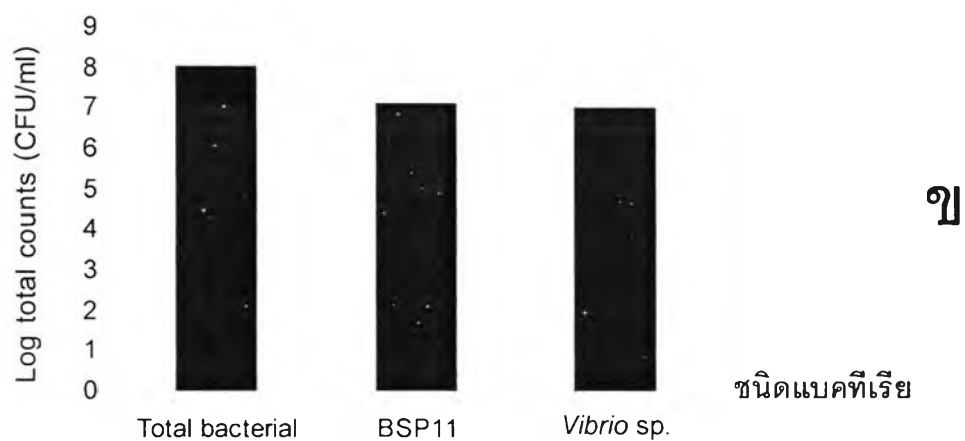
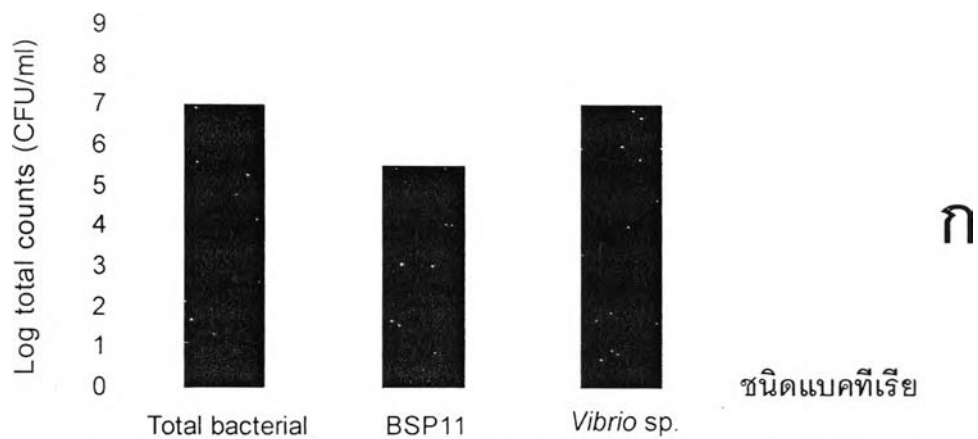
ก



ข

กลุ่มควบคุม (ก) กลุ่มโพรไบโอติก (ข)

รูปที่ 17 ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด (-◆-) *B. subtilis* P11 (-■-) และ *Vibrio* spp. (-▲-) ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำหลังจากชักนำให้เกิดโรคเป็นเวลา 4 วันจากการทดลองครั้งที่ 2 แต่ละจุดเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ



