ผลของการเสริมสารเสริมในอาหารและเซลล์ตรึงโปรไบโอติคต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตและสุขภาพในกุ้งขาว

นางสาวอุมาพร วงศาสัก

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ปีการศึกษา 2557

EFFECTS OF FEED ADDITIVES AND IMMOBILIZED-PROBIOTIC SUPPLEMENTED DIETS ON GROWTH PERFORMANCES AND HEALTH IN WHITELEG SHRIMP

Umaporn Wongsasak

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Animal Production Technology

Suranaree University of Technology

Academic Year 2014

ผลของการเสริมสารเสริมในอาหารและเซลล์ตรึงโปรไบโอติคต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตและสุขภาพในกุ้งขาว

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(อ. ดร.วิทธวัช โมพี)
ประธานกรรมการ

(รศ. ดร.สุรินทร บุญอนันธนสาร)
กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)

(ผศ. ดร.สิริลักษณ์ ชัยจำรัส)
กรรมการ

(อ. ดร.สมร พรชื่นชูวงศ์)
กรรมการ

(ผศ. ดร.อมรรัตน์ โมพี)
กรรมการ

(ศ. ดร.ชูกิจ ลิมปีจำนงค์)
รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการและนวัตกรรม

(ผศ. ดร.สุเวทย์ นิงสานนท์)
คณบดีสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

อุมาพร วงศาสัก : ผลของการเสริมสารเสริมในอาหาร และเซลล์ตรึงโปรไบโอติคต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต และสุขภาพในกุ้งขาว (EFFECTS OF FEED ADDITIVES AND IMMOBILIZED-PROBIOTIC SUPPLEMENTED DIETS ON GROWTH PERFORMANCES AND HEALTH IN WHITELEG SHRIMP) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.สุรินทร บุญอนันธนสาร, 104 หน้า.

การวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการเสริมโปรไบโอติค (probiotic) ร่วมกับพรีไบโอติค (prebiotic) ต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต และการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) โดยในการศึกษานี้ได้แบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลอง

การทดลองที่ 1 เป็นการศึกษาเปรียบเทียบผลของการเสริมโปรไบโอติคที่ผ่านการทำแคปซูล (encapsulation) (*Bacillus subtilis* และ *Pediococcus acidilactici*) และโปรไบโอติคที่ไม่ได้ผ่านการทำแคปซูล (encapsulation) ต่อประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ และสมรรถนะการเจริญเติบโตในกุ้งขาว จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า ถึงแม้ว่าสมรรถนะการเจริญเติบโตของกุ้งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มอาหารทดลอง แต่การเสริมโปรไบโอติคที่ผ่านการทำแคปซูล (encapsulation) นำไปสู่การเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติค (lactic acid bacteria) ในลำไส้ เมื่อเปรียบเทียบกับโปรไบโอติคในรูปอิสระ ดังนั้นการทดลองที่ 2 จึงใช้โปรไบโอติคที่ผ่านการทำแคปซูล (encapsulation) ในการเสริมในอาหาร

การทดลองที่ 2 เป็นการศึกษาผลของการเสริมร่วมกันของโปรไบโอติคที่ผ่านการทำแคปซูล (*B. subtilis* หรือ *P. acidilactici*) และสารเสริมในอาหาร ได้แก่ เบต้ากลูแคน (ß-glucan) และนิวคลีโอไทด์ (nucleotides) ต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต ประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ ค่าเคมีในฮีโมลิมพ์ และการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งขาว โดยมีอาหารทดลอง 10 สูตร ประกอบด้วยอาหารสูตรพื้นฐานร่วมกับ *B. subtilis* และเบต้ากลูแคน (ß-glucan) (T1) *B. subtilis* และนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) (T2) *B. subtilis* และเบต้ากลูแคน (ß-glucan) ร่วมกับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) (T3) *P. acidilactici* และเบต้ากลูแคน (ß-glucan) (T4) *P. acidilactici* และนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) (T5) *P. acidilactici* และเบต้ากลูแคน (ß-glucan) ร่วมกับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) (T6) เบต้ากลูแคน (ß-glucan) (T7) นิวคลีโอไทด์ (nucleotide) (T8) เบต้ากลูแคน (ß-glucan) ร่วมกับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) (T9) และอาหารสูตรพื้นฐาน (T10) ทำการเลี้ยงกุ้งขาวด้วยอาหารทดลองเป็นระยะเวลา 90 วัน พบว่า กุ้งขาวที่ได้รับอาหารทดลอง T1-T9 มีสมรรถนะการเจริญเติบโต โปรตีน และไขมันในเนื้อ จำนวนแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติค (lactic acid bacteria) ความสูงของวิลไล (villi) ในลำไส้

