บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การทดสอบเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของผลิตภัณฑ์ IE-04 เพื่อใช้ในการทดสอบเปรียบเทียบกับเซลล์ของ *C. butyricum* ในกุ้งกุลาดำ

ผลการทดสอบหลังการเสริมด้วยสารกระตุ้น IE-04 ความเข้มข้น 100, 500, 1000 และ 5000 ppm ติดต่อกัน 7 วัน และหลังหยุดการเสริม เป็นเวลา 7 วัน

4.1.1 การทดสอบความต้านทานต่อการเกิดโรคติดเชื้อแบคทีเรีย

หลังการเหนี่ยวนำโดยการฉีดด้วย *V. parahaemolyticus* ความเข้มข้น 2.23×10^5 CFU/pc พบว่ากลุ่มควบคุมมีอัตรารอด 17.14 % ส่วนกลุ่มที่เสริมด้วยสารกระตุ้น IE-04 ความเข้มข้น 100, 500, 1000 และ 5000 ppm มีอัตรารอดเท่ากับ 33.75, 15.0, 22.5 และ 22.5% ตามลำดับ (รูปที่ 4) โดยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) กลุ่มความเข้มข้น 100 ppm มีค่า RPS (Relative Percent Survival) สูงสุด คือ 20.05% ส่วนกลุ่มอื่นๆ มีค่า RPS เท่ากับ -2.58 ถึง 6.47% (ตารางที่ 5) กลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) ที่ปราศจากเชื้อมีอัตรารอด 100%

ตัวอย่างกุ้งที่ตายหลังการเหนี่ยวนำเมื่อนำมาแยกเชื้อแบคทีเรียจากเลือดและดับลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TCBS และทดสอบทางชีวเคมี พบว่าเป็น *V. parahaemolyticus* (ตารางที่ 13)

4.1.2 การทดสอบความต้านทานต่อการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง (YHV)

หลังเหนี่ยวนำโดยการแช่ด้วยเชื้อ YHV ความเข้มข้น 1:10,000 (ปริมาตร/ปริมาตร) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ทุกกลุ่มการทดลองมีอัตราการตาย 100% ในวันที่ 5 ของการทดสอบ (รูปที่ 5) (กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อ YHV แต่แช่ใน LHM ความเข้มข้น 1: 10,000 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง มีอัตรารอด 100%) กุ้งทุกกลุ่มการทดลองเริ่มตายในวันที่ 3 ของการทดสอบ และมีอัตรารอดไม่แตกต่างกัน ($P<0.05$) โดยมีค่า RPS อยู่ในช่วง 0 ถึงติดลบ (ตารางที่ 5) เมื่อเก็บตัวอย่างกุ้งที่ตายหลังการเหนี่ยวนำมาตรวจสอบพบการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพที่แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง (รูปที่ 29)

4.1.3 การตรวจสอบระดับ bactericidin

หลังการเสริมด้วยสารกระตุ้น IE-04 ติดต่อกัน 7 วัน พบว่าทุกกลุ่มความเข้มข้นมีระดับ bactericidin สูงกว่ากลุ่มควบคุม คือ กลุ่มควบคุมมี bactericidin titer เท่ากับ 640 ส่วนกลุ่มที่ได้รับสารกระตุ้น IE-04 ความเข้มข้น 100 และ 5000 ppm มีไตเตอร์สูงกว่ากลุ่มควบคุม 4 เท่า (2560) ส่วนกลุ่มความเข้มข้น 500 และ 1000 ppm มีค่าไตเตอร์ เท่ากับ 1280 สูงกว่ากลุ่มควบคุม 2 เท่า (ตารางที่ 5)

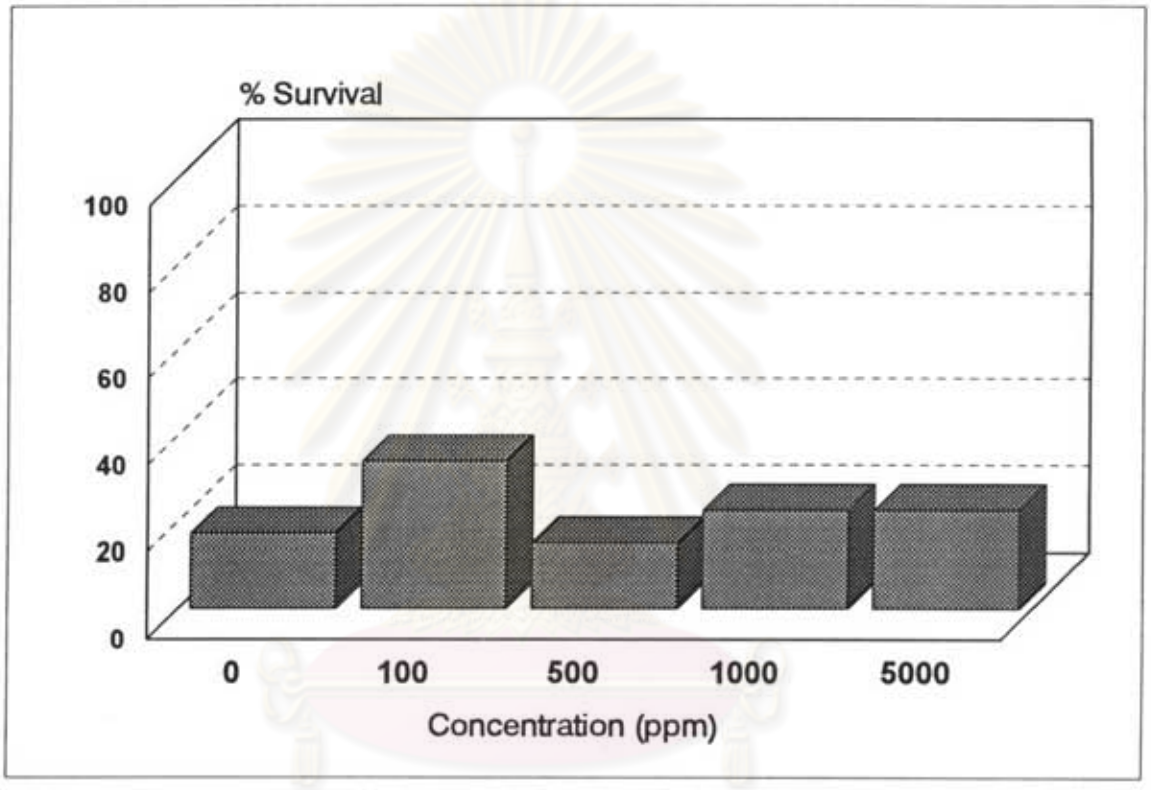
หลังหยุดการเสริมด้วยสารกระตุ้น IE-04 เป็นเวลา 7 วัน ระดับ bactericidin ของกลุ่มที่ได้รับสารกระตุ้น IE-04 ความเข้มข้น 100 ppm มีค่าสูงสุด และสูงกว่ากลุ่มควบคุม 8 เท่า คือ 5120 ส่วนในกลุ่มความเข้มข้น 5000 ppm มีระดับลดลง 2 เท่า คือ 1280 ส่วนกลุ่มความเข้มข้น 500 และ 1000 ppm มีระดับคงที่ คือ 1280 สูงกว่ากลุ่มควบคุม 2 เท่า (ตารางที่ 5)

4.1.4 การทดสอบหาค่า % phagocytosis และ phagocytic index

หลังการเสริมด้วยสารกระตุ้น IE-04 ความเข้มข้นต่างๆ ติดต่อกัน 7 วัน พบว่ากลุ่มควบคุมมีค่า % phagocytosis เท่ากับ 1.50 ± 0.83 ส่วนกลุ่มที่ได้รับสารกระตุ้น IE-04 ความเข้มข้น 100 และ 500 ppm มีค่า %phagocytosis สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (มีค่าเท่ากับ 6.22 ± 1.93 และ 6.26 ± 1.93 ตามลำดับ) ส่วนกลุ่มความเข้มข้น 1000 และ 5000 ppm ไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุม ($P<0.05$) และพบว่า phagocytic index ของกลุ่มที่ได้รับสารกระตุ้น IE-04 ความเข้มข้น 500 ppm มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุม ($P<0.05$) ส่วนกลุ่มความเข้มข้นอื่นๆ ไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุม ($P<0.05$) (ตารางที่ 5)

หลังหยุดให้สารกระตุ้น IE-04 เป็นเวลา 7 วัน กลุ่มที่ได้รับสารกระตุ้น IE-04 ความเข้มข้นต่างๆ มีค่า % phagocytosis และ phagocytic index ไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม ($P<0.05$) (ตารางที่ 5)

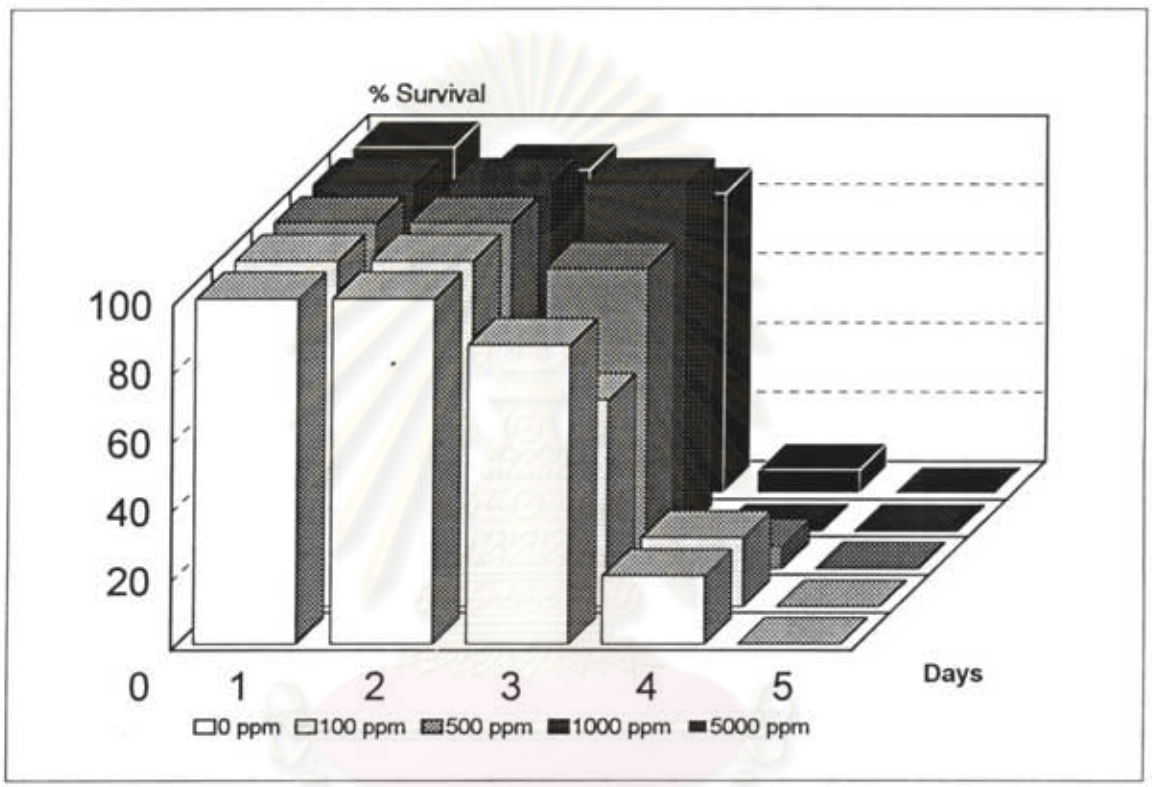
จากผลการทดสอบหลังการเสริมด้วยสารกระตุ้น IE-04 ความเข้มข้นต่างๆ คือ 100, 500, 1000 และ 5,000 ppm เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่ากลุ่มที่ได้รับสารกระตุ้น IE-04 ความเข้มข้น 100 ppm ติดต่อกัน 7 วัน เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการทดสอบต่อไป เนื่องจากมีค่า RPS หลังจากเหนี่ยวนำด้วย *V. parahaemolyticus* สูงกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารกระตุ้นความเข้มข้นอื่น และเมื่อตรวจสอบภูมิคุ้มกันโดยเซลล์และโดยสารน้ำ คือ %phagocytosis และ bactericidin พบว่ากลุ่มที่ได้รับสารกระตุ้น IE-04 ความเข้มข้น 100 ppm มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารกระตุ้นความเข้มข้นอื่น และพบว่า bactericidin จะยังคงมีค่าสูงอยู่หลังจากหยุดให้สารกระตุ้น IE-04 เป็นเวลา 7 วัน



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4 อัตรารอดของกุ้งกุลาดำหลังเหนี่ยวนำด้วยการฉีด *V. parahaemolyticus* ความเข้มข้น 2.23×10^5 CFU/pc. เข้ากล้ามเนื้อ เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม (0) และกลุ่มที่เสริมด้วยผลิตภัณฑ์ IE-04 ความเข้มข้น 100, 500, 1000 และ 5000 ppm ผสมอาหารติดต่อกัน 7 วัน

(กลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วยสารละลาย 0.85% NaCl ที่ปราศจากเชื้อ มีอัตรารอด 100% ไม่ได้แสดงผลไว้ในรูป)



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 5 อัตรารอดของกุ้งกุลาดำหลังเหนี่ยวนำโดยการแช่ด้วยไวรัสหัวเหลือง (YHV) ความเข้มข้น 1:10,000 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม (0) และกลุ่มที่เสริมด้วยผลิตภัณฑ์ IE-04 ความเข้มข้น 100, 500, 1000 และ 5000 ppm ผสมอาหารติดต่อกัน 7 วัน

(กลุ่มควบคุมที่แช่ใน LHM เจือจาง 1:10,000 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง มีอัตรารอด 100% ไม่ได้แสดงผลไว้ในรูป)

ตารางที่ 5 แสดงผล Relative Percent Survival (หลังเหนี่ยวนำด้วย *V. parahaemolyticus* และ YHV), bactericidin titer, % phagocytosis และ phagocytic index ของกุ้งกุลาดำกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่เสริมด้วยสารกระตุ้นทางการค้า IE-04 ความเข้มข้น 100, 500, 1000, และ 5000 ppm ติดต่อกันเป็นเวลา 7 วัน และหลังหยุดให้สารกระตุ้นเป็นเวลา 7 วัน

Treatment (ppm)	% RPS		Bactericidin titer	% Phagocytosis	Phagocytic index
	Vibrio	YHV			
Feed 7 days					
Control	0	0	640	1.50±0.83[a]	1.0±0[a]
100	20.05	0	2560	6.22±4.55[b]	1.83±.07[a]
500	-2.58	-16.66	1280	6.26±1.93[b]	2.78±.0.23[b]
1000	6.47	-25	1280	2.67±0.34[ab]	1.32±0.26[a]
5000	6.47	-16.66	2560	3.68±1.01[ab]	2.10±0.51[a]
Stop feeding 7 days					
Control	ND	ND	640	3.39±0.55[a]	1.17±0.16[a]
100	ND	ND	5120	2.98±0.53[a]	1.23±0.04[a]
500	ND	ND	1280	3.67±0.54[a]	1.09±0.13[a]
1000	ND	ND	1280	3.50±1.08[a]	1.14±0.10[a]
5000	ND	ND	1280	2.69±0.73[a]	1.11±0.06[a]

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2 การทดสอบผลของสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน IE-04 ในกุ้งกุลาดำเป็นเวลา 90 วัน

ผลการทดสอบหลังการเสริมด้วยสารกระตุ้น IE-04 ความเข้มข้น 100 และ 200 ppm ชีติดต่อกัน 90 วัน ตรวจสอบหาค่าอัตรารอด น้ำหนักเฉลี่ย ความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคติดเชื้อแบคทีเรียและไวรัส หลังให้สารกระตุ้น IE-04 เป็นเวลา 30, 60, และ 90 วัน และตรวจสอบระดับ bactericidin, % phagocytosis, phagocytosis index หลังให้สารกระตุ้น IE-04 เป็นเวลา 60 และ 90 วัน

4.2.1 ผลของสารกระตุ้น IE-04 ต่ออัตรารอดและอัตราการเจริญเติบโต

หลังการเสริมด้วยสารกระตุ้น IE-04 ความเข้มข้น 100 และ 200 ppm ติดต่อกัน 30, 60 และ 90 วัน พบว่ากุ้งมีอัตรารอดและอัตราการเจริญเติบโตไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 6) ส่วนผลการตรวจสอบคุณภาพน้ำตลอดการทดลอง พบว่าไม่มีความแตกต่างกันในทุกกลุ่มการทดลองและมีค่าอยู่ในพิสัยที่ไม่เกิดอันตรายต่อกุ้งกุลาดำ (ตารางที่ 7)

4.2.2 การทดสอบความต้านทานต่อการเกิดโรคติดเชื้อแบคทีเรีย

หลังการเสริมด้วยสารกระตุ้น IE-04 ติดต่อกัน 30 วัน และเหนี่ยวนำด้วยการฉีด *V. parahaemolyticus* ความเข้มข้น 3.24×10^{6} CFU/pc พบว่าอัตรารอดของกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับสารกระตุ้นความเข้มข้น 100 และ 200 ppm ไม่มีความแตกต่างกัน ($P<0.05$) (เท่ากับ 10, 12.5 และ 17.5%) และมี ค่า RPS เท่ากับ 2.78 และ 8.33% ตามลำดับ (รูปที่ 6 และตารางที่ 8)

หลังการเสริมด้วยสารกระตุ้น IE-04 ติดต่อกัน 60 วัน และเหนี่ยวนำด้วยการฉีด *V. parahaemolyticus* ความเข้มข้น 1.35×10^{6} CFU/pc กลุ่มความเข้มข้น 100 และ 200 ppm มีอัตรารอดไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม ($P<0.05$) (เท่ากับ 30, 40 และ 40% ตามลำดับ) (รูปที่ 7) โดยมีค่า RPS เท่ากับ -16.67 และ 0% ตามลำดับ (ตารางที่ 8)

หลังได้รับสารกระตุ้น IE-04 ติดต่อกัน 90 วัน และเหนี่ยวนำด้วยการฉีด *V. parahaemolyticus* ความเข้มข้น 6.45×10^{6} CFU/pc พบว่ากลุ่มควบคุม กลุ่มความเข้มข้น 100 และ 200 ppm มีอัตรารอดไม่แตกต่างกั น ($P<0.05$) (เท่ากับ 85.0, 82.5 และ 57.50% ตามลำดับ) (รูปที่ 8) และมีค่า RPS เท่ากับ 16.67 และ -183.33 ตามลำดับ (ตารางที่ 8)

จากผลการตรวจสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคติดเชื้อแบคทีเรีย หลังการเสริมด้วยสารกระตุ้น IE-04 ความเข้มข้น 100 และ 200 ppm ติดต่อกัน 30, 60 และ 90 วัน พบว่าไม่สามารถเพิ่มความต้านทานต่อการติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* โดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ

ตารางที่ 6 น้ำหนักเฉลี่ยและอัตรารอดของกุ้งกุลาดำกลุ่มควบคุม และกลุ่มเสริมด้วยสารกระตุ้น IE-04 ความเข้มข้น 100 และ 200 ppm ติดต่อกันเป็นเวลา 30, 60 และ 90 วัน