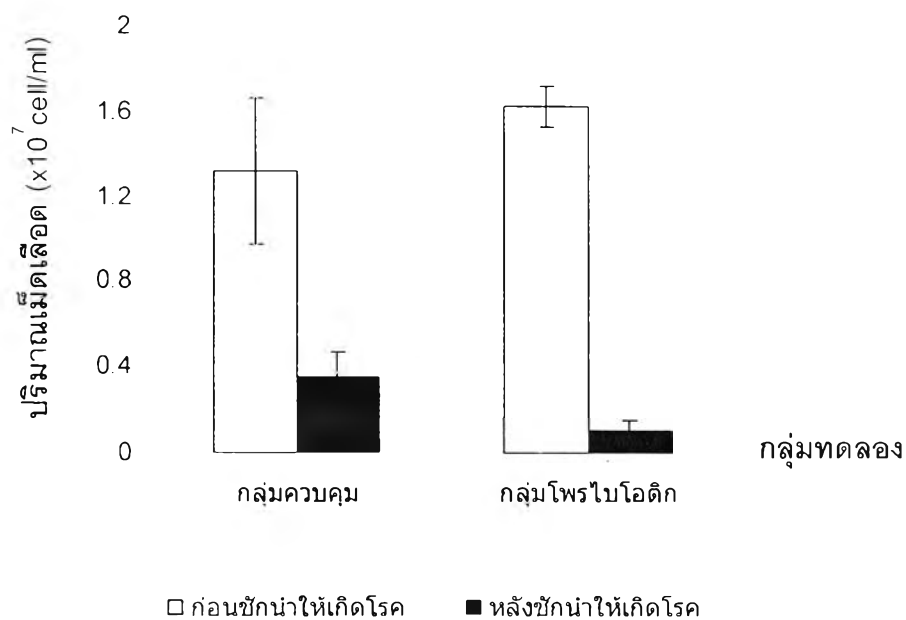
กลุ่มควบคุม (ก) กลุ่มโพรไบโอติก (ข)

รูปที่ 18 ปริมาณแบคทีเรียในลำไส้กุลาตำหลังจากชักนำให้เกิดโรค เป็นเวลา 2 วันจากการทดลองครั้งที่ 2

4.3.3 การตรวจสอบปัจจัยทางภูมิคุ้มกัน

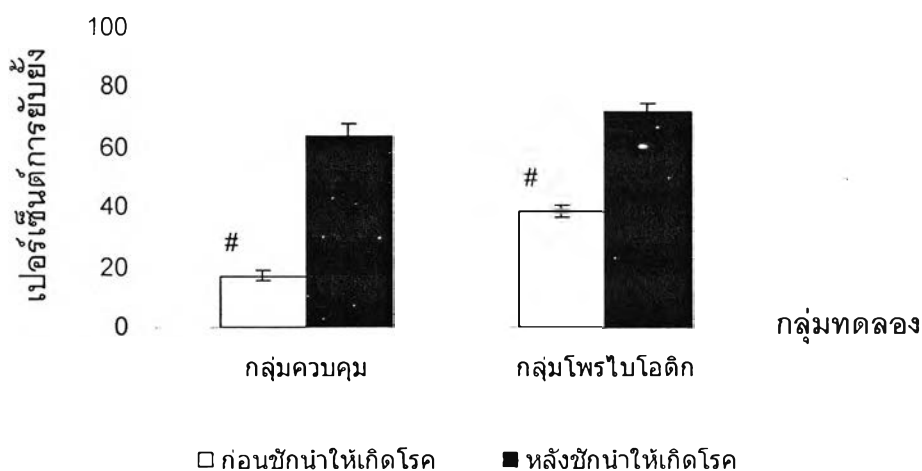
จากการทดลองเปรียบเทียบความสามารถในการสร้างภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอม โดยเซลล์ โดยเปรียบเทียบจากปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งแต่ละกลุ่มทดลอง หลังการเลี้ยงกุ้งอายุ 80 วัน และหลังจากการชักนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* 639 เป็นเวลา 2 วัน เมื่อกุ้งอายุ 80 วัน จากการทดลองปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งในแต่ละกลุ่มทดลองไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยกลุ่มควบคุมมีปริมาณเม็ดเลือดรวม $\sim 1.32 \times 10^7$ cell/ml และหลังการชักนำให้เกิดโรคลดลงเหลือ $\sim 3.5 \times 10^6$ cell/ml ส่วนกลุ่มโพรไบโอติกมีปริมาณเม็ดเลือดรวม $\sim 1.62 \times 10^7$ cell/ml และหลังการชักนำให้เกิดโรคลดลงเหลือ $\sim 1.07 \times 10^6$ cell/ml (รูปที่ 19)