ค่า superoxide anion (SOD) และphenoloxidase (proPo) เพิ่มสูงขึ้น แต่มีจำนวน *Vbrio* ในลำไส้ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (T10) กุ้งที่ได้รับอาหารทดลอง T2 และ T5-T7 จะมีค่า osmolarity สูงกว่ากลุ่มควบคุม (T10) และกุ้งที่ได้รับอาหารทดลอง T3 จะมีค่าคลอเลสเตอรอล (cholesterol) ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม (T10) ปริมาณเถ้าและความชื้นในเนื้อ จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด *Bifidobacterium* และราในลำไส้ ค่ากลูโคส (glucose) ค่าไตรกลีเซอไรด์ (triglycerides) โปรตีน (protein) และไนโตรเจนยูเรีย (urea nitrogen) ปริมาณเม็ดเลือดรวม (THC) และค่าการทำงานของไลโซไซม์ (lysozyme activity) ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ระหว่างกลุ่มทดลอง เมื่อนำกุ้งมาทดสอบกับความเครียดจากแอมโมเนีย (11.1 mg/ml) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ผลการศึกษาพบว่า ความเครียดจากแอมโมเนียไม่ส่งผลทำให้ค่าเคมีในฮีโมลิมพ์ในกุ้งที่ได้รับอาหารทดลอง T6 และ T7 มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะปกติ เมื่อกุ้งได้รับความเครียดจากแอมโมเนีย กุ้งที่ได้รับอาหารทดลอง T6 จะมีค่าการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ ค่า SOD ค่า proPo และTHC สูงกว่ากลุ่มควบคุม (T10) ดังนั้นการเสริมโปรไบโอติค (probiotic) หรือสารเสริม (feed additive) เพียงอย่างใดอย่างหนึ่ง หรือการเสริมร่วมกันระหว่างโปรไบโอติคและสารเสริมส่งผลต่อการเพิ่มสมรรถนะการเจริญเติบโต และสุขภาพของสัตว์ในสภาวะปกติ นอกจากนี้การเสริม *P. acidlactici* ร่วมกับเบต้ากลูแคน (ß-glucan) และนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) สามารถบรรเทาผลกระทบจากความเครียดจากแอมโมเนียได้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ ลายมือชื่อนักศึกษา อุดมพร วรดำรัก
ปีการศึกษา 2557 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

UMAPORN WONGSASAK : EFFECTS OF FEED ADDITIVES AND IMMOBILIZED-PROBIOTIC SUPPLEMENTED DIETS ON GROWTH PERFORMANCES AND HEALTH IN WHITELEG SHRIMP. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. SURINTORN BOONANUNTANASARN, Ph.D., 104 PP.

Bacillus subtilis/*Pediococcus acidilactici*/ENCAPSULATION/ß-GLUCAN /NUCLEOTIDE/*Litopenaeus vannamei*

The present study aimed to investigate the effects of co-supplementation dietary probiotics and prebiotics on growth performances and immune responses in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). This study included two experiments.

Experiment I investigated the comparable effects of supplementation dietary encapsulated probiotics (*Bacillus subtilis* or *Pediococcus acidilactici*) and probiotics without encapsulation on a population of intestinal bacteria and on growth performances in whiteleg shrimp. The results showed that although there were no significant differences in shrimp growth performances among treatment diets, dietary encapsulated probiotics led to increases in the number of lactic acid bacteria (LAB) in the intestine, compared with dietary free cell probiotics. Therefore, encapsulated probiotics were used for Experiment II on dietary supplementation.

Experiment II investigated the effects of dietary co-supplementation with encapsulated probiotics (*B. subtilis* or *P. acidilactici*) and feed additives including ß-glucan (ß-glu) and nucleotides (NA) on growth performances, intestinal bacteria,