Treatment	Mean Body Weight (g) at day			Percent Survival rate at day		
	30	60	90	30	60	90
Control	3.24	7.71	15.24	95.15	81.43	63.22
100 ppm	3.16	7.65	14.97	91.07	81.07	62.32
200 ppm	3.10	7.56	15.23	86.96	70.54	57.50

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 แสดงผลคุณภาพน้ำตลอดการเลี้ยงด้วยอาหารเสริมสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน IE-04 ติดต่อกัน 90 วัน

Time (day)	Control				IE-04 100 ppm				IE-04 200 ppm			
	pH	Ammonia (ppm)	Nitrite (ppm)	Nitrate (ppm)	pH	Ammonia (ppm)	Nitrite (ppm)	Nitrate (ppm)	pH	Ammonia (ppm)	Nitrite (ppm)	Nitrate (ppm)
10	8.06	0.297	0.068	43.7	8.05	0.341	0.067	38.6	8.10	0.331	0.054	31.8
20	8.22	0.318	0.756	47.6	8.25	0.338	0.756	37.8	8.28	0.414	0.662	45.6
30	7.86	0.178	0.185	44.2	7.89	0.099	0.154	38.8	7.93	0.128	0.139	50.0
40	8.11	0.138	0.027	27.2	8.13	0.142	0.031	29.9	8.19	0.108	0.026	28.2
50	7.96	0.267	0.166	26.1	7.93	0.354	0.230	41.4	8.00	0.358	0.232	46.3
60	8.13	0.327	0.033	32.9	8.17	0.362	0.073	28.3	8.25	0.282	0.041	28.2
70	7.88	0.310	0.018	34.8	7.91	0.374	0.023	37.7	8.01	0.316	0.016	34.5
80	8.04	0.271	0.023	33.3	8.04	0.290	0.030	33.4	8.11	0.212	0.020	37.9
90	8.14	0.148	0.040	27.7	8.17	0.077	0.031	31.1	8.21	0.065	0.033	31.6

หมายเหตุ ความเค็ม = 17 - 20 ppt

ความเป็นด่าง = 170 - 200 ppm

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

และเมื่อเก็บตัวอย่างกุ้งตายหลังการเหนี่ยวนำมาแยกเชื้อแบคทีเรียจากเลือดและดับลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TCBS และนำมาทดสอบทางชีวเคมี พบว่าเป็น *V. parahaemolyticus* (ตารางที่13)

4.2.3 การทดสอบความต้านทานต่อการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

หลังการเสริมด้วยสารกระตุ้น IE-04 เป็นเวลา 30 วัน และเหนี่ยวนำโดยการแช่ด้วยเชื้อ YHV ความเข้มข้น 1:20,000 (ปริมาตร/ปริมาตร) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และตรวจสอบอัตรารอดของกุ้งเป็นเวลา 10 วันหลังได้รับเชื้อ พบว่ากลุ่มที่เสริมด้วยสารกระตุ้น IE-04 มีการตายช้ากว่ากลุ่มควบคุม โดยพบว่าวันที่ 6 หลังการเหนี่ยวนำกลุ่มควบคุมมีอัตรารอดต่ำกว่ากลุ่มที่ได้รับสารกระตุ้น IE-04 ความเข้มข้น 100 และ 200 ppm (32.5, 57.5 และ 47.5% ตามลำดับ) (รูปที่ 9) และกลุ่มความเข้มข้น 100 ppm มีค่า RPS สูงกว่าความเข้มข้น 200 ppm (37.04 และ 22.22% ตามลำดับ) หลังการทดสอบ 10 วัน อัตรารอดของกลุ่มควบคุมและกลุ่มเสริมด้วยสารกระตุ้น IE-04 ไม่มีความแตกต่างกัน ($P<0.05$) (ตารางที่ 8)

หลังการเสริมด้วยสารกระตุ้น IE-04 เป็นเวลา 60 วัน และเหนี่ยวนำด้วยเชื้อไวรัสหัวเหลือง พบว่ากลุ่มความเข้มข้น 100 ppm มีการตายช้ากว่ากลุ่มความเข้มข้น 200 ppm และกลุ่มควบคุมตาม อัตรารอดวันที่ 4 ของการทดสอบไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) (เท่ากับ 25, 57.5 และ 47.5% ตามลำดับ) (รูปที่ 10) กลุ่มความเข้มข้น 100 ppm มีค่า RPS สูงกว่ากลุ่ม 200 ppm คือ 43.33 และ 30% ตามลำดับ (ตารางที่ 8)

หลังการเสริมด้วยสารกระตุ้น IE-04 เป็นเวลา 90 วัน และทดสอบความต้านทานต่อการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง พบว่ากลุ่มควบคุมมีอัตราการตายช้ากว่ากลุ่มที่ เสริมด้วยสารกระตุ้น IE-04 ในวันที่ 6 ของการทดสอบอัตรารอดของกลุ่มควบคุมและกลุ่มความเข้มข้น 100 และ 200 ppm ไม่มีความแตกต่างกัน ($P<0.05$) (40.0, 27.5 และ 22.50%ตามลำดับ) (รูปที่ 11) โดยมีค่า RPS ไปในทางลบคือ -20.83 และ -29.17% ตามลำดับ (ตารางที่ 8)

จากการทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองหลังจากเสริมด้วยสารกระตุ้น IE-04 ความเข้มข้น 100 และ 200 ppm ติดต่อกัน 30, 60 และ 90 วัน พบว่าในช่วง 30 ถึง 60 วัน กุ้งที่ได้รับการเสริมด้วยสารกระตุ้น IE-04 จะมีอัตราการตายช้ากว่ากลุ่มควบคุม โดยกลุ่มความเข้มข้น 100 ppm มีค่า RPS สูงกว่าความเข้มข้น 200 ppm แต่หลังจากเสริมด้วยสารกระตุ้น 90 วัน กุ้งทดลองจะมีอัตราการตายเร็วกว่าและสูงกว่ากลุ่มควบคุม ตัวอย่างกุ้งที่ตายหลังการเหนี่ยวนำพบการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพแสดงการติดเชื้อ YHV (รูปที่ 29)

4.2.4 ผลการตรวจสอบระดับ bactericidin

หลังการเสริมด้วยสารกระตุ้น IE-04 ความเข้มข้น 100 และ 200 ppm เป็นเวลา 60 วัน กลุ่มควบคุมมีค่า bactericidin titer เท่ากับ 1280 โดยกลุ่มที่เสริมด้วย IE-04 ความเข้มข้น 100 และ 200 ppm มีค่า bactericidin สูงกว่ากลุ่มควบคุม 2 เท่าคือ 2560

หลังการเสริมด้วยสารกระตุ้น IE-04 เป็นเวลา 90 วัน กลุ่มควบคุมมีค่า bactericidin titer เท่ากับ 640 กลุ่มความเข้มข้น 100 ppm มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุม 2 เท่า (1280) และสูงกว่ากลุ่มความเข้มข้น 200 ppm 8 เท่า ส่วนกลุ่ม 200 ppm มีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุม 4 เท่า (160) (ตารางที่ 8)

การเสริมด้วยสารกระตุ้น IE-04 ความเข้มข้น 100 ppm ติดต่อกัน 60 และ 90วัน จะช่วยเพิ่มระดับ bactericidin ส่วนการเสริมด้วยความเข้มข้น 200 ppm ติดต่อกัน 60 วัน จะช่วยเพิ่มระดับ bactericidin และพบว่า bactericidin มีค่าลดลงเมื่อเสริมติดต่อกัน 90 วัน

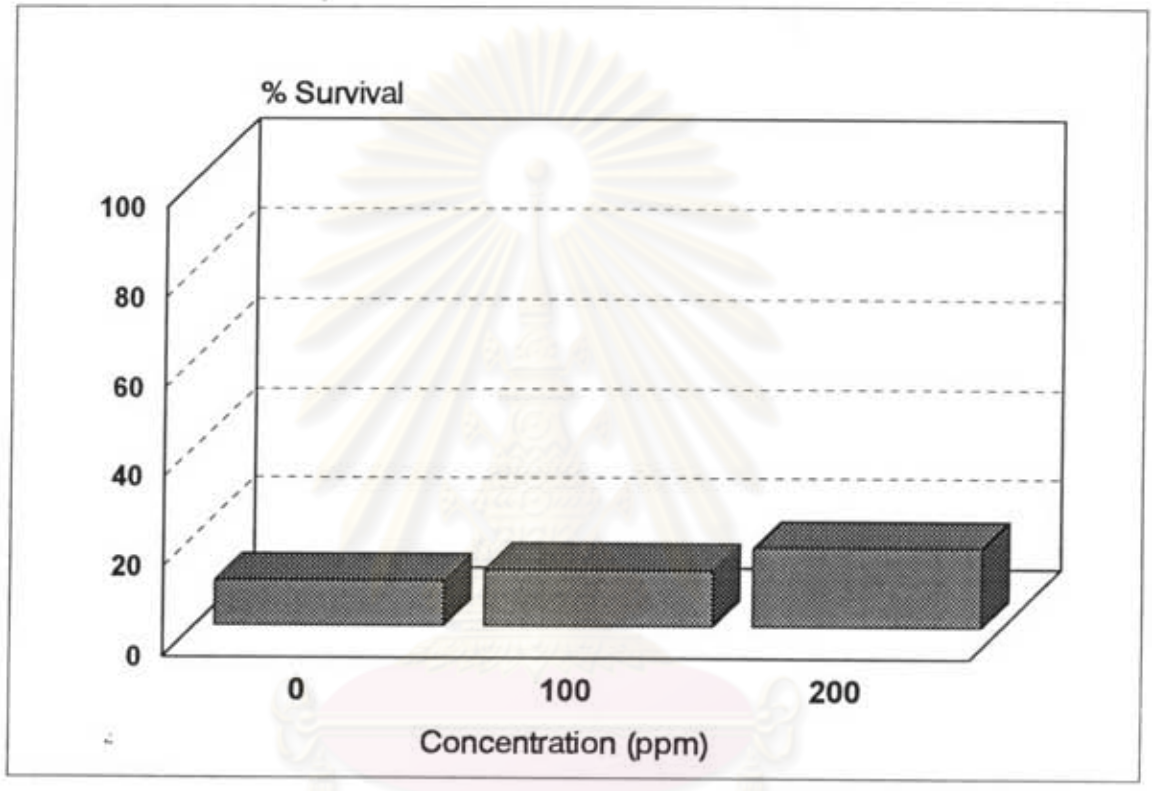
4.2.5 การทดสอบหา % phagocytosis, phagocytic index

หลังการเสริมด้วยสารกระตุ้น IE-04 ความเข้มข้น 100 และ 200 ppm เป็นเวลา 60 วัน % phagocytosis ของกลุ่มควบคุม, 100 ppm และ 200 ppm มีค่าเท่ากับ 4.06 ± 0.28, 3.30 ± 0.54 และ 2.03 ± 0.65 ตามลำดับ โดยพบว่าความเข้มข้น 200 ppm มีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) สำหรับค่า phagocytic index ไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่เสริมด้วยสารกระตุ้น IE-04 ($P<0.05$) (ตารางที่ 8)

การเสริมด้วย IE-04 เป็นเวลา 90 วัน พบว่า % phagocytosis และ phagocytic index ของกลุ่มที่เสริมด้วยสารกระตุ้น IE-04 ไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม ($P<0.05$) (ตารางที่ 8)

การเสริมด้วยสารกระตุ้น IE-04 ความเข้มข้น 100 และ 200 ppm ติดต่อกัน 60 และ 90 วัน ไม่มีผลต่อการเพิ่ม phagocytosis ในกุ้งกุลาดำ

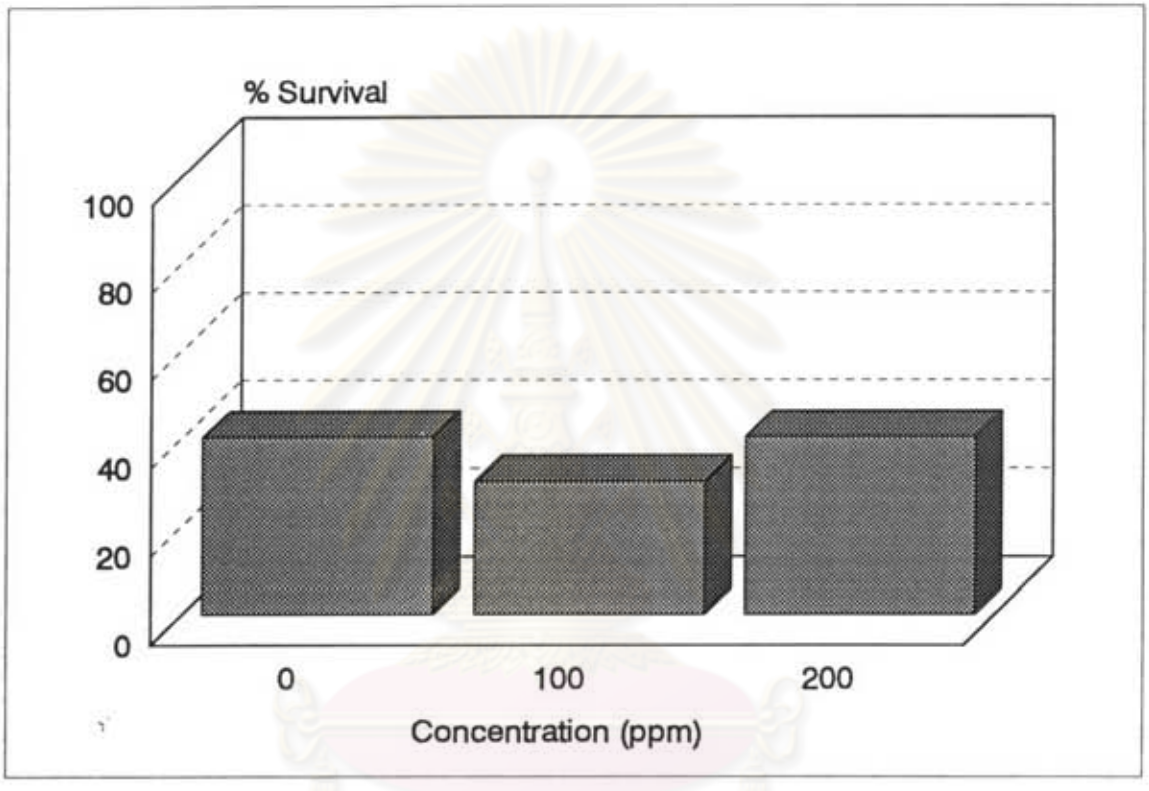
การเสริมด้วยสารกระตุ้น IE-04 ความเข้มข้น 100 และ 200 ppm ติดต่อกันเ 30, 60 และ 90 วัน พบว่าความเข้มข้น 100 ppm จะช่วยเพิ่มความต้านทานต่อการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองได้ในเวลา 30 และ 60 วัน โดยมีระดับ bactericidin สูงขึ้น (60 และ 90 วัน) โดยไม่มีผลต่อการเพิ่มการเกิด phagocytosis สำหรับการเสริมด้วยความเข้มข้น 200 ppm ติดต่อกัน 30 และ 60 วัน จะช่วยเพิ่มความต้านทานต่อการเกิดโรคไวรัสหัวเหลืองหลังจาก โดยมีค่า bactericidin เพิ่มขึ้นโดยไม่มีผลต่อการเพิ่ม phagocytosis



รูปที่ 6 อัตรารอดของกุ้งกุลาดำหลังเหนี่ยวนำด้วยการฉีด *V. parahaemolyticus* ความเข้มข้น 3.24×10^{6} CFU/pc เข้ากล้ามเนื้อ เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม (0) และกลุ่มที่เสริมด้วยผลิตภัณฑ์ IE-04 ความเข้มข้น 100 และ 200 ppm ผสมอาหารติดต่อกันเป็นเวลา 30 วัน

(กลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วยสารละลาย 0.85% NaCl ที่ปราศจากเชื้อ มี อัตรารอด 100% ไม่ได้แสดงผลไว้ในรูป)

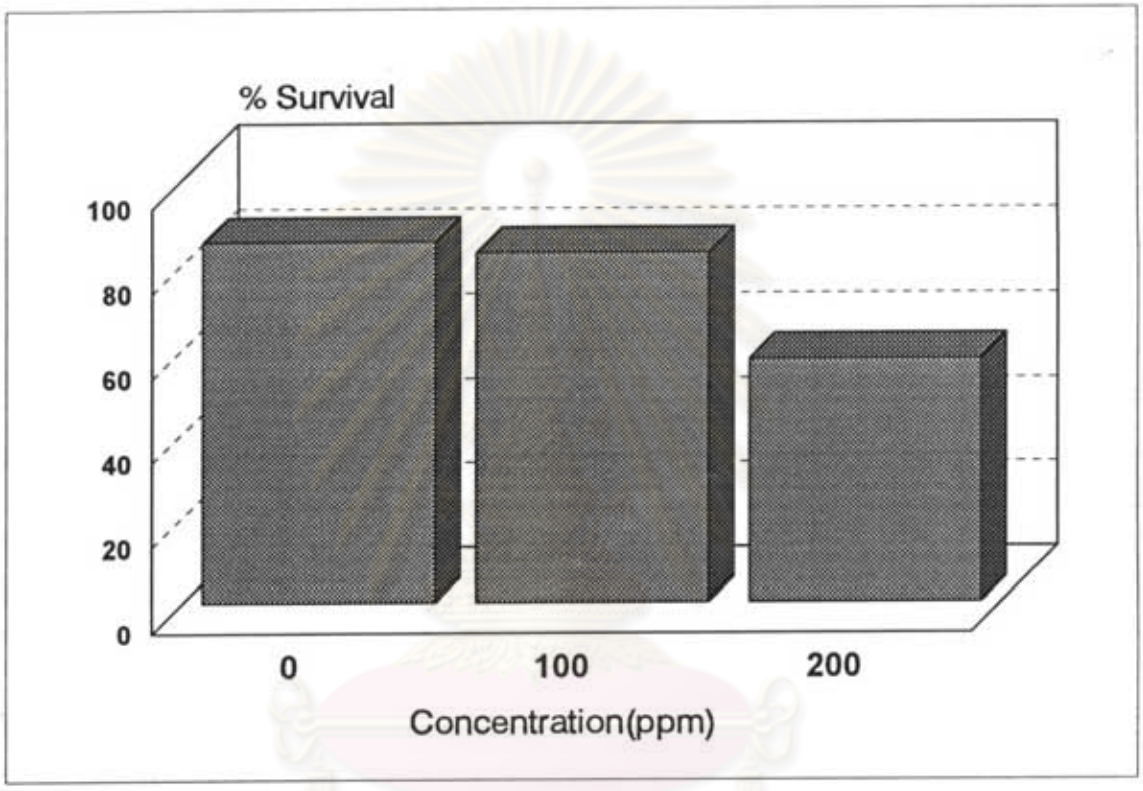
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 7 อัตรารอดของกุ้งกุลาดำหลังเหนี่ยวนำด้วยการฉีด *V. parahaemolyticus* ความเข้มข้น $1.35x10^{6}$ CFU/pc เข้ากล้ามเนื้อ เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม (0) และกลุ่มที่เสริมด้วยผลิตภัณฑ์ IE-04 ความเข้มข้น 100 และ 200 ppm ผสมอาหารติดต่อกันเป็นเวลา 60 วัน