จากการทดลองเปรียบเทียบความสามารถในการสร้างภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอม โดยสารน้ำ โดยเปรียบเทียบจากความสามารถในการต้านทานเชื้อก่อโรค จากการสร้างสารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในเลือดกุ้งก่อนและหลังการชักนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* 639 เมื่อกุ้งอายุ 80 วัน พบว่ากุ้งกลุ่มโพรไบโอติกสร้างสารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในเลือดมากกว่ากุ้งกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยก่อนและหลังการชักนำให้เกิดโรคกุ้งกลุ่มควบคุมสร้างสารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในเลือด 17.33 และ 63.67 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกุ้งกลุ่มโพรไบโอติกสร้างสารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในเลือด 38.97 และ 71.90 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (รูปที่ 20)



หมายเหตุ : |-----| ค่าความแปรปรวนของกลุ่มประชากร (SD)

รูปที่ 19 แสดงปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้ง ก่อนและหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* 639 ในการทดลองครั้งที่ 2 เมื่อกุ้งอายุ 100 วัน



หมายเหตุ : |-----| ค่าความแปรปรวนของกลุ่มประชากร (SD)

แสดงค่าความแตกต่างระหว่าง 2 กลุ่มทดลองในแต่ละช่วงเวลาอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

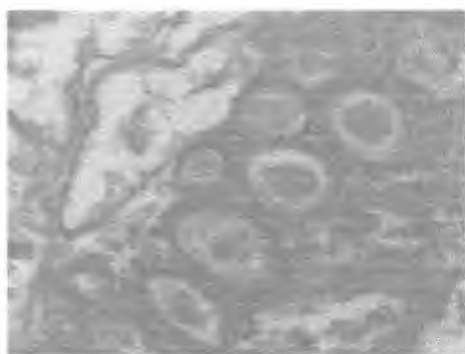
รูปที่ 20 ความสามารถในการต้านทานเชื้อก่อโรค จากการสร้างสารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในเลือดกุ้งก่อนและหลังการชักนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* 639 ในการทดลองครั้งที่ 2 เมื่อกุ้งอายุ 80 วัน

4.4 การตรวจพยาธิสภาพต่อการเกิดโรค หลังชักนำให้เกิดโรค ด้วย

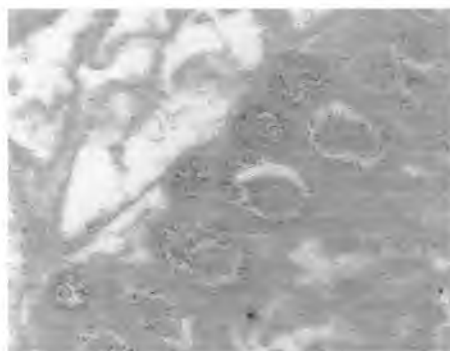
Immunohistochemistry

หลังจากทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อการเกิดโรคของกุ้งทุกกลุ่มทดลอง จากการทดลองทั้ง 2 ครั้ง จากการศึกษาพยาธิสภาพของการเกิดโรคจาก *V. harveyi* 639 ภายนอก สังเกตพบการเรียงแสงของกุ้งบริเวณหัวหลังการชักนำให้เกิดโรคในระยะเวลาที่กุ้งยังมีชีวิตอยู่

ตรวจสอพบพยาธิสภาพต่อการเกิดโรคของกุ้งโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี VH3-3H ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *V. harveyi* 639 จากการตรวจสอบพบการติดเชื้อทั้งบริเวณตับ อวัยวะสร้างเม็ดเลือด และหัวใจ ซึ่งสังเกตได้จากเนื้อเยื่อหลังผ่านการทดสอบมีลักษณะเป็นจุดสีน้ำตาลภายในเนื้อเยื่อ ซึ่งพบทุกกลุ่มการทดลองที่ชักนำให้เกิดโรค ดังแสดงรูปที่ 21-22