haemolymph chemical and immune response parameters in whiteleg shrimp. Ten dietary treatments consisted of a basal diet incorporated with *B. subtilis* and ß-glu (T1), *B. subtilis* and NA (T2), *B. subtilis*, ß-glu and NA (T3), *P. acidilactici* and ß-glu (T4), *P. acidilactici* and NA (T5), *P. acidilactici*, ß-glu and NA (T6), ß-glu (T7), NA (T8), ß-glu and NA (T9) and a basal diet alone (T10). The shrimps were fed the experimental diets for 90 days. Compared with shrimps fed on diet T10, the shrimps on diet T1-T9 had higher growth performances, muscular protein and lipid, intestinal LAB number, intestinal villi height, superoxide anion (SOD), prophenoloxidase (proPO) but a lower intestinal *Vibrio* number. The haemolymph osmolarity of shrimps on diet T2 and T5-T7 was higher than those on diet T10. The shrimps on diet T3 had lower cholesterol than those on diet T10. In addition, there were no significant differences in muscular ash and moisture, intestinal total bacteria, *Bifidobacterium* and fungi number, haemolymph glucose, triglyceride, protein and urea nitrogen, total haemocyte count (THC) and lysozyme activity. When the experimental shrimps were exposed to ammonia stress (11.1 mg/ml) for 48 h., the results showed that, compared with the normal condition, ammonia stress did not alter the haemolymph chemical parameters in the shrimps on diets T6 and T7. When the shrimps were exposed to ammonia stress, the shrimp on diet T6 had all the immune parameters including SOD, proPO and THC which were higher than those on diet T10. When combined with either probiotics or feed additives, there were positive effects on shrimp growth and health status in normal conditions. In addition, dietary *P. acidilactici*, ß-glu and NA (T6) ameliorated the adverse effects on ammonia stress in shrimps.

School of Animal Production Technology Student's Signature Umaporn Wongsasak

Academic Year 2014 Advisor's Signature

Co-advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี เนื่องจากได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยภายใต้โครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ภายใต้โครงการเชื่อมโยงภาคการผลิตกับงานวิจัย ทุน สกว.-อุตสาหกรรมร่วมมือกับบริษัท นิวโว เทค จำกัด ประจำปี 2554 เลขที่สัญญา MRG-545S040 ชื่อโครงการ ผลของการเสริมสารเสริมในอาหารและเซลล์ตรึงโปรไบโอติคต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต และสุขภาพในกุ้งขาว และได้รับทุนการศึกษาสำหรับผู้มีศักยภาพเข้าศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. สุรินทร บุญอนันธนสาร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้โอกาสทางการศึกษา ให้คำแนะนำปรึกษาด้านวิชาการแก่ผู้วิจัยมาโดยตลอด รวมทั้งช่วยตรวจสอบ และแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สิริลักษณ์ ชัยจำรัส อาจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ให้เกียรติเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม อ. ดร. วิทธวัช โมพี อ. ดร. สมร พรชื่นชูวงศ์ และ ผศ. ดร. อมรรัตน์ โมพี ที่ได้สละเวลามาเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ และกรุณาให้ความรู้ คำปรึกษาด้านวิชาการ คำแนะนำในการแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนเสร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณ คุณสุนัย พลายมี หัวหน้างานสัตว์น้ำ ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้ความช่วยเหลืออำนวยความสะดวกด้านสถานที่ทำการทดลอง และให้คำปรึกษาด้านวิชาการมาโดยตลอด

ขอขอบคุณเพื่อน ๆ และพี่น้องสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ทุกท่าน ที่ให้คำปรึกษาด้านวิชาการ ความช่วยเหลือระหว่างการทำวิทยานิพนธ์ และให้กำลังใจที่ดีมาโดยตลอด

สำหรับคุณงามความดีอันใดที่เกิดจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ผู้วิจัยขอมอบให้กับบิดา มารดา และทุกคนในครอบครัว ซึ่งเป็นที่รักและเคารพยิ่ง ตลอดจนครูอาจารย์ทุกท่าน ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้และถ่ายทอดประสบการณ์ที่ดีให้แก่ผู้วิจัยตลอดมา

อุมาพร วงศาสัก

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย).. ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ) ค
กิตติกรรมประกาศ จ
สารบัญ ฉ
สารบัญตาราง ญ
สารบัญภาพ ฐ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ ฑ

บทที่

1 บทนำ 1
1.1 ความสำคัญของปัญหา 1
1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา 3
1.3 สมมุติฐานของการศึกษา 3
1.4 ขอบเขตของการศึกษา 3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3

2 ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4
2.1 ชีววิทยาของกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) 4
2.1.1 ลักษณะทั่วไป 4
2.1.2 วงจรชีวิต 5
2.2 สภาวะการเลี้ยงกุ้งขาวในปัจจุบัน 5
2.3 โปรไบโอติค (probiotic) 8
2.3.1 คุณสมบัติของโปรไบโอติคและประโยชน์ของโปรไปโอติค 8
2.3.2 แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติค (lactic acid bacteria) 9
2.3.3 ผลของการใช้โปรไบโอติคในสัตว์น้ำ 10
2.4 เอ็นแคปซูเลชัน (encapsulation) 20
2.4.1 ผลของการทำเอ็นแคปซูเลชั่น (encapsulation) ในจุลินทรีย์ 21