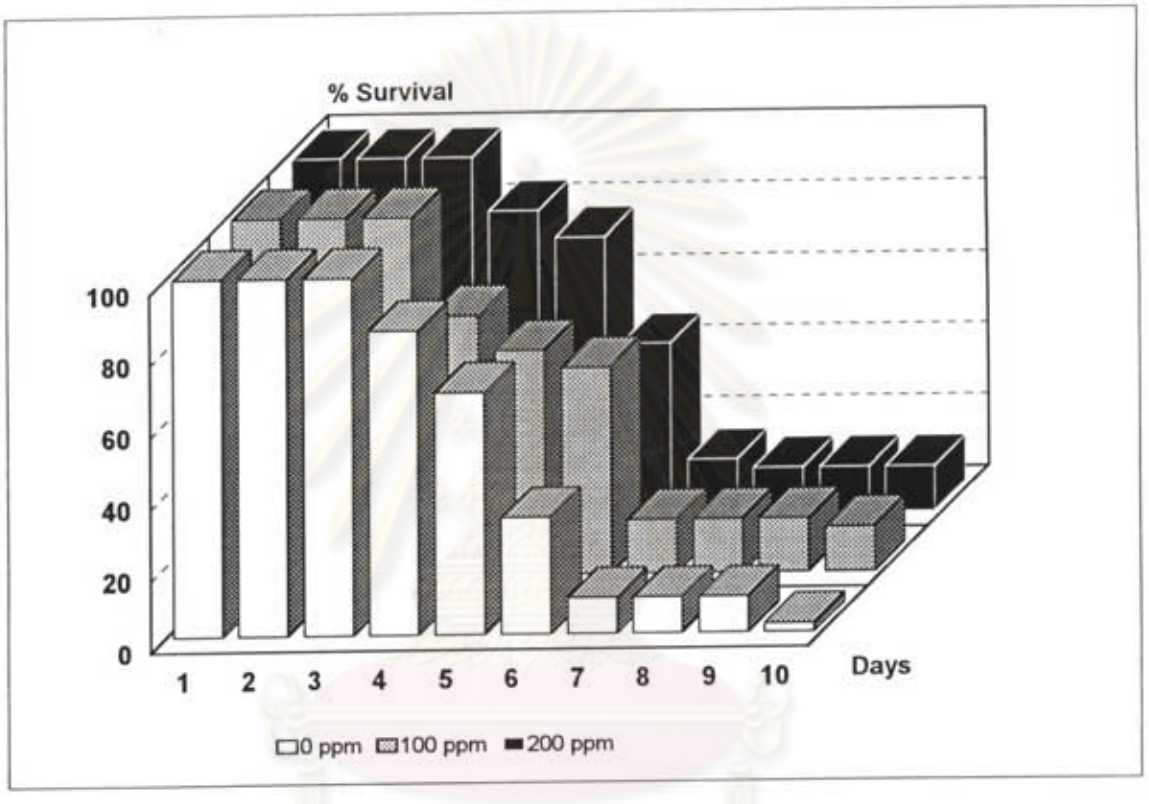
(กลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วยสารละลาย 0.85% NaCl ที่ปราศจากเชื้อ มีอัตรารอด 100% ไม่ได้แสดงผลไว้ในรูป)



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 8 อัตรารอดของกุ้งกุลาดำหลังเหนี่ยวนำด้วยการฉีด *V. parahaemolyticus* ความเข้มข้น 6.45×10^{6} CFU/pc เข้ากล้ามเนื้อ เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม (0) และกลุ่มที่เสริมด้วยผลิตภัณฑ์ IE-04 ความเข้มข้น 100 และ 200 ppm ผสมอาหารติดต่อกันเป็นเวลา 90 วัน

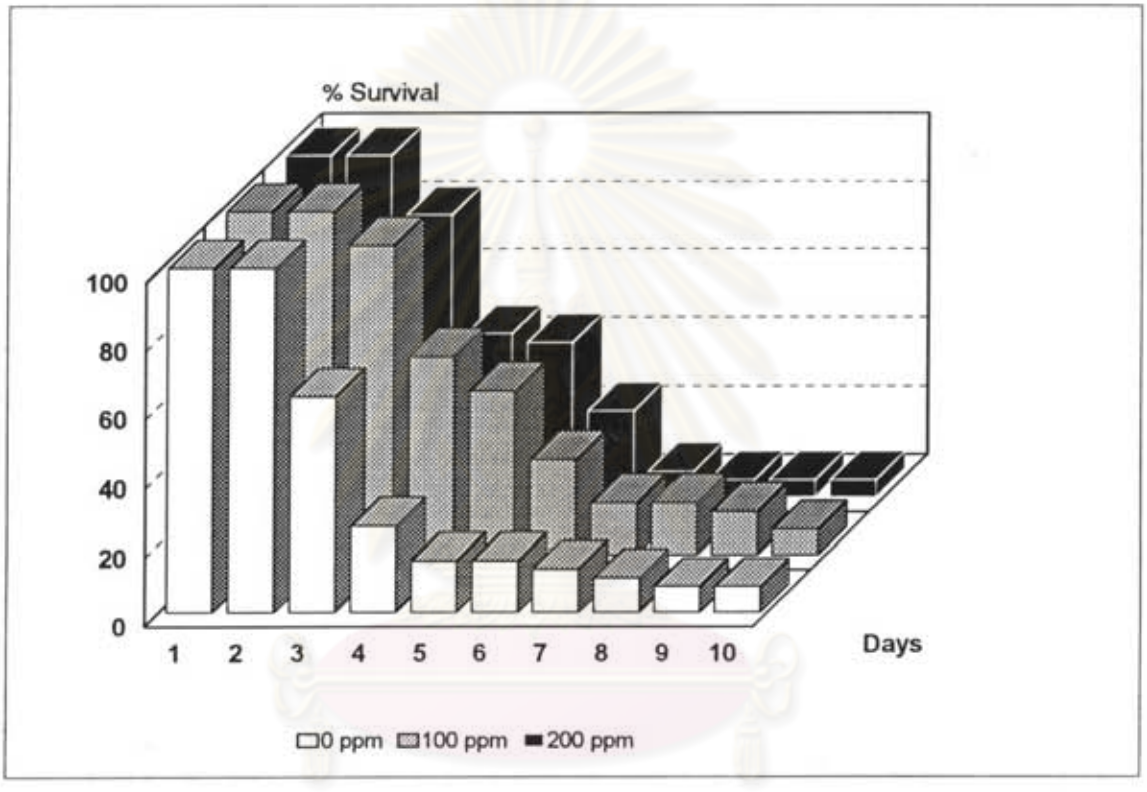
(กลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วยสารละลาย 0.85% NaCl ที่ปราศจากเชื้อ มีอัตรารอด 100% ไม่ได้แสดงผลไว้ในรูป)



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 9 อัตรารอดของกุ้งกุลาดำหลังเหนี่ยวนำโดยการแช่ด้วยไวรัสหัวเหลือง (YHV) ความเข้มข้น 1:20,000 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม (0) และกลุ่มที่เสริมด้วยผลิตภัณฑ์ IE-04 ความเข้มข้น 100 และ 200 ppm ผสมอาหารติดต่อกันเป็นเวลา 30 วัน

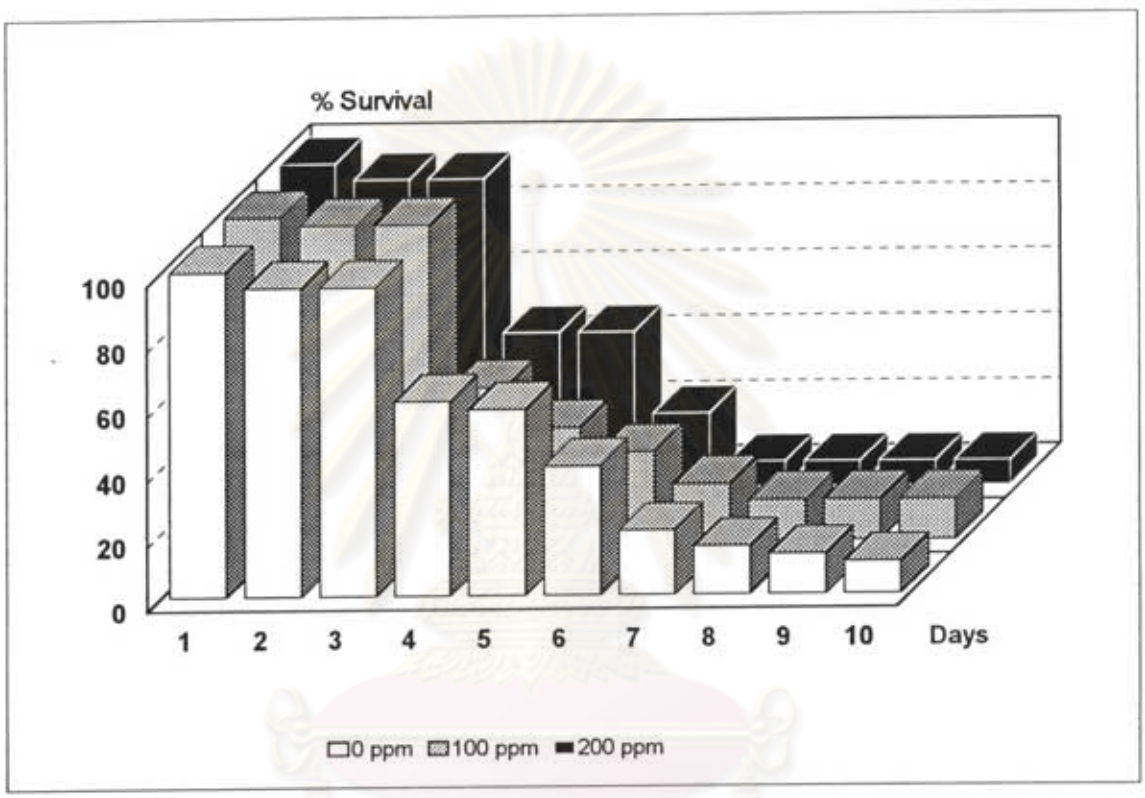
(กลุ่มควบคุมที่แช่ใน LHM เจือจาง 1:20,000 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง มีอัตรารอด 100% ไม่ได้แสดงผลไว้ในรูป)



รูปที่ 10 อัตรารอดของกุ้งกุลาดำหลังเหนี่ยวนำโดยการแช่ด้วยเชื้อไวรัสหัวเหลือง (YHV) ความเข้มข้น 1:20,000 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม (0) และกลุ่มที่เสริมด้วยผลิตภัณฑ์ IE-04 ความเข้มข้น 100 และ 200 ppm ผสมในอาหารติดต่อกันเป็นเวลา 60 วัน

(กลุ่มควบคุมที่แช่ใน LHM เจือจาง 1:20,000 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง มีอัตรารอด 100% ไม่ได้แสดงผลไว้ในรูป)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 11 อัตรารอดของกุ้งกุลาดำหลังเหนี่ยวนำโดยการแช่ด้วยเชื้อไวรัสหัวเหลือง (YHV) ความเข้มข้น 1:20,000 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม (0) และกลุ่มที่เสริมด้วยผลิตภัณฑ์ IE-04 ความเข้มข้น 100 และ 200 ppm ผสมอาหารติดต่อกันเป็นเวลา 90 วัน

(กลุ่มควบคุมที่แช่ใน LHM เจือจาง 1:20,000 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง มีอัตรารอด 100% ไม่ได้แสดงผลไว้ในรูป)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 แสดงผล Relative Percent Survival (หลังเหนี่ยวนำด้วย *V. parahaemolyticus* และ YHV), bactericidin titer, % phagocytosis และ phagocytic index ของกุ้งกุลาดำกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับการเสริมด้วยสารกระตุ้นทางการค้า IE-04 ความเข้มข้น 100 และ 200 ppm ติดต่อกันเป็นเวลา 30, 60 และ 90 วัน

Treatment (ppm)	% RPS		Bactericidin titer	% Phagocytosis	Phagocytic index
	Vibrio	YHV			
30 days					
Control	0	0	ND	ND	ND
100	2.78	37.04	ND	ND	ND
200	8.33	22.22	ND	ND	ND
60 Days					
Control	0	0	1280	4.06±0.28[a]	1.70±0.18[a]
100	-16.67	43.33	2560	3.30±0.54[a]	1.68±0.35[a]
200	0	30.0	2560	2.03±0.65[b]	1.93±0.61[a]
90 Days					
Control	0	0	640	8.67±1.54[a]	2.02±0.32[a]
100	16.67	-20.83	1280	9.20±2.29[a]	2.39±0.26[a]
200	-183.33	29.17	160	11.20±2.46[a]	2.42±0.09[a]

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3 การทดสอบเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของเซลล์ *C. butyricum* ต่อการเสริมภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ

ผลการทดสอบหลังการเสริมด้วยเซลล์ของ *C. butyricum* ความเข้มข้น 100, 200และ 500 ppm ติดต่อกัน 7 วัน และหลังหยุดให้การเสริม 7 และ 14 วัน

4.3.1 การทดสอบความด้านทานต่อการติดเชื้อแบคทีเรีย

หลังการเสริมด้วยเซลล์ของ *C. butyricum* ติดต่อกัน 7 วัน และหยุดการเสริมด้วยเซลล์ของ *C. butyricum* เป็นเวลา 7 วัน พบว่าอัตรารอดของกุ้งหลังเหนี่ยวนำด้วย *V. parahaemolyticus* ความเข้มข้น 6.55×10^{5} CFU/pc ในทุกกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) (กลุ่มควบคุม, 100, 200 และ 500 ppm มีอัตรารอดเท่ากับ 26.67, 26.67, 36.67และ 46.67% ตามลำดับ) (รูปที่ 12) และพบว่ากลุ่มความเข้มข้น 500 ppm มีค่า RPS เท่ากับ 15.79 ส่วนที่ความเข้มข้น 100 และ 200 ppm มีค่าไปในทางลบ (-15.79) (ตารางที่ 9)

หลังหยุดการเสริมด้วยเซลล์ของ *C. butyricum* เป็นเวลา 14 วัน และเหนี่ยวนำด้วย *V. parahaemolyticus* ความเข้มข้น 1.65×10^{7} CFU/pc อัตรารอดของทุกกลุ่มไม่แตกต่างกัน ($P<0.05$) (รูปที่ 13) โดยมีค่า RPS ของกลุ่มความเข้มข้น 100, 200 และ 500 ppm เท่ากับ -3.58, 10.71 และ7.14% ตามลำดับ (ตารางที่ 9)

การเสริมด้วยเซลล์ของ *C. butyricum* ติดต่อกัน 7 วัน และหยุดการเสริม 7 - 14 วัน ไม่มีผลต่อการเพิ่มความด้านทานการติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* เมื่อแยกเชื้อจากตับและเลือดของกุ้งที่ตายหลังการเหนี่ยวนำลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TCBS และทดสอบทางชีวเคมีพบว่าเป็น *V. parahaemolyticus* (ตารางที่ 13)

4.3.2 การทดสอบความด้านทานต่อการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

หลังการเสริมด้วยเซลล์ของ *C. butyricum* ความเข้มข้น 100, 200 และ 500 ppm ติดต่อกัน 7 วัน และหยุดการเสริม 7 วัน เหนี่ยวนำโดยการแช่ด้วยเชื้อไวรัสหัวเหลือง พบว่ากุ้งที่ได้รับการเสริมด้วยเซลล์ของ *C. butyricum* มีอัตราการตายช้ากว่า และมีอัตรารอดสูงกว่ากลุ่มควบคุม (รูปที่ 14) โดยกลุ่มที่ได้รับการเสริมด้วยความเข้มข้น 100 ppm มีอัตรารอดสูงกว่ากลุ่มอื่น ในวันที่ 6 ของการทดสอบอัตรารอดของกลุ่มควบคุม, กลุ่มที่ได้รับการเสริมความเข้มข้น 100, 200 และ 500 ppm มีค่าเท่ากับ 53.33, 80.0, 60.0 และ 53.33% ตามลำดับ และมีค่า RPS เท่ากับ 57.15, 14.29 และ 0% ตามลำดับ (ตารางที่ 9)

หลังหยุดการเสริมด้วยเซลล์ของ *C. butyricum* เป็นเวลา 14 วันและนำมาเหนี่ยวนำด้วยเชื้อไวรัสหัวเหลือง กลุ่มที่เสริมด้วยเซลล์ของ *C. butyricum* ความเข้มข้น 100 ppm มีอัตรารอดต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) วันที่ 6 ของการทดสอบ อัตรารอดของกุ้งกลุ่มควบคุม กลุ่มความเข้มข้น 100, 200 และ 500 ppm มีค่าเท่ากับ 53.33, 13.33, 36.67 และ 40% ตามลำดับ และมีค่า RPS ในทางลบคือ -85.71, -35.70 และ -28.57 ตามลำดับ (รูปที่ 15 และตารางที่ 9)

การเสริมด้วยเซลล์ของ *C. butyricum* ความเข้มข้น 100 และ200 ppm เป็นเวลา 7 วัน จะช่วยเพิ่มความต้านทานต่อการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองได้ 7 วันหลังหยุดให้การเสริม โดยความเข้มข้น 100 ppm ให้ผลในการเสริมได้ดีที่สุด ส่วนที่ความเข้มข้น 500 ppmไม่พบว่ามีส่วนช่วยในการเพิ่มความต้านทานต่อการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

ตัวอย่างกุ้งที่ตายจากการทดสอบพบการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพแสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง(รูปที่ 29)

4.3.3 การตรวจสอบระดับ bactericidin

หลังการเสริมด้วยเซลล์ของ *C. butyricum* ติดต่อกัน 7 วัน กลุ่มความเข้มข้น 200 และ 500 ppm มีระดับ bactericidin สูงขึ้นกว่ากลุ่มควบคุม 2 เท่า ส่วนความเข้มข้น 100 ppm ไม่พบการเพิ่มขึ้นโดยมีค่าเท่ากับกลุ่มควบคุมคือ 640

หลังหยุดการเสริม 7 วัน ระดับ bactericidin ในทุกกลุ่มที่เสริมด้วยเซลล์ของ *C. butyricum* มีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุม 4 เท่า (กลุ่มควบคุม 640, กลุ่มทดสอบ 160) และหลังจากหยุดการเสริม 14 วัน ระดับ bactericidin ของกลุ่มความเข้มข้น 100 ppm มีค่าเท่ากับกลุ่มควบคุมคือ 160 ส่วนกลุ่มความเข้มข้น 200 และ 500 ppm มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุม 2 เท่า (ตารางที่ 9)

การเสริมด้วยเซลล์ของ *C. butyricum* ความเข้มข้น 100 ppm ไม่มีผลต่อการเพิ่มระดับ bactericidin ในกุ้งกุลาดำ ส่วนที่ความเข้มข้น 200 และ 500 ppm สามารถช่วยเพิ่มระดับ bactericidin ได้