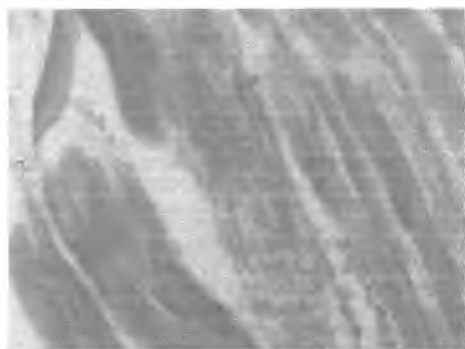
ก



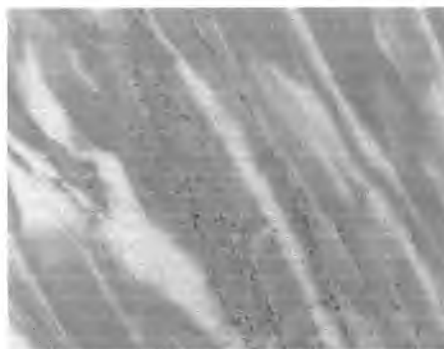
ข

หมายเหตุ : กำลังขยาย 1000 เท่า

รูปที่ 21 พยาธิสภาพต่อการเกิดโรคจากการติดเชื้อ *Vibrio harveyi* 639 บริเวณตับโดยสังเกตจากตำแหน่งติดสีน้ำตาลบริเวณที่เกิดการติดเชื้อ (ข) เปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อตำแหน่งเดียวกัน (ก) (ภาพ ก, ข ย้อมด้วยสีอิโอซิน)



ก



ข

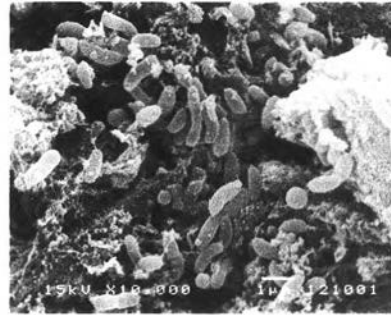
หมายเหตุ : กำลังขยาย 1000 เท่า

รูปที่ 22 พยาธิสภาพต่อการเกิดโรคจากการติดเชื้อ *Vibrio harveyi* 639 บริเวณกล้ามเนื้อโดยสังเกต จากตำแหน่งติดสีน้ำตาลบริเวณที่เกิดการติดเชื้อ (ข) เปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อตำแหน่งเดียวกัน (ก) (ภาพ ก, ข ย้อมด้วยสีอิโอซิน)

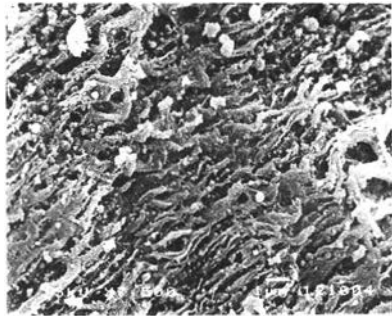
4.5 ผลการตรวจหา *B.subtilis* P11 ในทางเดินอาหารกุ้งกุลาดำหลังเลี้ยงครบ 120 วัน โดย กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope)



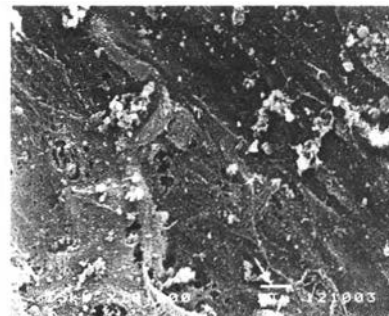
หมายเหตุ : กำลังขยาย 7,500 เท่า



หมายเหตุ : กำลังขยาย 10,000 เท่า



หมายเหตุ : กำลังขยาย 7,500 เท่า



หมายเหตุ : กำลังขยาย 10,000 เท่า

รูปที่ 23 แสดงเนื้อเยื่อลำไส้ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *B. subtilis* P11 เป็นเวลานาน 120 วัน โดยสังเกตเห็นเซลล์แบคทีเรียที่ยึดเกาะกับผนังลำไส้ (ก และ ข) เปรียบเทียบกับลำไส้ของกุ้งในกลุ่มควบคุมซึ่งไม่พบเซลล์แบคทีเรียที่ผนังลำไส้ (ค และ ง)