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.5. พรีไบโอติค (prebiotic) 23
2.5.1 คุณสมบัติของพรีไบโอติค 23
2.5.2 บทบาทของพรีไบโอติค 23
2.5.3 การใช้พรีไบโอติคในสัตว์น้ำ 24
3 วิธีการดำเนินการวิจัย 34
3.1 สถานที่ทำการทดลอง 34
3.2 การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของการใช้โปรไบโอติคที่ผ่านการทำแคปซูลเปรียบเทียบกับการใช้เซลล์โปรไบโอติคในรูปเซลล์อิสระเสริมในอาหารกุ้งขาว 34
3.2.1 การวางแผนการทดลอง 34
3.2.2 การเตรียมอาหาร 35
3.2.3 วิเคราะห์อัตราการเจริญเติบโต 36
3.2.4 ศึกษาประชากรจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารกุ้งขาว 37
3.2.5 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในเนื้อ 37
3.2.6 วิเคราะห์ค่าทางสถิติ 37
3.3 การทดลองที่ 2 ผลของการเสริมโปรไบโอติคที่ผ่านการทำแคปซูลร่วมกับสารเสริมนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) และเบต้ากลูแคน (ß-glucan) ในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมด์ 37
3.3.1 การวางแผนการทดลอง 37
3.3.2 การเตรียมอาหารทดลอง 38
3.3.3 การเตรียมเชื้อโปรไบโอติค 39
3.3.4 เตรียมสัตว์ทดลองและการเก็บตัวอย่าง 40
3.3.5 วิเคราะห์คุณภาพน้ำ 41
3.3.6 การทำให้กุ้งเกิดความเครียดด้วยน้ำที่มีแอมโมเนียสูง 41
3.3.7 การวิเคราะห์อัตราการเจริญเติบโตและการบันทึกผลการทดลอง 42
3.3.8 การวิเคราะห์ค่าโลหิตวิทยา 42
3.3.9 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเลือด 43
3.3.10 การวิเคราะห์ค่าภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ 45

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.3.11 การวิเคราะห์ปริมาณของเชื้อแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารกุ้ง 46
3.3.12 การวิเคราะห์ลักษณะทางจุลกายวิภาคของลำไส้ (morphology) 46
3.3.13 การวิเคราะห์ค่าองค์ประกอบทางเคมีของเนื้อ 47
3.3.14 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ 48
4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและการอภิปรายผล 49
4.1 การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของการใช้โปรไบโอติคที่ผ่านการทำแคปซูลเปรียบเทียบกับการใช้เซลล์โปรไบโอติคในรูปเซลล์อิสระเสริมในอาหารกุ้งขาว 49
4.1.1 ผลต่อประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ 49
4.1.2 ผลต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต 49
4.1.3 ผลต่อองค์ประกอบทางเคมีในเนื้อ 49
4.2 การทดลองที่ 2 ผลของการเสริมโปรไบโอติคที่ผ่านการทำแคปซูลร่วมกับสารเสริมนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) และเบต้ากลูแคน (ß-glucan) ในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมด์ 51
4.2.1 ผลต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต 51
4.2.2 ผลต่อประชากรจุลินทรีย์ 52
4.2.3 ผลต่อองค์ประกอบทางเคมีในเนื้อ 53
4.2.4 ผลต่อค่าความสูงของวิลไล 54
4.2.5 ผลต่อค่าโลหิตวิทยา 55
4.2.6 ผลต่อค่าภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ 57
4.3 การอภิปรายผล 70
4.3.1 การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของการใช้โปรไบโอติคที่ผ่านการทำแคปซูลเปรียบเทียบกับการใช้เซลล์โปรไบโอติคในรูปเซลล์อิสระเสริมในอาหารกุ้งขาว 70
4.3.1.1 ผลต่อประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ 70
4.3.1.2 ผลต่อองค์ประกอบทางเคมีในเนื้อ 71
4.3.1.3 ผลต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต 71