4.3.4 การตรวจสอบหา % phagocytosis และ phagocytic index

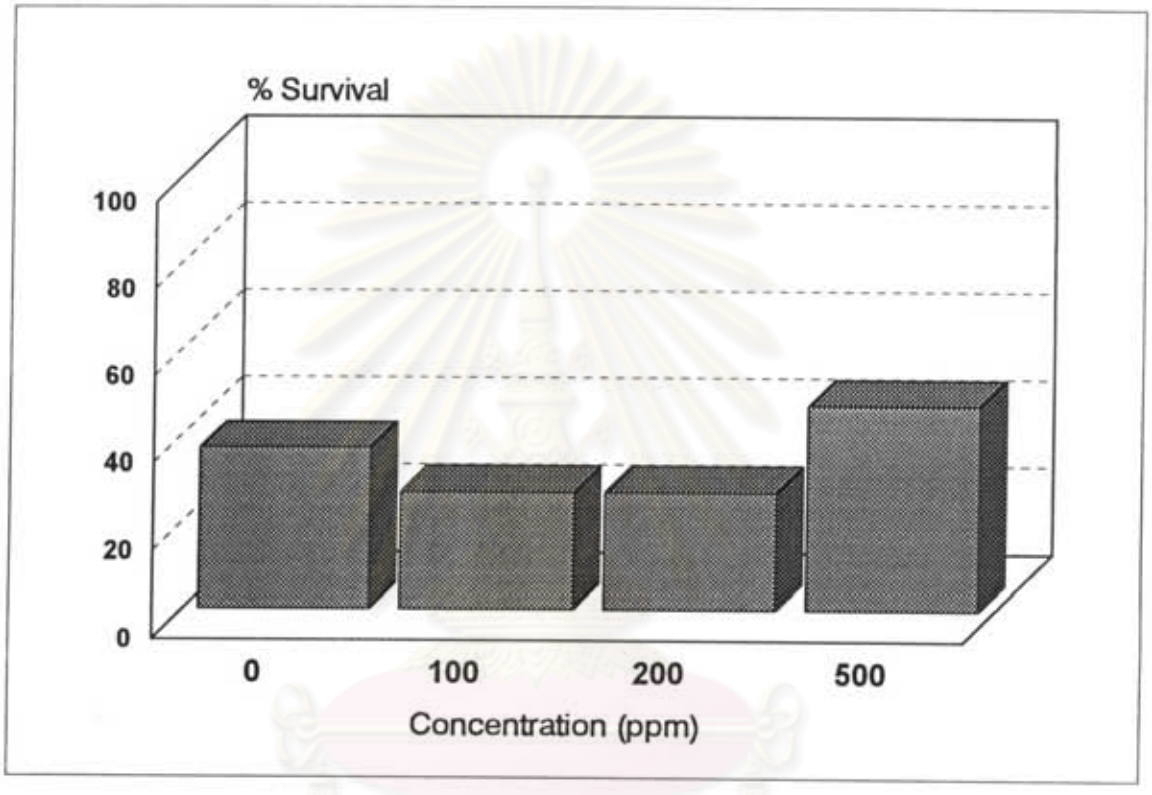
หลังการเสริมด้วยเซลล์ของ *C. butyricum* ติดต่อกัน 7 วัน กลุ่มความเข้มข้น 200 และ 500 ppm มีการเพิ่มขึ้นของ % phagocytosis สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ส่วนกลุ่มความเข้มข้น 100 ppm มีค่าไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม ($P<0.05$) และพบว่า phagocytic index ของกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่เสริมด้วยเซลล์ของ *C. butyricu* ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 9)

หลังหยุดการเสริม 7 และ 14 วัน % phagocytosis และ phagocytic index ของกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่เสริมด้วยเซลล์ของ *C. butyricum* ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 9)

การเสริมด้วยเซลล์ของ *C. butyricum* มีผลต่อการเพิ่ม % phagocytosis เมื่อใช้ที่ความเข้มข้น 200 และ 500 ppm ติดต่อกัน 7 วัน โดยมีผลในระยะสั้น คือ ไม่มีผลหลังหยุดให้การเสริมเป็นเวลา 7- 14 วัน

การทดสอบหลังการเสริมด้วยเซลล์ของ *C. butyricum* ความเข้มข้น 100, 200 และ 500 ppm ติดต่อกัน 7 วัน พบว่าทุกความเข้มข้นไม่มีผลต่อการเพิ่มความต้านทานต่อการติดเชื้อแบคทีเรีย ส่วนความต้านทานต่อการติดเชื้อไวรัสนั้น ความเข้มข้น 100 ppm จะให้ผลดีที่สุดตาและมีผลนาน 7 วันหลังหยุดการเสริม โดยไม่พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของระดับ bactericidin, % phagocytosis และ phagocytic index ส่วนกลุ่มความเข้มข้น 200 และ 500 ppm มีการเพิ่มขึ้นของระดับ bactericidin และ % phagocytosis หลังการเสริม 7 วัน แต่ไม่พบหลังจากหยุดการเสริม 7-14 วัน และไม่พบความต้านทานต่อการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

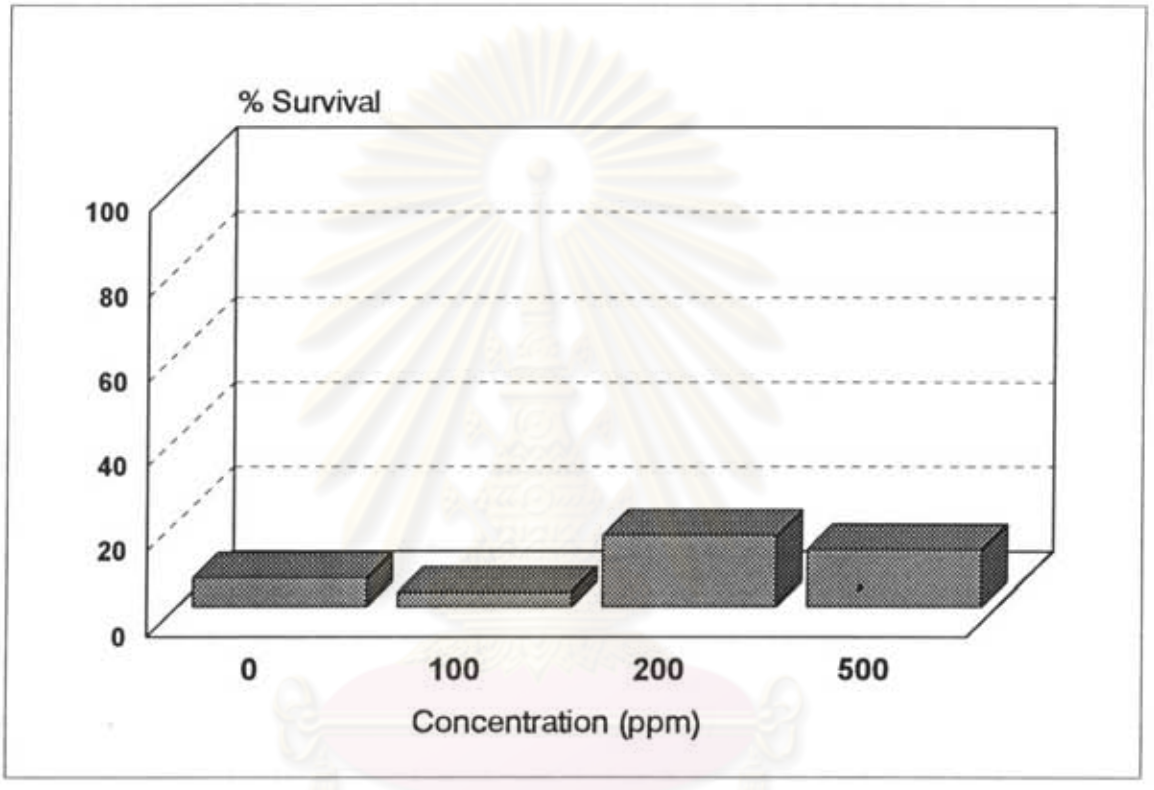
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 12 อัตรารอดของกุ้งกุลาดำหลังเหนี่ยวนำด้วยการฉีด *V. parahaemolyticus* ความเข้มข้น 6.55×10^5 CFU/pc เข้ากล้ามเนื้อ เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม (0) และกลุ่มที่เสริมด้วยเซลล์ของ *C. butyricum* ความเข้มข้น 100, 200 และ 500 ppm ผสมอาหารติดต่อกันเป็นเวลา 7 วัน และหยุดการเสริม 7 วัน

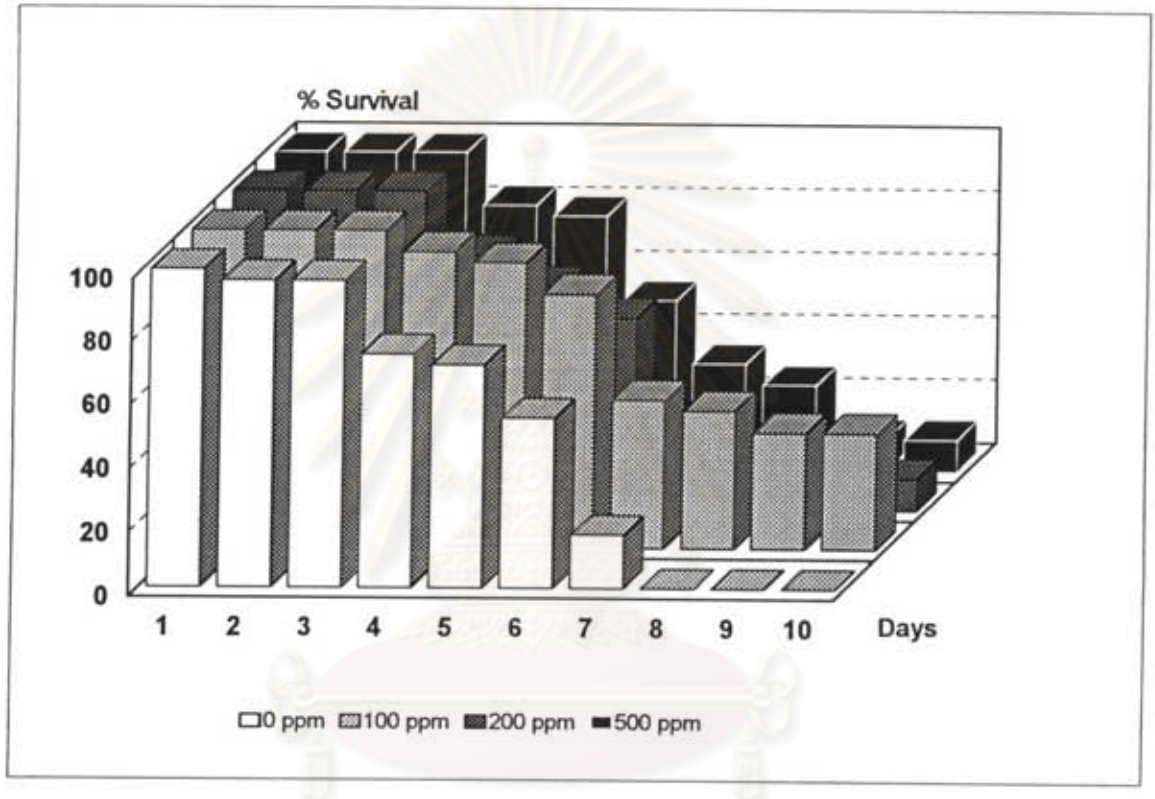
(กลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วยสารละลาย 0.85% NaCl ที่ปราศจากเชื้อ มีอัตรารอด100% ไม่ได้แสดงผลไว้ในรูป)



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 13 อัตรารอดของกุ้งกุลาดำหลังเหนี่ยวนำด้วยการฉีด *V. parahaemolyticus* ความเข้มข้น 1.65×10^{7} CFU/pc. เข้ากล้ามเนื้อ เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม (0) และกลุ่มที่เสริมด้วยเซลล์ของ *C. butyricum* ความเข้มข้น 100, 200 และ 500 ppm ผสมอาหารติดต่อกันเป็นเวลา 7 วัน และหยุดการเสริม 14 วัน

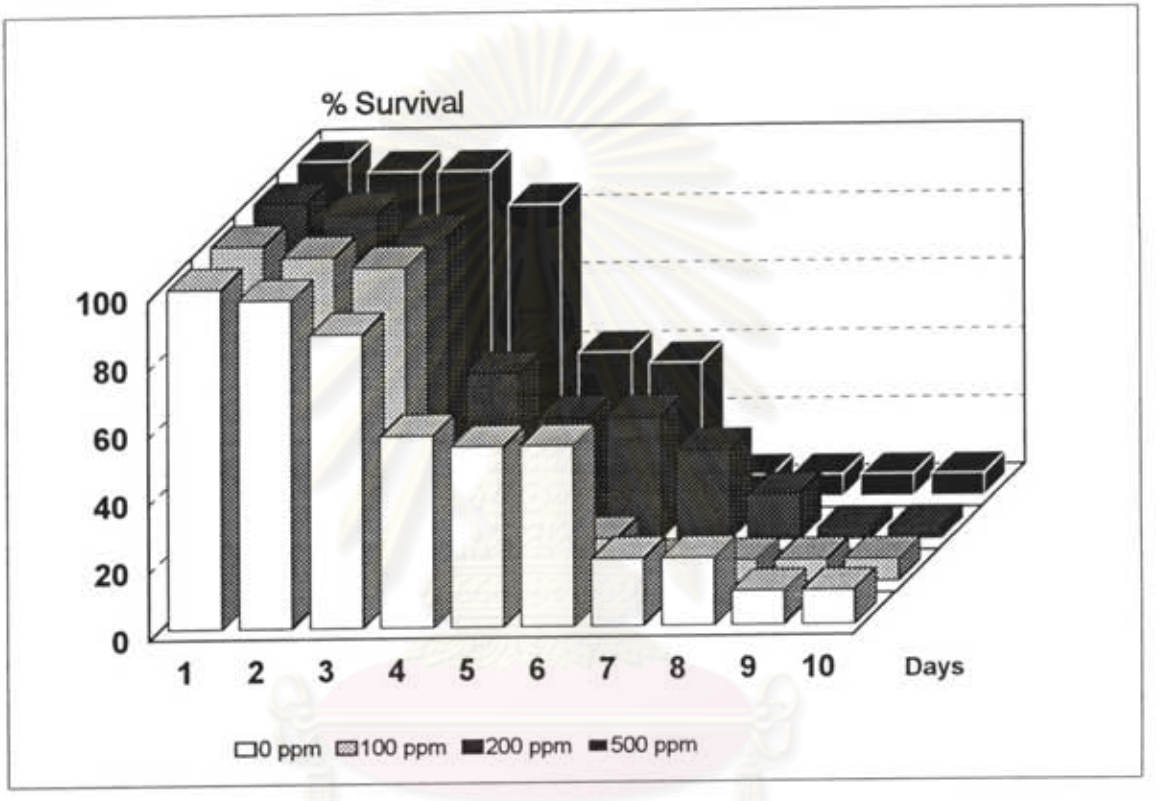
(กลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วยสารละลาย 0.85% NaCl ที่ปราศจากเชื้อ มีอัตรารอด 100% ไม่ได้แสดงผลไว้ในรูป)



รูปที่ 14 อัตรารอดของกุ้งกุลาดำหลังเหนี่ยวนำโดยการแช่ด้วยเชื้อไวรัสหัวเหลือง (YHV) ความเข้มข้น 1:20,000 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม (0) และกลุ่มที่เสริมด้วยเซลล์ของ *C. butyricum* ความเข้มข้น 100, 200 และ 500 ppm ผสมอาหารติดต่อกันเป็นเวลา 7 วัน และหยุดการเสริม 7 วัน

(กลุ่มควบคุมที่แช่ใน LHM เจือจาง 1:20,000 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง มีอัตรารอด 100% ไม่ได้แสดงผลไว้ในรูป)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 15 อัตรารอดของกุ้งกุลาดำหลังเหนี่ยวนำด้วยการแช่เชื้อไวรัสหัวเหลือง (YHV) ความเข้มข้น 1:20,000 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม (0) และกลุ่มที่เสริมด้วยเซลล์ของ *C. butyricum* ความเข้มข้น 100, 200 และ 500 ppm ผสมอาหารติดต่อกันเป็นเวลา 7 วันและหยุดการเสริม 14 วัน

(กลุ่มควบคุมที่แช่ใน LHM เจือจาง 1:20,000 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง มีอัตรารอด 100% ไม่ได้แสดงผลไว้ในรูป)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 9 แสดงผล Relative Percent Survival หลังเหนี่ยวนำด้วย (*V. parahaemolyticus* และ YHV), bactericidin titer, % phagocytosis และ phagocytic index ของกุ้งกุลาดำกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่เสริมด้วยด้วยเซลล์ของ *C. butyricum* ความเข้มข้น 100, 200 และ 500 ppm ติดต่อกัน7 วัน และหลังจากหยุดการเสริมเป็นเวลา 7 และ 14 วัน

Treatment	% RPS		Bactericidin	%	Phagocytic
(ppm)	Vibrio	YHV	titer	Phagocytosis	index
Feed 7 days					
Control	ND	ND	640	15.00±3.20^{a}	2.29±0.64^{a}
100	ND	ND	640	15.05±0.93^{a}	2.60±0.15^{a}
200	ND	ND	1280	19.50±0.85^{b}	1.92±0.14^{a}
500	ND	ND	1280	23.98±0.93^{C}	2.22±0.12^{a}
Stop feeding 7 Days					
Control	0	0	640	17.09±0.65^{a}	1.83±0.26^{a}
100	-15.79	57.15	160	9.82±2.63^{b}	1.54±0.21^{a}
200	-15.79	14.29	160	14.04±1.46^{a}	1.56±0.21^{a}
500	15.79	0	160	8.83±0.27^{b}	2.17±0.47^{a}
Stop feeding 14 Days					
Control	0	0	160	14.46±0.65^{a}	1.46±0.09^{a}
100	-3.58	-85.71	160	14.46±1.22^{a}	1.41±0.03^{ab}
200	10.71	-35.70	320	13.17±2.52^{a}	1.29±0.09^{b}
500	7.14	-28.56	320	10.03±0.65^{a}	1.47±0.01^{a}

4.4 การทดสอบเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารกระตุ้น IE-04 และเซลล์ของ *C. butyricum* ต่อการเพิ่มภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำเป็นเวลา 30 วัน

ผลการทดสอบหลังการเสริมด้วยสารกระตุ้น IE-04 และเซลล์ของ *C. butyricum* ความเข้มข้น 100 ppm ติดต่อกัน 30 วัน และหลังหยุดให้การเสริม 7 วัน

4.4.1 การทดสอบความต้านทานต่อการเกิดโรคติดเชื้อแบคทีเรีย

หลังการเสริมด้วยสารกระตุ้น IE-04 และเซลล์ของ *C. butyricum* ติดต่อกัน 30 วัน และเหนี่ยวนำโดยการแช่ ด้วย *V. harveyi* ความเข้มข้น $3.4x10^{6}$ CFU/ml เป็นเวลา 7 วัน กลุ่มที่เสริมด้วยสารกระตุ้นมีอัตราการตายช้ากว่ากลุ่มควบคุม (รูปที่ 16) แต่อัตรารอดของทุกกลุ่มไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) (กลุ่มควบคุม กลุ่มที่เสริมด้วย IE-04 และเซลล์ของ *C. butyricum* เท่ากับ 27.5, 55.0 และ 47.50% ตามลำดับ) โดยมีค่า RPS เท่ากับ 37.93 และ 27.59% ตามลำดับ (ตารางที่ 10)

หลังหยุดการเสริม 7 วัน และเหนี่ยวนำโดยการแช่ด้วย *V. harveyi* ความเข้มข้น $3.0x10^{4}$ CFU/ml เป็นเวลา 7 วัน พบว่ากลุ่มที่เสริมด้วยสารกระตุ้น IE-04 มีการตายเกิดขึ้นเร็วกว่าในกลุ่มอื่น แต่อัตรารอดของแต่ละกลุ่มไม่ แตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) (กลุ่มควบคุม, กลุ่มที่เสริมด้วยสารกระตุ้น IE-04 และกลุ่มที่เสริมด้วยเซลล์ของ *C. butyricum* มีอัตรารอดเท่ากับ 7.5, 7.5 และ 5.0% ตามลำดับ) โดยมีค่า RPS เท่ากับ 0 และ 2.7% ตามลำดับ (รูปที่ 17 และตารางที่ 10)

การเสริมด้วยสารกระตุ้น IE-04 และ *C. butyricum* ติดต่อกัน 30 วัน จะช่วยเพิ่มความด้านทานต่อการติดเชื้อ *V. harveyi* โดยกลุ่มที่ได้รับการเสริมด้วยสารกระตุ้น IE-04 ช่วยเพิ่มความด้านทานได้ดีกว่าเซลล์ของ *C. butyricum*

ตัวอย่างกุ้งตายหลังการเหนี่ยวนำด้วย *V. harveyi* เมื่อแยกเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TCBS และทดสอบสมบัติทางชีวเคมี พบว่าเป็น *V. harveyi* (ตารางที่ 13) และพบการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพ จากการติดเชื้อแบคทีเรีย (รูปที่ 28)

4.4.2 การทดสอบความต้านทานต่อการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

หลังการเสริมด้วยสารกระตุ้น IE-04 และเซลล์ของ *C. butyricum* ติดต่อกัน 30 วัน และเหนี่ยวนำด้วยไวรัสหัวเหลือง พบว่า กลุ่มที่เสริมด้วยสารกระตุ้นมีอัตราการตายช้ากว่ากลุ่มควบคุม (รูปที่ 18) โดยอัตรารอดวันที่ 10 ของการทดสอบของทุกกลุ่มไม่แตกต่างกันทางสถิติ

($P<0.05$) (กลุ่มควบคุม, กลุ่มที่เสริมด้วยสารกระตุ้น IE-04 และกลุ่มที่เสริมด้วยเซลล์ของ *C. butyricum* มีอัตรารอดเท่ากับ 37.5, 47.5 และ 50% ตามลำดับ) โดยมีค่า RPS เท่ากับ 16 และ 20% ตามลำดับ (ตารางที่ 10)

หลังหยุดการเสริม 7 วัน และเหนี่ยวนำด้วยเชื้อไวรัสหัวเหลืองกลุ่มที่ได้รับการเสริมมีอัตราการตายช้ากว่ากลุ่มควบคุม (รูปที่ 19) โดยในวันที่ 7 ของการทดสอบอัตรารอดของทุกกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) (กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับสารกระตุ้น IE-04 และเซลล์ของ *C. butyricum* มีอัตรารอดเท่ากับ 56.67, 76.67 และ 63.33% ตามลำดับ) และมีค่า RPS เท่ากับ 46.18 และ 15.37% ตามลำดับ (ตารางที่ 10)

การเสริมด้วยสารกระตุ้น IE-04 และเซลล์ของ *C. butyricum* จะช่วยเพิ่มความต้านทานต่อการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองได้หลังให้การเสริม 30 วัน และความต้านทานยังคงอยู่ 7 วันหลังหยุดการเสริม โดยพบว่าการเสริมด้วยสารกระตุ้น IE-04 ให้ผลต่อความต้านทานเชื้อไวรัสหัวเหลืองดีกว่าเซลล์ของ *C. butyricum*

ตัวอย่างกุ้งที่ตายหลังการเหนี่ยวนำ พบการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพแสดงวการติดเชื้อ YHV (รูปที่ 29)

4.4.3 การตรวจสอบระดับ bactericidin

หลังการเสริมด้วยสารกระตุ้น IE-04 และเซลล์ของ *C. butyricum* ติดต่อกัน 30 วัน ระดับ bactericidin ของกลุ่มที่เสริมด้วย IE-04 สูงกว่ากลุ่มควบคุม 4 เท่า (5120) ส่วนกลุ่มที่เสริมด้วยเซลล์ของ *C. butyricum* มีระดับเท่ากับกลุ่มควบคุม คือ 1280

หลังหยุดการเสริม 7 วัน ระดับ bactericidin ของกลุ่มที่เสริมด้วยสารกระตุ้น IE-04 และเซลล์ของ *C. butyricum* มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุม 4 เท่า (ตารางที่ 10)

การเสริมด้วยสารกระตุ้น IE-04 และเซลล์ของ *C. butyricum* มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของระดับ bactericidin ในกุ้งกุลาดำ

4.4.4 การตรวจสอบ % phagocytosis และ phagocytic index

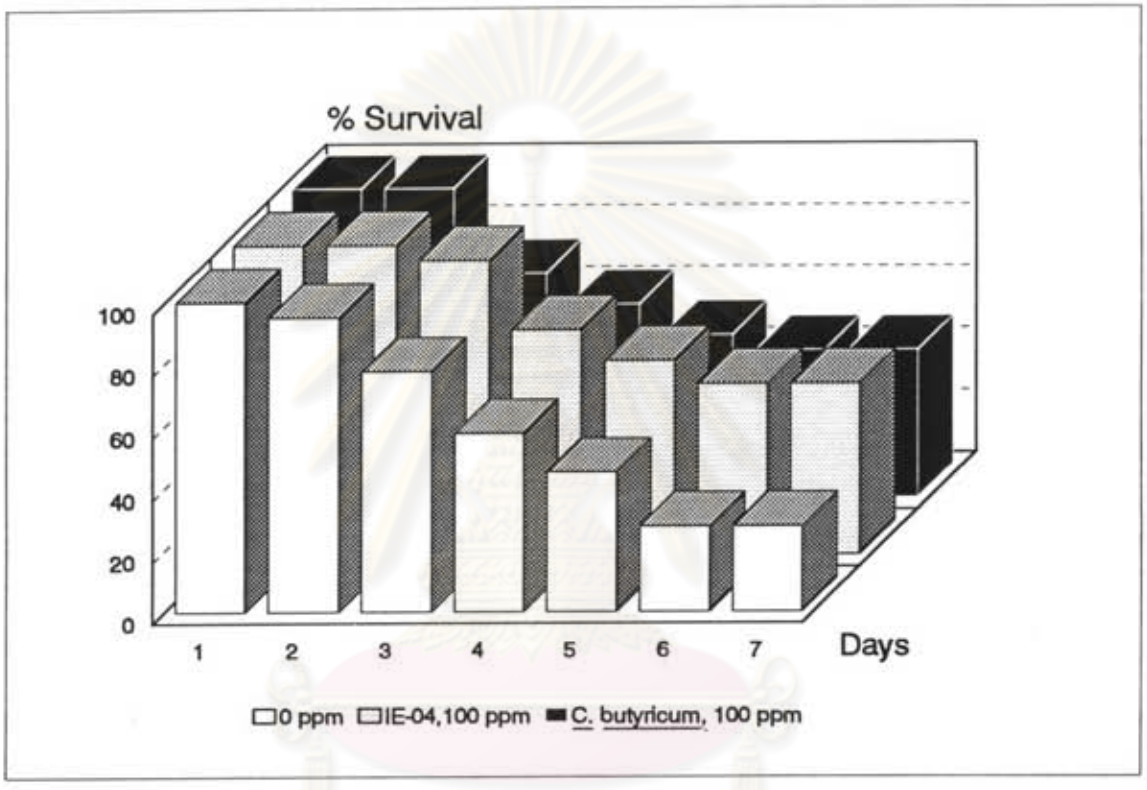
% phagocytosis และ phagocytic index ของกลุ่มที่เสริมด้วยสารกระตุ้น IE-04 และเซลล์ของ *C. butyricum* เป็นเวลา 30 วัน และกลุ่มควบคุมมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$)

หลังหยุดการเสริมด้วยสารกระตุ้น 7 วัน กลุ่มที่เสริมด้วย IE-04 มีค่า % phagocytosis และ phagocytic index ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ($P<0.05$) ส่วนกลุ่มที่เสริมด้วยเซลล์ของ *C. butyricum* มีค่า %phagocytosis และ phagocytic index สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 10)

การเสริมด้วยเซลล์ของ *C. butyricum* สามารถเพิ่มกิจกรรม phagocytosis ได้ โดยเพิ่มการทำงานของเซลล์ และจำนวนอนุภาคสิ่งแปลกปลอมที่ถูกจับกินต่อเซลล์ ในขณะที่การเสริมด้วยสารกระตุ้น IE-04 ไม่พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของกิจกรรม phagocytosis

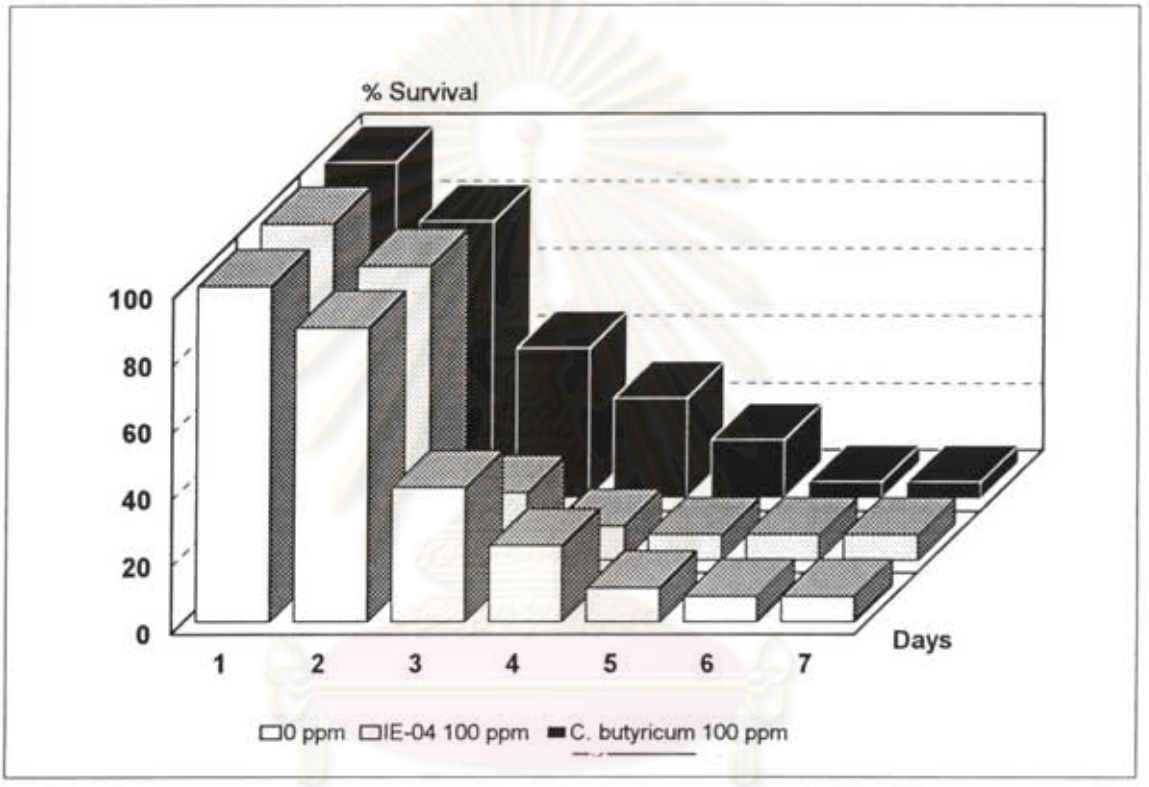
การเสริมภูมิคุ้มกันด้วยสารกระตุ้น IE-04 ความเข้มข้น 100 ppm เป็นเวลา 30 วัน จะช่วยเพิ่มความต้านทานต่อการติดเชื้อ *V. harveyi* และ YHV ได้นาน 7 วันหลังหยุดการกระตุ้น โดยพบว่ามีระดับของ bactericidin เพิ่มขึ้น แต่ไม่พบการเพิ่มขึ้นของการเกิด phagocytosis ส่วนการเสริมด้วยเซลล์ของ *C. butyricum* จะช่วยเพิ่มความต้านทานต่อการติดเชื้อ *V. harveyi* ได้น้อยกว่า และไม่พบว่าช่วยเพิ่มความต้านทานหลังหยุดการเสริม 7 วัน ส่วนความต้านทานต่อไวรัส YHV มีเพิ่มขึ้นและอยู่ได้หลังหยุดการเสริม 7 วัน โดยสามารถเพิ่มความต้านทานได้น้อยกว่าการเสริมด้วยสารกระตุ้น IE-04 แต่พบว่ามีการเพิ่มขึ้นทั้งระดับของ bactericidin และการเกิด phagocytosis สำหรับคุณภาพน้ำตลอดการทดลองในทุกกลุ่ม พบว่าไม่มีความแตกต่างกันและอยู่ในพิสัยที่ไม่เป็นพิษต่อกุ้งที่ทดลอง (ตารางที่ 11)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



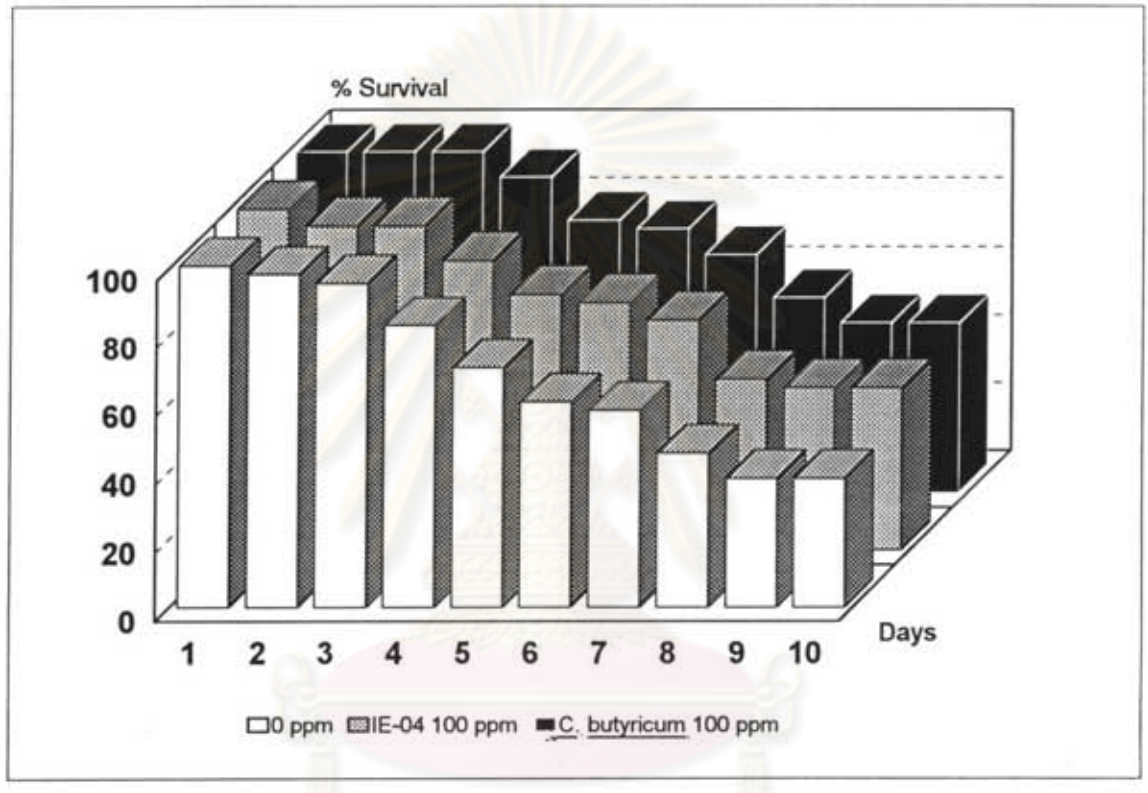
รูปที่ 16 อัตรารอดของกุ้งกุลาดำหลังเหนี่ยวนำโดยการแช่ด้วย *V. harveyi* ความเข้มข้น 3.4 x10^6 CFU/ml เป็นเวลา 7 วัน เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม (0) กลุ่มที่เสริมด้วยผลิตภัณฑ์ IE-04 ความเข้มข้น 100 ppm และกลุ่มที่เสริมด้วยเซลล์ของ *C. butyricum* ความเข้มข้น 100 ppm ผสมอาหารติดต่อกัน 30วัน
(กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อ มีอัตรารอด 100% ไม่ได้แสดงผลไว้ในรูป)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



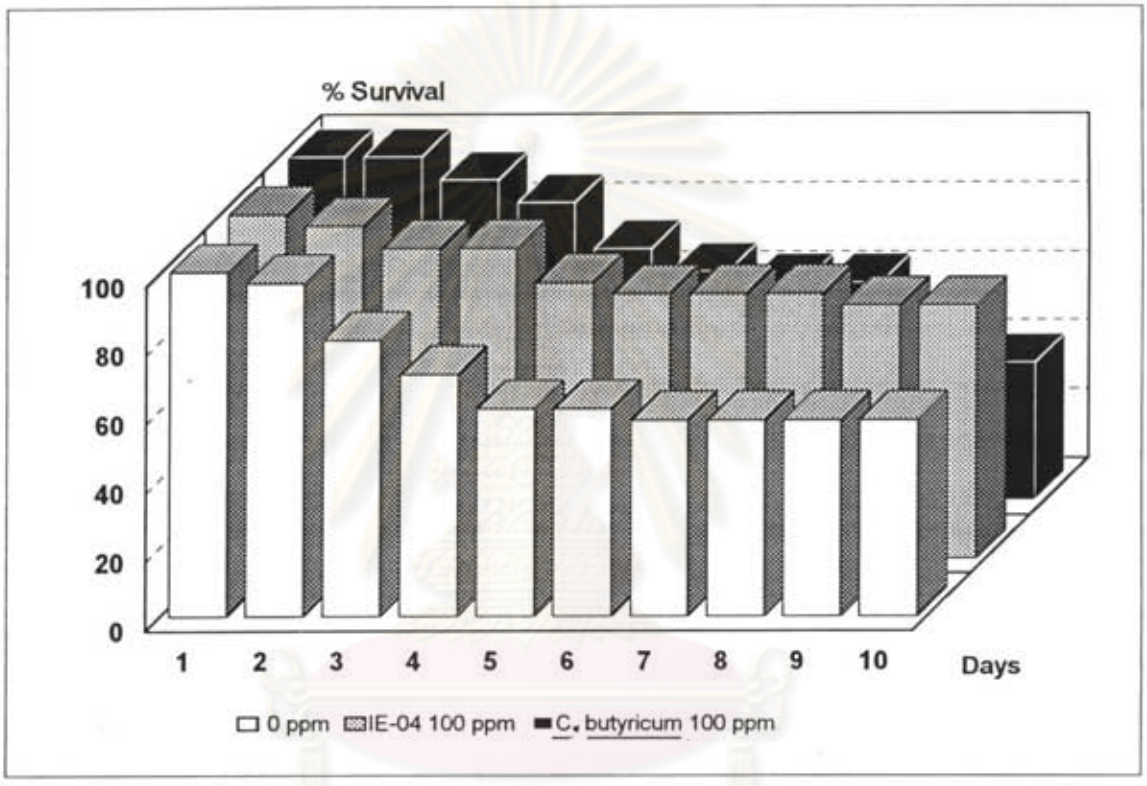
รูปที่ 17 อัตรารอดของกุ้งกุลาดำหลังเหนี่ยวนำโดยการแช่ด้วย *V. harveyi* ความเข้มข้น 3.0×10^4 CFU/ml เป็นเวลา 7 วัน เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม (0) กลุ่มที่เสริมด้วยผลิตภัณฑ์ IE-04 ความเข้มข้น 100 ppm และกลุ่มที่เสริมด้วยเซลล์ของ *C. butyricum* ความเข้มข้น 100 ppm ผสมอาหารติดต่อกัน 30วัน และหยุดการเสริม 7 วัน (กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อ มีอัตรารอด 100% ไม่ได้แสดงผลไว้ในรูป)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 18 อัตรารอดของกุ้งกุลาดำหลังเหนี่ยวนำโดยการแช่ด้วยเชื้อไวรัสหัวเหลือง (YHV) ความเข้มข้น 1:20,000 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม (0) กลุ่มที่เสริมด้วยผลิตภัณฑ์ IE-04 ความเข้มข้น 100 ppm และกลุ่มที่เสริมด้วยเซลล์ของ *C. butyricum* ความเข้มข้น 100 ppm ผสมอาหารติดต่อกัน 30 วัน
(กลุ่มควบคุมที่แช่ใน LHM เจือจาง 1:20,000 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง มีอัตรารอด 100% ไม่ได้แสดงผลไว้ในรูป)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 19 อัตรารอดของกุ้งกุลาดำหลังเหนี่ยวนำโดยการแช่ด้วยเชื้อไวรัสหัวเหลือง (YHV) ความเข้มข้น 1:20,000 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม (0) กลุ่มที่เสริมด้วยผลิตภัณฑ์ IE-04 ความเข้มข้น 100 ppm และกลุ่มที่เสริมด้วยเซลล์ของ *C. butyricum* ความเข้มข้น 100 ppm ผสมอาหารติดต่อกัน 30 วัน และหยุดการเสริม 7 วัน