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.3.2 การทดลองที่ 2 ผลของการเสริมโปรไบโอติคที่ผ่านการทำแคปซูล ร่วมกับสารเสริมนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) และเบต้ากลูแคน (ß-glucan) ในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมด์ 72
4.3.2.1 ผลต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต 72
4.3.2.2 ผลต่อประชากรจุลินทรีย์ 73
4.3.2.3 ผลต่อองค์ประกอบทางเคมีในเนื้อ 74
4.3.2.4 ผลต่อความสูงของวิลไล (villi) 75
4.3.2.5 ผลต่อค่าโลหิตวิทยา 76
4.3.2.6 ผลต่อค่าภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ 78
5 สรุป 81
5.1 สรุป 81
5.2 ข้อเสนอแนะ 83
รายการอ้างอิง 84
ภาคผนวก 101
ประวัติผู้เขียน 104

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 สถานการณ์การผลิตกุ้งของประเทศไทยปี 2551-257 8
2.2 ตัวอย่างโปรไบโอติคที่เสริมในอาหารสัตว์ 11
2.3 ผลของการเสริมโปรไบโอติคต่อความสูงของวิลไลในลำไส้ 14
2.4 ผลของการเสริมโปรไบโอติคต่อการเจริญเติบโตในสัตว์น้ำ 15
2.5 ผลของการเสริมโปรไบโอติคต่อประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ 16
2.6 ผลของการเสริมโปรไบโอติคต่อองค์ประกอบทางเคมีในเนื้อ 17
2.7 ผลของการเสริมโปรไบโอติคต่อค่าเคมีในเลือด 18
2.8 ผลของการเสริมโปรไบโอติคต่อค่าภูมิคุ้มกัน 19
2.9 ผลการทำเอ็นแคปซูเลชั่นในจุลินทรีย์ต่ออัตราการรอดชีวิต 22
2.10 ผลของการเสริมนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) และเบต้ากลูแคน (ß-glucan) ต่อความสูงของวิลไลในลำไส้ 26
2.11 ผลของการเสริมนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ต่อการเจริญเติบโต 27
2.12 ผลของการเสริมเบต้ากลูแคน (ß-glucan) ต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต 28
2.13 ผลของการเสริมเบต้ากลูแคน (ß-glucan) ต่อองค์ประกอบทางเคมีในเนื้อ 29
2.14 ผลของการเสริมนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ต่อค่าองค์ประกอบทางเคมีในเนื้อ 30
2.15 ผลของการเสริมนิวคลีโอไทด์ (nucleotide)และเบต้ากลูแคน (ß-glucan) ต่อค่าภูมิคุ้มกัน 31
2.16 ผลของการเสริมนิวคลีโอไทด์ (nucleotide)และเบต้ากลูแคน (ß-glucan) ต่อค่าเคมีในเลือด 32
3.1 การจัดกลุ่มการทดลอง 34
3.2 การจัดกลุ่มการทดลองการเสริมโปรไบโอติคร่วมกับสารเสริมในอาหารกุ้งขาว 38
3.3 ปริมาณที่ใช้ในการทำอาหารกุ้งขาวและองค์ประกอบทางเคมีในอาหาร 39
3.4 คุณภาพน้ำในระหว่างการทดลอง 42
4.1 ผลของการเสริมโปรไบโอติคในรูปอิสระเปรียบเทียบกับเซลล์โปรไบโอติคในรูปแคปซูลในอาหารที่ใช้เลี้ยงกุ้งขาวต่อประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ (Log CFU/ลำไส้) 50

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

4.2 ผลของการเสริมโปรไบโอติคในรูปเซลล์อิสระเปรียบเทียบกับเซลล์โปรไบโอติคในรูปแคปซูลในอาหารที่ใช้เลี้ยงกุ้งขาวเป็นระยะเวลา 45 วัน ต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต 50

4.3 ผลของการเสริมโปรไบโอติคในรูปอิสระเปรียบเทียบกับเซลล์โปรไบโอติคในรูปแคปซูลในอาหารที่ใช้เลี้ยงกุ้งขาวต่อองค์ประกอบทางเคมีในเนื้อ 51

4.4 ผลของการเสริมโปรไบโอติคร่วมกับสารเสริมต่อการเจริญเติบโตในกุ้งขาวแวนนาไมด์หลังจากทำการทดลองเป็นระยะเวลา 45 และ 90 วัน 58

4.5 ผลของการเสริมโปรไบโอติคร่วมกับสารเสริมต่อการเจริญเติบโตในกุ้งขาวแวนนาไมด์หลังจากทำการทดลองเป็นระยะเวลา 45 และ 90 วัน 59

4.6 ผลของการเสริมโปรไบโอติคร่วมกับสารเสริมต่อประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้กุ้งขาวแวนนาไมด์หลังจากทำการทดลองเป็นระยะเวลา 45 วัน (Log CFU/g) 60