(กลุ่มควบคุมที่แช่ใน LHM เจือจาง 1:20,000 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง มีอัตรารอด 100% ไม่ได้แสดงผลไว้ในรูป)

ตารางที่ 10 แสดงผล Relative Percent Survival (หลังเหนี่ยวนำด้วย *V. harveyi* และ YHV), bactericidin titer, % phagocytosis และ phagocytic index ของกุ้งกุลาดำกลุ่มควบคุม กลุ่มที่เสริมด้วยสารกระตุ้นทางการค้า IE-04 ความเข้มข้น 100 ppm และเซลล์ของ *C. butyricum* ความเข้มข้น 100 ppm ติดต่อกันเป็นเวลา 30 วัน และหลังจากหยุดการเสริมเป็นเวลา 7 วัน

Treatment (ppm)	% RPS		Bactericidin titer	% phagocytosis	phagocytic index
	Vibrio	YHV			
Feed 30 days					
Control	0	0	1280	6.22±1.17[a]	1.88+0.29[a]
IE-04 100	37.93	16	5120	6.00+0.59[a]	2.03+0.25[a]
C. butyricum 100	27.59	20	1280	5.17+0.49[a]	1.49+0.05[a]
Stop feeding 7 days					
Control	0	0	2560	7.50+0.72[a]	1.85+0.19[a]
IE-04 100	0	46.18	10240	7.38+1.87[a]	2.63+0.46[ab]
C. butyricum 100	-2.70	15.37	10240	13.84+3.31[b]	3.22+0.75[b]

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11 แสดงผลคุณภาพน้ำตลอดการเลี้ยงด้วยอาหารเสริมสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน IE-04 และเซลล์ของ *C. butyricum* ติดต่อกัน 30 วัน

Time (day)	Control				IE-04 100 ppm				*C. butyricum* 100 ppm			
	pH	Ammonia (ppm)	Nitrite (ppm)	Nitrate (ppm)	pH	Ammonia (ppm)	Nitrite (ppm)	Nitrate (ppm)	pH	Ammonia (ppm)	Nitrite (ppm)	Nitrate (ppm)
7	7.98	0.402	0.013	7.12	7.94	0.274	0.036	6.88	8.00	0.249	0.015	6.55
14	7.94	0.410	0.055	6.25	7.89	0.418	0.121	6.30	7.92	0.445	0.049	6.48
21	7.84	0.239	0.051	8.79	7.97	0.405	0.138	8.35	7.94	0.424	0.241	8.60
28	8.29	0.196	0.165	7.94	8.12	0.236	0.161	8.91	8.17	0.173	0.131	8.89

หมายเหตุ ความเค็ม = 10 - 17 ppt

ความเป็นด่าง = 135-154 ppm

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.5 การทดสอบการเสริมภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ ด้วยสารกระตุ้น IE-04, เซลล์ของ *C. butyricum* และสารผสมระหว่างสารกระตุ้น IE-04, และเซลล์ของ *C. butyricum*

ผลการทดสอบหลังการเสริมด้วยสารกระตุ้น IE-04 ความเข้มข้น 100 ppm เซลล์ของ *C. butyricum* ความเข้มข้น 100 ppm และสารผสมของสารกระตุ้น IE-04 และเซลล์ของ *C. butyricum* ในอัตราส่วน 1:1 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ความเข้มข้น 100 และ 200 ppm ติดต่อกัน 7 วัน และหลังหยุดการเสริม 7 และ 14 วัน

4.5.1 การทดสอบความต้านทานต่อการติดเชื้อแบคทีเรีย

หลังการเสริมด้วยสารกระตุ้น 7 วัน และเหนี่ยวนำโดยการแช่ด้วย *V. harveyi* ความเข้มข้น $6.9x10^5$ CFU/ml พบว่ากลุ่มที่ให้สารผสม (mix) ความเข้มข้น 100 และ 200 ppm มีอัตราการตายช้าที่สุดตามลำดับ อัตรารอดของทุกกลุ่มไม่มีความแตกต่างแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) (กลุ่มควบคุม, IE-04, *C. butyricum* , mix 100 และ mix 200 เท่ากับ 47.5, 45.0, 47.5, 65.0 และ 50.0% ตามลำดับ) โดยมีค่า RPS เท่ากับ -4.76, 0, 26.32 และ 4.76% ตามลำดับ (รูปที่ 20 และตารางที่ 12)

หลังหยุดการเสริม 7 วัน และเหนี่ยวนำด้วย *V. harveyi* ความเข้มข้น $8.8x10^5$ CFU/ml กลุ่มที่เสริมด้วยสารผสมความเข้มข้น 200 ppm มีอัตราการตายของกุ้งช้าที่สุด แต่อัตรารอดของทุกกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) (กลุ่มควบคุม, IE-04, *C. butyricum*, mix 100 และ mix 200 มีค่าเท่ากับ 62.50, 52.50, 65.0, 45 และ 80% ตามลำดับ) ค่า RPS เท่ากับ -26.67, 6.67, -46.67 และ 46.67% ตามลำดับ (รูปที่ 21) (ตารางที่ 12)

หลังหยุดการเสริม 14 วันและเหนี่ยวนำด้วย *V. harveyi* ความเข้มข้น$5.6x10^5$ CFU/ml อัตรารอดของทุกกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) (กลุ่มควบคุม, IE-04, *C. butyricum*, mix 100 และ mix 200 มีค่าเท่ากับ 80, 55, 60, 65 และ 80% ตามลำดับ) โดยมีค่า RPS เท่ากับ -125, -100, -75 และ 0% ตามลำดับ (รูปที่ 22, ตารางที่12)

กลุ่มที่เสริมด้วยสารผสมความเข้มข้น 100 ppm จะช่วยเพิ่มความต้านทานต่อ *V. harveyi* ได้ในช่วงที่ได้รับการเสริม โดยไม่มีผลหลังหยุดให้สารกระตุ้น ส่วนสารผสมที่ความเข้มข้น 200 ppm จะช่วยเพิ่มความต้านทานต่อการติดเชื้อ *V. harveyi* ได้หลังจากการเสริม 7 วัน ส่วนกลุ่มที่เสริมด้วยสารกระตุ้น IE-04 หรือเซลล์ของ *C. butyricum* เพียงอย่างเดียว ไม่พบการเพิ่มความต้านทานต่อการติดเชื้อ *V. harveyi*

ตัวอย่างกุ้งที่ตายหลังเหนี่ยวนำด้วย *V. harveyi* เมื่อแยกเชื้อจากตับและเลือดบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TCBS และทดสอบสมบัติทางชีวเคมี พบว่าเป็น *V. harveyi* (ตารางที่ 13) และพบการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพเนื่องจากติดเชื้อแบคทีเรีย (รูปที่ 28)

4.5.2 การทดสอบความต้านทานต่อการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

หลังการเสริมด้วยสารกระตุ้น 7 วัน และเหนี่ยวนำด้วยเชื้อไวรัสหัวเหลือง อัตรารอดของทุกกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) (กลุ่มควบคุม, IE-04, *C. butyricum*, mix 100 และ mix 200 เท่ากับ 7.5, 2.5, 37.5, 30 และ 25% ตามลำดับ) แต่อัตราการตายของกลุ่มที่เสริมด้วยเซลล์ของ *C. butyricum* หรือสารผสมจะช้ากว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสาร IE-04 เพียงอย่างเดียวโดยมีค่า RPS วันที่ 7 ของการทดสอบ เท่ากับ -5.4, 32.43, 24.32 และ 18.92% ตามลำดับ (รูปที่ 23และตารางที่ 12)

หลังหยุดการเสริม 7 วัน อัตรารอดของทุกกลุ่มไม่แตกต่างกัน ($P<0.05$) แต่กลุ่มที่เสริมด้วยเซลล์ของ *C. butyricum* เพียงอย่างเดียวมีอัตราการตายช้าที่สุด ตามด้วยกลุ่มที่ได้รับสารกระตุ้น IE-04 เพียงอย่างเดียว (กลุ่มควบคุม, IE-04, *C. butyricum*, mix 100 และ mix 200 เท่ากับ 35, 60, 70, 47.50 และ 40% ตามลำดับ) โดยมีค่า RPS เท่ากับ 38.46, 53.85, 19.23 และ 7.69% ตามลำดับ (รูปที่ 24)

หลังหยุดการเสริม 14 วัน และเหนี่ยวนำด้วยเชื้อไวรัสหัวเหลือง อัตรารอดของทุกกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) (กลุ่มควบคุม, IE-04*C. butyricum*, mix 100 และ mix 200 เท่ากับ 45.0, 60.0, 35.0, 55.0, และ 25.0% ตามลำดับ) โดยมีค่า RPS วันที่ 11 ของการทดสอบเท่ากับ 27.27, -18.18, 18.18 และ -36.36% ตามลำดับ (รูปที่ 25 และตารางที่ 12)

การเสริมภูมิคุ้มกันด้วยเซลล์ของ *C. butyricum* ติดต่อกัน 7 วัน จะช่วยเพิ่มความต้านทานต่อการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองและคงอยู่หลังหยุดการเสริม 7 วัน ส่วนกลุ่มที่เสริมด้วยสารผสมความเข้มข้น 100 และ 200 ppm จะเพิ่มความต้านทานได้เล็กน้อยน้อยและอยู่ได้นาน 7 วันหลังหยุดให้การเสริม สำหรับการให้สารกระตุ้น IE-04 จะเพิ่มความต้านทานได้หลังหยุดให้การเสริม 7-14 วัน

ตัวอย่างกุ้งที่ตายหลังการเหนี่ยวนำด้วยไวรัสหัวเหลือง พบการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพ แสดงการติดเชื้อ YHV (รูปที่ 29)

4.5.3 การตรวจสอบระดับ bactericidin

หลังให้สารกระตุ้นติดต่อกัน 7 วัน ระดับ bactericidin ของทุกกลุ่มต่ำกว่ากลุ่มควบคุม 2-4 เท่า แต่หลังหยุดให้สารกระตุ้น 7 วัน ระดับ bactericidin ของกลุ่มที่เสริมด้วยสารกระตุ้น IE-

04 และสารผสมความเข้มข้น 100 ppm มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุม 4 เท่า ส่วนกลุ่มที่เสริมด้วยเซลล์ของ *C. butyricum* และสารผสม 200 ppm มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุม 2 เท่า (ตารางที่ 12)

4.5.4 การตรวจสอบ % phagocytosis และ phagocytic index

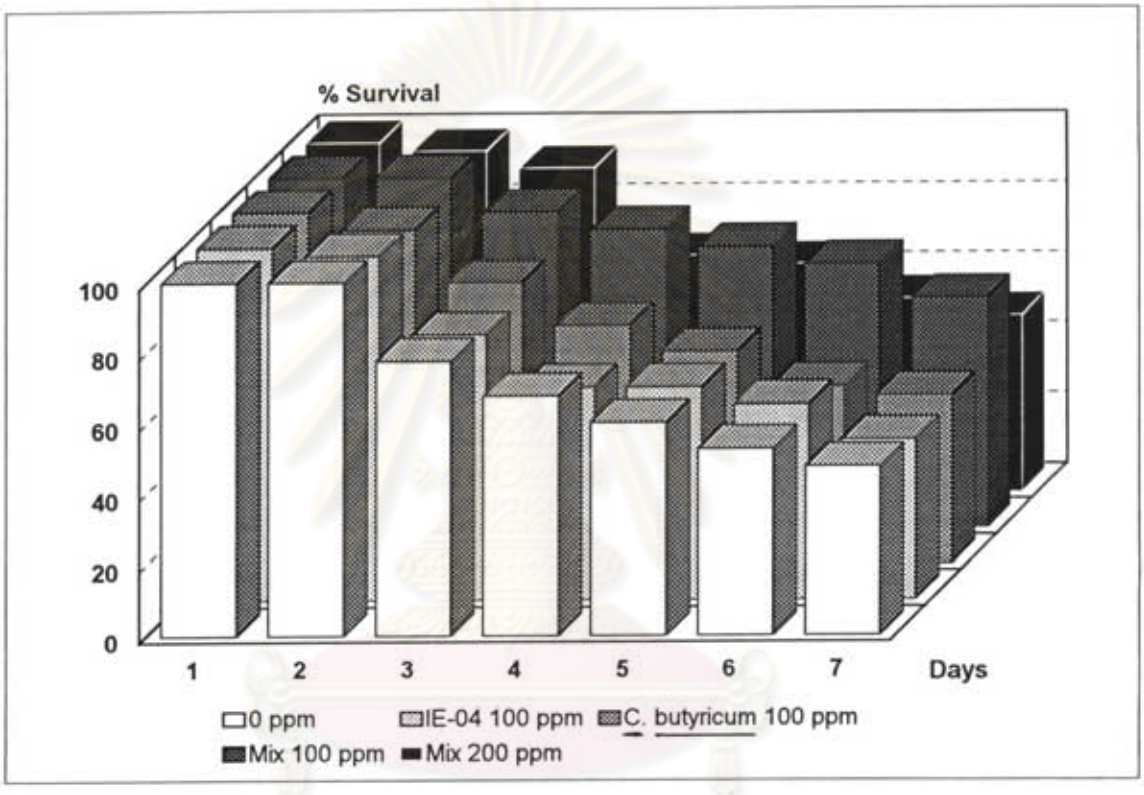
กลุ่มที่ได้รับเซลล์ของ *C. butyricum* เพียงอย่างเดียว มี %phagocytosis สูงกว่ากลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$) ของ phagocytic index ในทุกกลุ่มการทดลอง ($P<0.05$)

หลังจากหยุดการเสริม 7 วัน กิจกรรม phagocytosis ของกลุ่มที่ได้รับสารกระตุ้น IE-04 มีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) และไม่พบความแตกต่างของ phagocytic index ในทุกกลุ่มการทดลอง ($P<0.05$)

หลังหยุดการเสริม 14 วัน กลุ่มที่เสริมด้วย IE-04 และกลุ่มที่ได้รับสารผสมความเข้มข้น 200 ppm มีค่า %phagocytosis สูงกว่ากลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ส่วนกลุ่มอื่นไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมและพบว่าค่า phagocytic index ของทุกกลุ่มไม่แตกต่างกัน ($P<0.05$) (ตารางที่ 12)

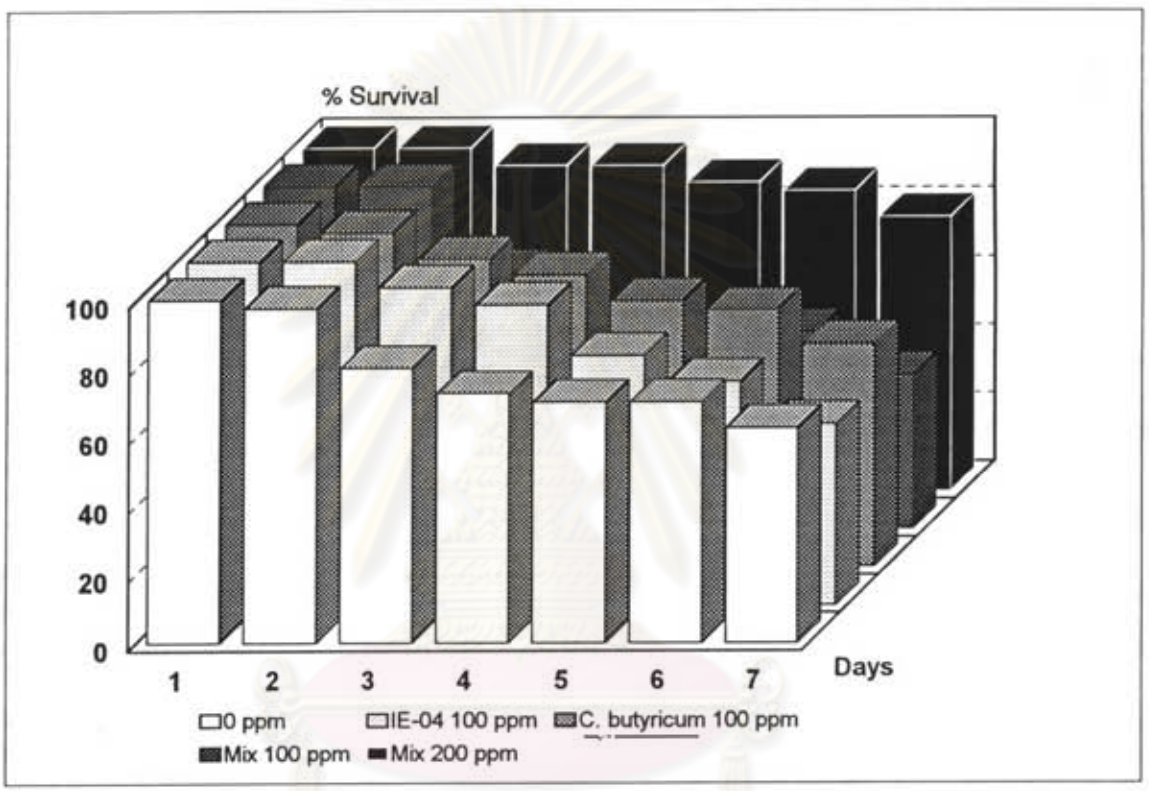
การเสริมภูมิคุ้มกันด้วยสารผสมระหว่างสารกระตุ้น IE-04 กับเซลล์ของ *C. butyricum* ช่วยทำให้ความต้านทานต่อเชื้อ *V. harveyi* เพิ่มขึ้น แต่ไม่ช่วยเพิ่มความต้านทานต่อการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง รวมทั้งไม่ช่วยส่งเสริมให้มีการเพิ่มขึ้นของกิจกรรม phagocytosis แต่ช่วยเพิ่มระดับของ bactericidin ส่วนการให้เซลล์ของ *C. butyricum* จะช่วยเพิ่มความต้านทานต่อไวรัสหัวเหลือง โดยไม่มีผลต่อการเพิ่มความต้านทานต่อเชื้อ *V. harveyi* และยังพบว่ามีส่วนเพิ่มกิจกรรม phagocytosis โดยไม่ช่วยส่งเสริมการเพิ่มของ bactericidin สำหรับการให้สารกระตุ้น IE-04 ช่วยเพิ่มความต้านทานต่อการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองได้ แต่ไม่มีผลต่อการเพิ่มความต้านทานต่อ *V. harveyi* โดยพบว่ามีส่วนช่วยเพิ่มระดับของ bactericidin แต่ไม่มีผลต่อการเกิด phagocytosis

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



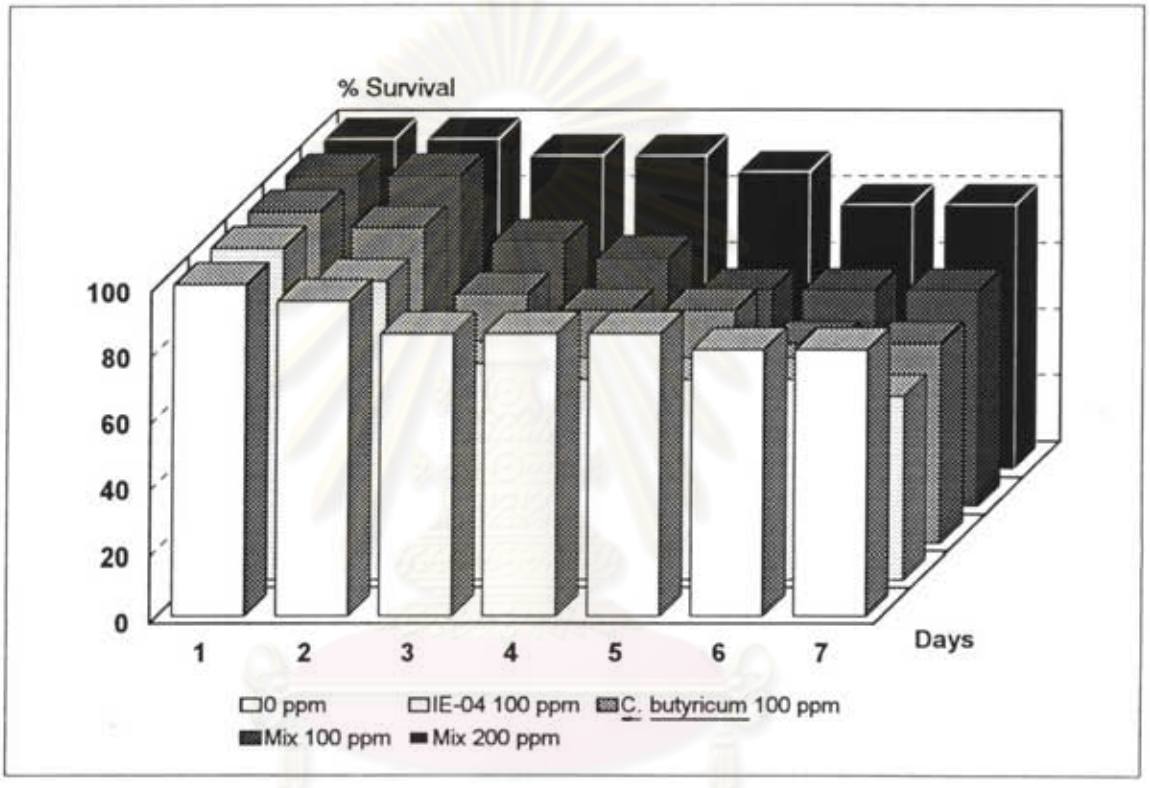
รูปที่ 20 อัตรารอดของกุ้งกุลาดำหลังเหนี่ยวนำโดยการแช่ด้วย *V. harveyi* ความเข้มข้น 6.9×10^5 CFU/ml เป็นเวลา 7 วัน เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม (0) กลุ่มที่เสริมด้วยผลิตภัณฑ์ IE-04 ความเข้มข้น 100 ppm กลุ่มที่เสริมด้วยเซลล์ของ *C. butyricum* ความเข้มข้น 100 ppm และกลุ่มที่เสริมด้วยสารผสมระหว่างผลิตภัณฑ์ IE-04 และเซลล์ของ *C. butyricum* ในอัตราส่วน 1:1 ความเข้มข้น 100 และ 200 ppm (mix 100, mix 200) ผสมอาหารติดต่อกัน 7 วัน
(กลุ่มควบคุมไม่ได้รับเชื้อ มีอัตรารอด 100% ไม่ได้แสดงผลไว้ในรูป)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



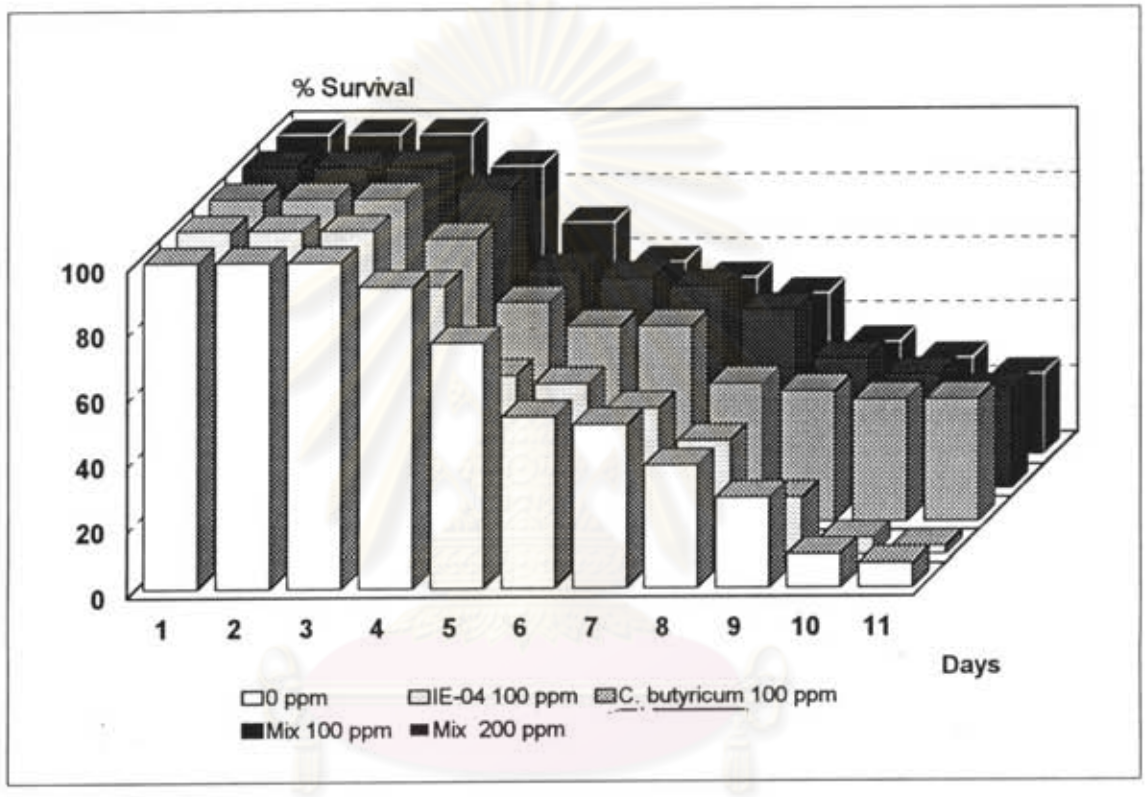
รูปที่ 21 อัตรารอดของกุ้งกุลาดำหลังเหนี่ยวนำโดยการแช่ด้วย *V. harveyi* ความเข้มข้น 8.8×10^5 CFU/ml เป็นเวลา 7 วัน เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม (0) กลุ่มที่เสริมด้วยผลิตภัณฑ์ IE-04 ความเข้มข้น 100 ppm กลุ่มที่เสริมด้วยเซลล์ของ *C. butyricum* ความเข้มข้น 100 ppm และกลุ่มที่เสริมด้วยสารผสมระหว่างผลิตภัณฑ์ IE-04 และเซลล์ของ *C. butyricum* ในอัตราส่วน 1:1 ความเข้มข้น 100 และ 200 ppm (mix 100, mix 200) ผสมอาหารติดต่อกัน 7 วัน และหยุดการเสริม 7 วัน
(กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อ มีอัตรารอด 100% ไม่ได้แสดงผลไว้ในรูป)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



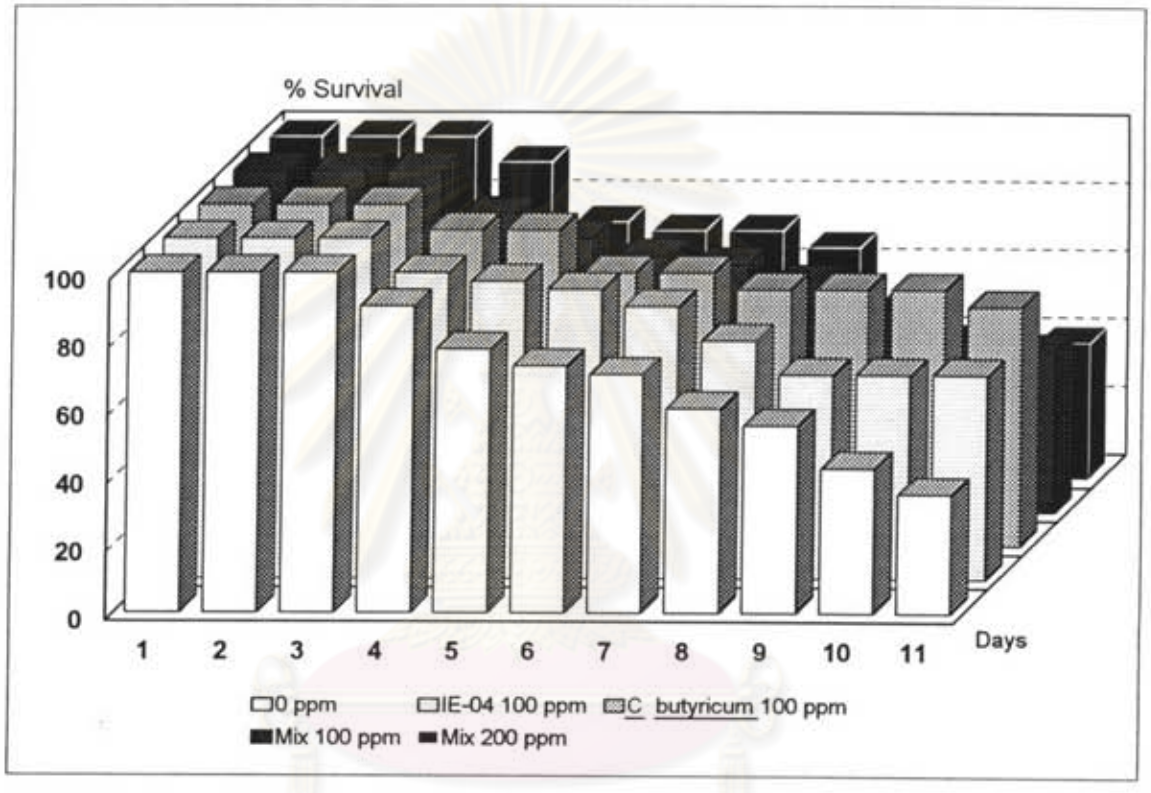
รูปที่ 22 อัตรารอดของกุ้งกุลาดำหลังเหนี่ยวนำโดยการแช่ด้วย *V. harveyi* ความเข้มข้น $5.6x10^5$ CFU/ml เป็นเวลา 7 วัน เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม (0) กลุ่มที่เสริมด้วยผลิตภัณฑ์ IE-04 ความเข้มข้น 100 ppm กลุ่มที่เสริมด้วยเซลล์ของ *C. butyricum* ความเข้มข้น 100 ppm และกลุ่มที่เสริมด้วยสารผสมระหว่างผลิตภัณฑ์ IE-04 และเซลล์ของ *C. butyricum* ในอัตราส่วน 1:1 ความเข้มข้น 100 และ 200 ppm (mix 100, mix 200) ผสมอาหารติดต่อกัน 7 วัน และหยุดการเสริม 14 วัน
(กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อ มีอัตรารอด 100% ไม่ได้แสดงผลไว้ในรูป)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

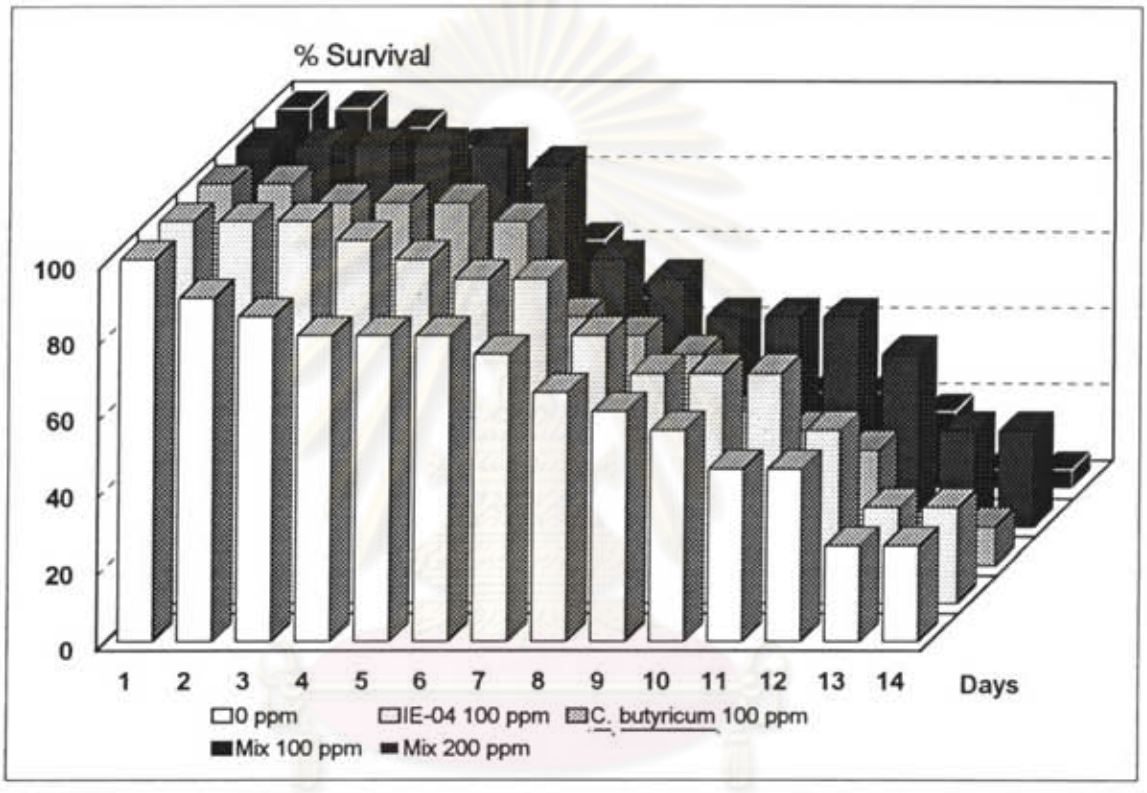


รูปที่ 23 อัตรารอดของกุ้งกุลาดำหลังเหนี่ยวนำโดยการแช่ด้วยเชื้อไวรัสหัวเหลือง (YHV) ความเข้มข้น 1:20,000 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม (0) กลุ่มที่เสริมด้วยผลิตภัณฑ์ IE-04 ความเข้มข้น 100 ppm กลุ่มที่เสริมด้วยเซลล์ของ *C. butyricum* ความเข้มข้น 100 ppm และกลุ่มที่เสริมด้วยสารผสมระหว่างผลิตภัณฑ์ IE-04 และเซลล์ของ *C. butyricum* ในอัตราส่วน 1:1 ความเข้มข้น 100 และ 200 ppm (mix 100, mix 200) ผสมอาหารติดต่อกัน 7 วัน

(กลุ่มควบคุมที่แต่แช่ใน LHM เจือจาง 1:20,000 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง มีอัตรารอด 100% ไม่ได้แสดงผลไว้ในรูป)



รูปที่ 24 อัตรารอดของกุ้งกุลาดำหลังเหนี่ยวนำโดยการแช่ด้วยเชื้อไวรัสหัวเหลือง (YHV)ความเข้มข้น 1:20,000 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม (0) กลุ่มที่เสริมด้วยผลิตภัณฑ์ IE-04 ความเข้มข้น 100 ppm กลุ่มที่เสริมด้วยเซลล์ของ *C. butyricum* ความเข้มข้น 100 ppm และกลุ่มที่เสริมด้วยสารผสมระหว่างผลิตภัณฑ์ IE-04 และเซลล์ของ *C. butyricum* ในอัตราส่วน 1:1 ความเข้มข้น 100 และ 200 ppm (mix 100, mix 200) ผสมอาหารติดต่อกัน 7 วัน และหยุดการเสริม 7 วัน
(กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อ แต่แช่ใน LHM เจือจาง 1:20,000 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง มีอัตรารอด 100% ไม่ได้แสดงผลไว้ในรูป)



รูปที่ 25 อัตรารอดของกุ้งกุลาดำหลังเหนี่ยวนำโดยการแช่ด้วยเชื้อไวรัสหัวเหลือง (YHV) ความเข้มข้น 1:20,000 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม (0) กลุ่มที่เสริมด้วยผลิตภัณฑ์ IE-04 ความเข้มข้น 100 ppm กลุ่มที่เสริมด้วยเซลล์ของ *C. butyricum* ความเข้มข้น 100 ppm และกลุ่มที่เสริมด้วยสารผสมระหว่างผลิตภัณฑ์ IE-04 และเซลล์ของ *C. butyricum* ในอัตราส่วน 1:1 ความเข้มข้น 100 และ 200 ppm (mix 100, mix 200) ผสมอาหารติดต่อกัน 7 วัน และหยุดการเสริม 14 วัน
(กลุ่มควบคุมที่แช่ใน LHM เจือจาง 1:20,000 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง มีอัตรารอด 100% ไม่ได้แสดงผลไว้ในรูป)

ตารางที่ 12 แสดงผล Relative Percent survival หลังเหนี่ยวนำด้วย (*V. harveyi* และ YHV), Bactericidin titer, % phagocytosis และ phagocytic index ของกุ้งกุลาดำกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่เสริมด้วยสารกระตุ้น IE-04 ความเข้มข้น 100 ppm, เซลล์ของ *C. butyricum* ความเข้มข้น 100 ppm , IE-04 ผสมกับ *C. butyricum* 100 ppm, IE-04 ผสมกับ *C. butyricum* 200 ppm ติดต่อกันเป็นเวลา 7 วัน และ หลังจากหยุดการเสริม 7 และ 14 วัน