4.7 ผลของการเสริมโปรไบโอติคร่วมกับสารเสริมต่อประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้กุ้งขาวแวนนาไมด์หลังจากทำการทดลองเป็นระยะเวลา 90 วัน (Log CFU/g) 61

4.8 ผลของการเสริมโปรไบโอติคร่วมกับสารเสริมในกุ้งขาวแวนนาไมด์หลังจากทำการทดลองเป็นระยะเวลา 45 วันต่อองค์ประกอบทางเคมีในเนื้อ 62

4.9 ผลของการเสริมโปรไบโอติคร่วมกับสารเสริมในกุ้งขาวแวนนาไมด์หลังจากทำการทดลองเป็นระยะเวลา 90 วันต่อองค์ประกอบทางเคมีในเนื้อ 63

4.10 ผลของการเสริมโปรไบโอติคร่วมกับสารเสริมในกุ้งขาวแวนนาไมด์หลังจากทำการทดลองเป็นระยะเวลา 45 และ 90 วันต่อค่าความสูงของวิลไล (villi height) 64

4.11 ผลของการเสริมโปรไบโอติคร่วมกับสารเสริมต่อค่าเคมีในเลือดของกุ้งขาวแวนนาไมด์หลังจากทำการทดลองเป็นระยะเวลา 90 วัน 65

4.12 ผลของการเสริมโปรไบโอติคร่วมกับสารเสริมต่อค่าเคมีในเลือดของกุ้งขาวแวนนาไมด์หลังจากทำการทดลองเป็นระยะเวลา 90 วัน ในสภาวะเครียดเนื่องจากน้ำที่มีแอมโมเนียสูง 66

4.13 ผลของการเสริมโปรไบโอติคร่วมกับสารเสริมต่อค่าเคมีในเลือดของกุ้งขาวแวนนาไมด์หลังจากทำการทดลองเป็นระยะเวลา 90 วัน ในสภาวะเครียดเนื่องจากน้ำที่มีแอมโมเนียสูง 67

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

4.14 ผลของการเสริมโปรไบโอติคร่วมกับสารเสริมในกุ้งขาวแวนนาไมด์ หลังจากทำการทดลองเป็นระยะเวลา 90 วัน ต่อค่าภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ 68
4.15 ผลของการเสริมโปรไบโอติคร่วมกับสารเสริมต่อค่าภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของกุ้งขาวแวนนาไมด์ หลังเป็นระยะเวลา 90 วัน ในสภาวะความเครียดเนื่องจากแอมโมเนียในน้ำสูง 69
5.1 ผลการเสริมโปรไบโอติคร่วมกับสารเสริมต่อความต้านทานความเครียดของกุ้งขาว 82

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

1.1 ผลผลิตกุ้งเพาะเลี้ยงในทวีปเอเชียในปี 2005-2013 6

1.2 ปริมาณการส่งออกของแต่ละประเทศ ปี 2010..... 6

1.3 ปริมาณผลผลิตกุ้งจากการเพาะเลี้ยง ปี 2545-2555 7

3.1 การวางแผนการเก็บตัวอย่าง 41

3.2 ช่อง hemocytometer chamber ที่ใช้นับจำนวนเม็ดเลือด 43

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ß	=	beta
ANOVA	=	analysis of variance
b	=	ß-glucant
Bb	=	*B. subtilis* ร่วมกับ ß-glucan
Bbn	=	*B. subtilis* ร่วมกับ ß-glucan และ nucleotide
BE	=	*B. subtilis* ในรูปแคปซูล
BE	=	*B. subtilis* ในรูปเซลล์อิสระ
Bn	=	*B. subtilis* ร่วมกับ nucleotide
bn	=	ß-glucan ร่วมกับ nucleotide
C	=	สูตรอาหารพื้นฐาน (control)
CFU	=	colony forming unit
CRD	=	completely randomized design
DG	=	daily gain
DI	=	deionized water
dl	=	เดซิลิตร
DMRT	=	duncan's multiple range test
DMSO	=	dimethyl sulfoxide
EMS	=	early mortality syndrome
FAO	=	food and agriculture organization
FCR	=	feed conversion ratio
g	=	กรัม
L	=	ลิตร
LAB	=	lactic acid bacteria
M	=	โมล์ลาร์
mg	=	มิลลิกรัม
ml	=	มิลลิลิตร
mmol	=	มิลลิโมล์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