Treatment (ppm)	% RPS		Bactericidin titer	% Phagocytosis	Phagocytic index
	Vibrio	YHV			
Feed 7 days					
Control	0	0	1280	6.78±1.10^{a}	2.29±0.03^{a}
IE-04	-4.76	-10	640	8.89±0.50^{ab}	1.61±0.23^{b}
C. butyricum	0	20	320	11.17±0.41^{b}	2.04±0.27^{a}
Mix 100	26.32	25	640	9.21±3.51^{ab}	1.60±0.15^{b}
Mix 200	4.76	10	640	9.33±1.63^{ab}	1.92±0.29^{ab}
Stop feeding 7 days					
Control	0	0	80	13.22±2.17^{a}	2.59±0.49^{a}
IE-04	-26.67	38.46	320	8.38±1.14^{b}	2.14±2.56^{ab}
C. butyricum	6.67	53.85	160	11.89±0.61^{a}	2.02±0.12^{ab}
Mix 100	46.67	19.23	320	12.72±1.62^{a}	1.92±0.03^{b}
Mix 200	46.67	7.69	160	12.17±0.94^{a}	1.29±0.25^{ab}
Stop feeding 14 days					
Control	0	0		5.06±0.89^{a}	2.31±1.01^{a}
IE-04	-125	27.27	ND	7.39±1.02^{bc}	2.41±0.57^{a}
C. butyricum	-100	-18.18	ND	4.95±0.08^{a}	1.94±0.46^{a}
Mix 100	-75	18.18	ND	5.84±0.50^{ab}	1.77±0.16^{a}
Mix 200	0	-36.36	ND	7.94±0.28^{c}	2.11±0.37^{a}

ตารางที่ 13 สมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ

TEST	*V. parahaemolyticus* D003	*V. harveyi* D331	*Vibrio* sp. D006
Gram staining	Gram negative rod	Gram negative rod	Gram negative rod
Growth on TCBS	Green	Green	Green
Luminescence	-	+	-
Motility	+	+	-
Swarming	+	-	-
Pigment production	-	-	-
Oxidative-Fermentative	Fermentative	Fermentative	Fermentative
Oxidase	+	+	+
Catalase	+	+	+
Gas from glucose	-	-	-
Nitrate reduction	+	+	+
Indole	+	+	-
Voges-Proskauer	-	-	-
Citrate utilization	-	-	-
Decarboxylase of:			
Argenine	-	-	-
Lysine	+	+	+
Ornithine	+	-	-
Gelatin liquefactin	+	-	-
Growth in % NaCl			
0	-	-	-
1	+	+	+
3	+	+	+
6	+	+	+
8	+	-	-
10	-	-	-

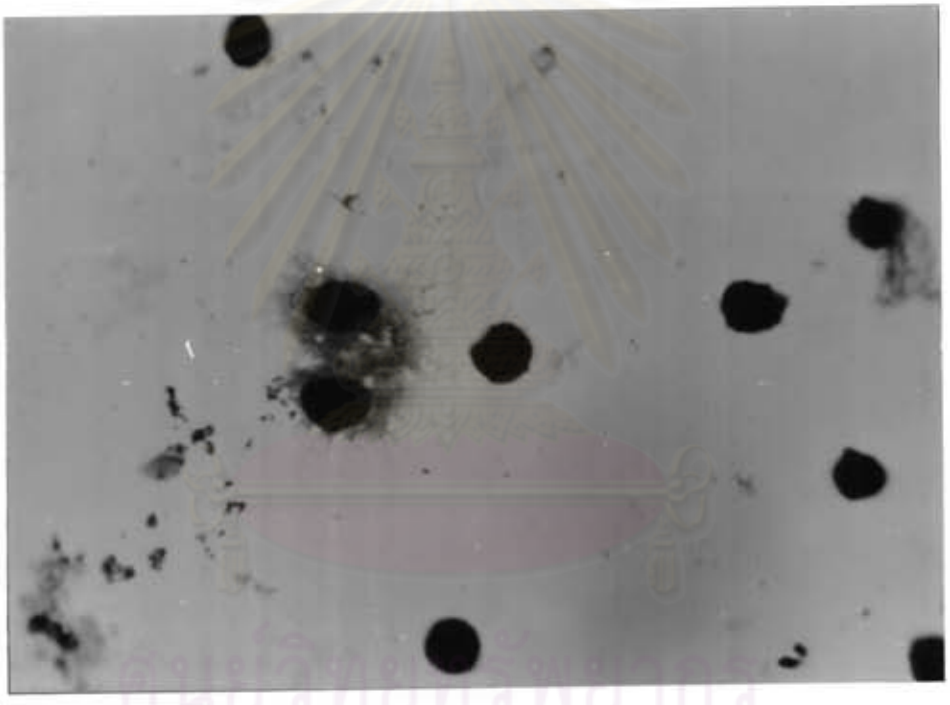
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 13 (ต่อ)

TEST	*V. parahaemolyticus* D003	*V. harveyi* D331	*Vibrio sp.* D006
Utilization of :			
Glucose	+	+	+
Lactose	-	-	-
Sucrose	-	-	-
Arabinose	-	-	-
Mannitol	+	+	+
Sensitivity to 0/129			
10 mg	+	+	+
150 mg	+	+	+

+ = Positive - = Negative

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

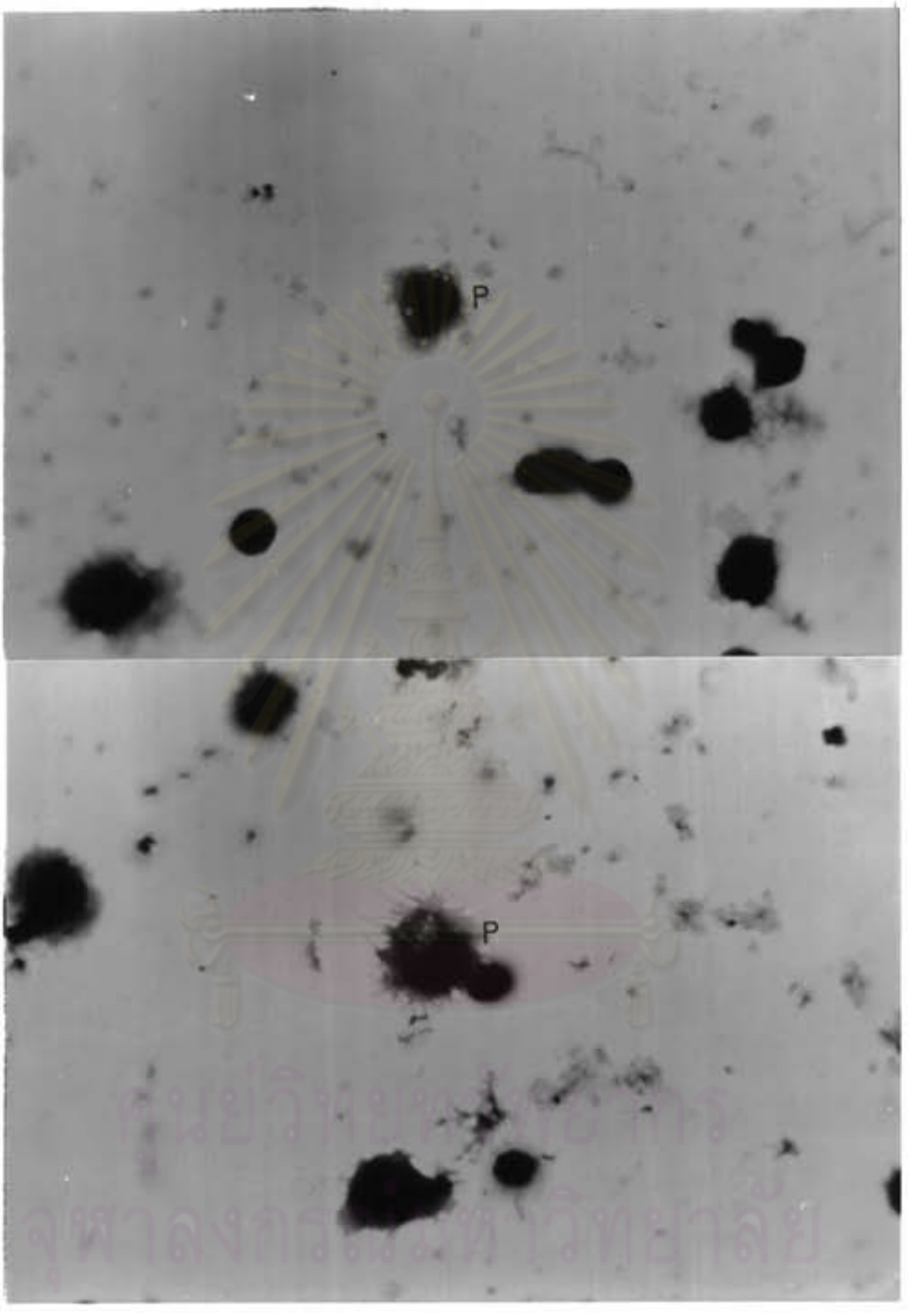


รูปที่ 26 ลักษณะเซลล์เม็ดเลือดที่ไม่เกิด phagocytosis (100X)

H = Hyaline cell

G = Granular cell

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 27 ลักษณะเซลล์เม็ดเลือดที่เกิด phagocytosis (P) (100X)

4.6 ผลการตรวจสอบทางพยาธิสภาพหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค (Challenge test)

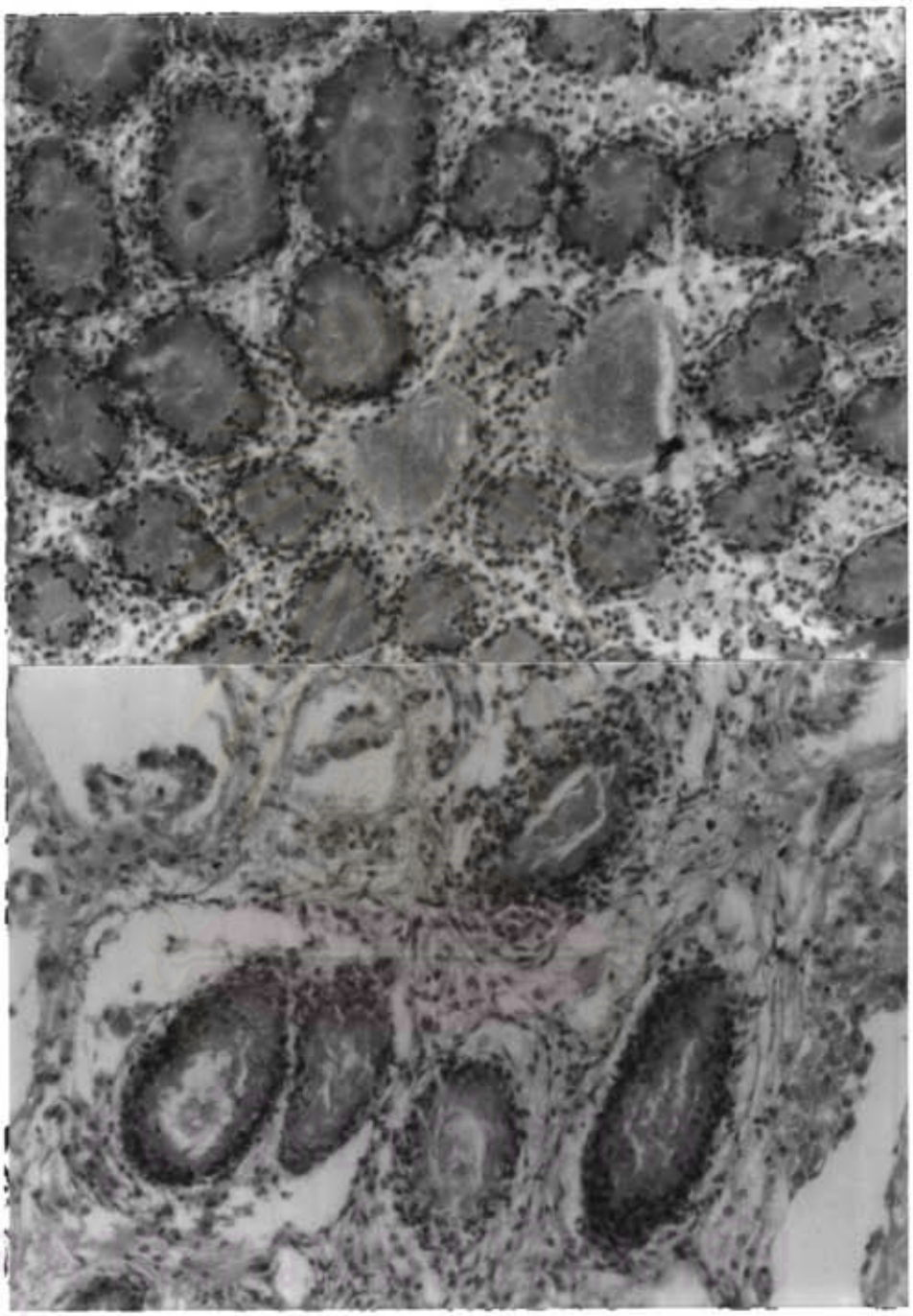
4.6.1 การเหนี่ยวนำด้วย *V. harveyi*

กุ้งทดลองในทุกกลุ่มของการทดลองหลังการเหนี่ยวนำด้วยการแช่ *V. harveyi* มีการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพ คือ พบการตาย (necrosis) ของท่อตับและตับอ่อน (hepatopancreatic tubule) เป็นบริเวณกว้างและถูกแทนที่ด้วยกลุ่มก้อนเม็ดเลือดที่ล้อมทำลายแบคทีเรีย ส่วนลำไส้พบการตายและการอักเสบอย่างรุนแรงร่วมกับพบกลุ่มเชื้อแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังพบการตายและการอักเสบที่ oka organ และเหงือก โดยการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นไม่รุนแรง (รูปที่ 28) (Nash et al., 1992; Nithimathachoke et. al., 1995))

4.6.2 การเหนี่ยวนำด้วย YHV

กุ้งทดลองในทุกกลุ่มของการทดสอบหลังการเหนี่ยวนำด้วยการแช่ YHV จะพบการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพ คือ จะพบการตายของเซลล์ (necrosis)เป็นบริเวณกว้าง ซึ่งมี 2 ระยะ คือ ระยะที่นิวเคลียสหดตัวเล็กลงและโครมาตินรวมตัวกันเป็นก้อน (pyknosis) และระยะที่นิวเคลียสสลายตัวแตกออกจากกันเป็นชิ้นๆกระจายอยู่ทั่วไปในไซโตพลาสซึมของเซลล์ (karyorrhesis) โดยพบการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวในอวัยวะต่างๆ คือ เหงือก เซลล์เม็ดเลือด oka organ อวัยวะสร้างเม็ดเลือด (haematopoietic tissue) กล้ามเนื้อ เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน หัวใจ และเส้นประสาท (รูปที่ 29) (พรเทพ, 2537; Anonymous, 1992a; Nash et al., 1993)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



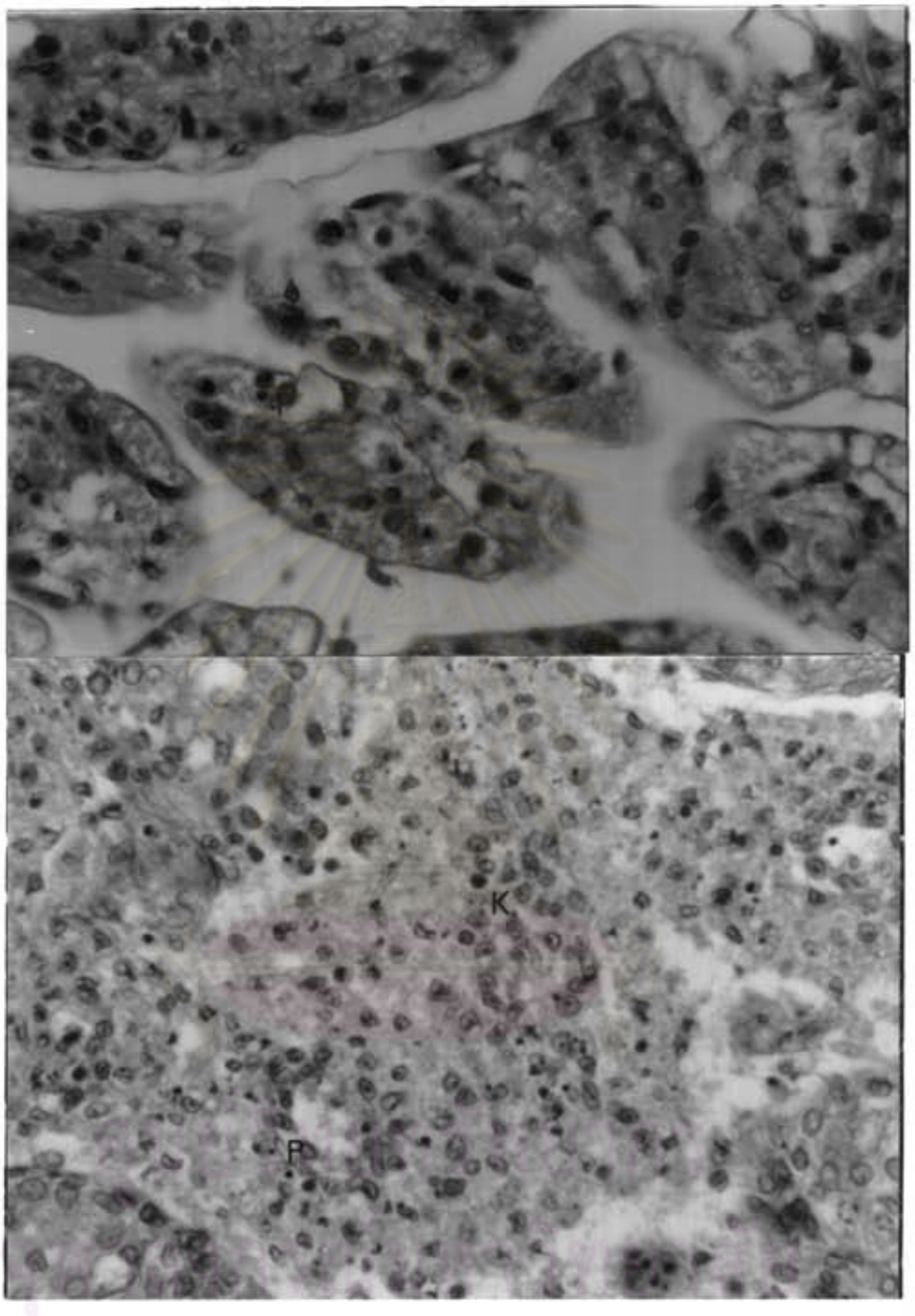
ก

ข

รูปที่ 28 ลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำหลังเหนี่ยวนำด้วยการแช่ *V. harveyi*

ก. ตับและตับอ่อน (hepatopancreas) ที่ถูกทำลายด้วยแบคทีเรีย (20X)

ข. ตับและตับอ่อน (hepatopancreas) ที่เกิดเมลานิน (40X)



รูปที่ 29 ลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำหลังเหนี่ยวนำโดยการแช่ด้วยไวรัสหัวเหลือง (YHV) (40X) Pyknosis (P) Karyorrhesis (K)

ก. เซลล์เหงือก

ข. oka organ