MRS Broth	=	lactobacillus broth
N	=	นอร์มอลล์
n	=	nucleotide
NBT	=	nitrotetrazolium blue
O_2	=	ออกซิเจน
Pb	=	*P. acidilactici* ร่วมกับ ß-glucan
Pbn	=	*P. acidilactici* ร่วมกับ ß-glucan และ nucleotide
PCA	=	plate count agar
PF	=	*P. acidilactici* ในรูปแคปซูล
PE	=	*P. acidilactici* ในรูปเซลล์อิสระ
pH	=	ค่าความเป็นกรด-ด่าง
Pn	=	*P. acidilactici* ร่วมกับ nucleotide
P. monodon	=	*Penaeus monodon*
ppt	=	parts per thousand
proPO	=	phenoloxidase activity
rpm	=	revolutions per minute
SEM	=	scanning electron microscope
SGR	=	specific growth rate
SOD	=	superoxide anion
spp.	=	subspices
SV	=	survival rate
TCBS	=	thiosulphate citrate bile salt sucrose
THC	=	total haemocyte count
WG	=	weight gain

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญของปัญหา

ประเทศไทยเป็นประเทศผู้ผลิตและส่งออกกุ้งแช่แข็งเป็นอันดับต้น ๆ ของโลก โดยการส่งออกกุ้งของไทยมีปริมาณสูงถึงร้อยละ 90 ของผลผลิตทั้งหมดภายในประเทศ ซึ่งในปี 2556 มีปริมาณการส่งออก 212,323 ตัน คิดเป็นมูลค่า 69,218 ล้านบาท และส่งออกทั้งในรูปกุ้งแช่แข็ง กุ้งแปรรูป และกุ้งกระป๋อง ไปยังสหรัฐอเมริกา สหภาพยุโรป และในกลุ่มประเทศอาเซียน (กรมการค้าภายใน, 2557) กุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) มีการเพาะเลี้ยงมากที่สุดในประเทศไทย เนื่องจากสามารถเลี้ยงในความหนาแน่นสูง และให้ผลผลิตสูงกว่ากุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) และการเพาะเลี้ยงกุ้งแบบระบบเข้มข้น (intensive system) พบมาก ในเขตภาคตะวันออกและภาคใต้ โดยเฉพาะเขตจังหวัดที่มีพื้นที่ชายฝั่ง นอกจากนี้ยังมีการเลี้ยงกุ้งขาวอยู่ในพื้นที่ดินเค็มต่าง ๆ ในประเทศไทยด้วยเช่นกัน

กรมประมงคาดว่าผลผลิตกุ้งรวมในปี 2557 จะมีผลผลิตประมาณ 300,000 ตัน ซึ่งเพิ่มขึ้นจากปี 2556 ที่มีผลผลิตกุ้งรวม 256,765 ตัน แต่ลดลงจากปี 2555 ที่สามารถผลิตกุ้งรวมได้ 450,000 ตัน เนื่องจากการเลี้ยงกุ้งขาวยังประสบปัญหา และได้รับความเสียหายจากโรคระบาด เช่น กลุ่มอาการกุ้งตายด่วน (early mortality syndrome : EMS) ส่งผลทำให้ปริมาณผลผลิตออกสู่ตลาดลดลง (กรมการค้าภายใน, 2557) นอกจากนี้เกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงกุ้งยังประสบปัญหาโรคระบาดจากแบคทีเรีย ได้แก่ แบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* ซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่มสำคัญในการก่อโรคกุ้งได้ (Balcazara, Blasa, Ruiz-Zarzuelaa, Cunninghamb, Vendrella and Muzquiza, 2006; Chiu, Guu, Liu, Pan and Cheng, 2007; Nimrat, 2007)

มีการศึกษาวิจัยด้านต่าง ๆ เพื่อหาแนวทางในการลดปัญหาความเสียหายในการเลี้ยงกุ้ง วิธีการหนึ่งที่ได้รับความสนใจคือ การใช้สารเสริม (feed additive) ในอาหารเพื่อเพิ่มภูมิคุ้มกันให้กับสัตว์น้ำ เช่น การเสริมโปรไบโอติค (probiotic) และพรีไบโอติค (perbiotic) ในอาหารกุ้ง โดยโปรไบโอติค หมายถึง จุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่ใช้เสริมในอาหารและก่อให้เกิดประโยชน์กับสัตว์เจ้าบ้าน (host) โดยช่วยปรับสมดุลจุลินทรีย์ในทางระบบเดินอาหารในบริเวณลำไส้ (Fuller, 1989) เป็นจุลินทรีย์ไม่เป็นพิษต่อตัวกุ้ง สามารถดำรงชีวิต และแพร่ขยายพันธุ์ในลำไส้ได้ นอกจากนี้ยังช่วยส่งเสริมการดำรงชีวิตของกุ้ง เช่น ผลิตเอนไซม์สำหรับย่อยสลายสารอาหาร เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการดูดซึมอาหาร จึงส่งผลทำให้กุ้งมีการอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มสูงขึ้น (Rengpipat, Phianphak,

Piyatiratitivorakul and Menasaveta, 1998; Rengpipat, tunyanun, Fast, Piyatiratitivorakul and Menasveta, 2003; Wang, 2007; Liu, Chiu, Ho and Wang, 2009; Xuxia, Ziqiang, Yanbo and Weifen, 2009) และผลิตสารต้านจุลินทรีย์ก่อโรคภายในระบบทางเดินอาหาร ได้แก่ กรดอินทรีย์ (acetic acid, propionic acid และ lactic acid เป็นต้น) (Gailliland, 1985) อย่างไรก็ตามการมีชีวิตอยู่ของโปรไบโอติคถือว่าเป็นสิ่งที่สำคัญ ซึ่งมีการรายงานว่า เมื่อโปรไบโอติคผ่านสู่ระบบทางเดินอาหารที่มีสภาวะเป็นกรด จุลินทรีย์มีความสามารถในการรอดชีวิตลดลง (Chandramouli, Kailasapathy, Peiris and Jones, 2004; Mishra and Prasad, 2005; Maragkoudakis, Georgia, Christos, George, Bruno and Effie, 2006) ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาวิธีการเพิ่มความสามารถในการอยู่รอดชีวิตของโปรไบโอติคจากสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่าง ๆ แนวทางหนึ่งที่นำมาใช้ คือ เทคนิคการห่อหุ้มเซลล์ (encapsulation) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ในการป้องกันโปรไบโอติค ทำให้สามารถรอดชีวิตจากสภาวะแวดล้อมในระบบทางเดินอาหารมากขึ้น (Kailasapathy, 2006) นอกจากนี้ยังมีแนวทางที่เพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของโปรไบโอติค โดยการผสมสารเสริม (feed additive) เช่น พรีไบโอติคเสริมลงในอาหารสัตว์

พรีไบโอติค (prebiotic) หมายถึง สารอาหารที่เอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารของคนและสัตว์ไม่สามารถย่อยได้ แต่จะถูกย่อยโดยจุลินทรีย์บริเวณลำไส้ จึงส่งผลต่อการกระตุ้นการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์หลายชนิด ได้แก่ *Bifidobacteri*a, *Streptococus* และ *Lactobacilli* เป็นต้น (Delzenne and Roberfroid, 1994) นอกจากนี้มีการวิจัยและพัฒนากลุ่มของสารเสริมในอาหารที่เกี่ยวข้องในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดยพบว่า เบต้ากลูแคน (ß-glucan) และนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงในกุ้ง white shrimp (*L. vannamei*) (Anas et al., 2009; Bai et al., 2010) ปลา rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Burrells, William, Southage and Wadsworth, 2001) ปลา European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) (Bonaldo, Thompson, Manfrin, Adams, Murano, Mordenti and Gatta, 2007) และปลา carp (*Cyprinus carpio*) (Sakai, Taniguchi, Mamoto, Ogawa and Tabata, 2001; Kim, Feo and Zhang, 2009) ได้ เบต้ากลูแคน (ß-glucan) มีโครงสร้างโมเลกุลขนาดเล็ก ประกอบไปด้วยน้ำตาลโมโนแซคคาไรด์ เช่น กลูโคส ส่วนใหญ่ผลิตจากผนังเซลล์ของยีสต์ *Saccharomyces cereviceae* ส่วนนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ที่ใช้เป็นสารเสริมส่วนใหญ่สกัดได้จากเซลล์ยีสต์ *S. cereviceae*

ในการศึกษานี้ได้ศึกษาผลของการใช้โปรไบโอติคที่ผ่านการทำแคปซูลร่วมกับสารเสริมเบต้ากลูแคน และ/หรือ นิวคลีโอไทด์ในอาหารกุ้งขาวต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต องค์ประกอบทางเคมีในเนื้อ ประชากรจุลินทรีย์ ลักษณะกายวิภาคในลำไส้ ค่าโลหิตวิทยา และค่าภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ ซึ่งผลการศึกษาที่ได้น่าจะเป็นประโยชน์ในการพัฒนาการใช้โปรไบโอติคได้อย่างมีประสิทธิภาพในกุ้งขาว

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1.2.1 เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการใช้โปรไบโอติคที่ผ่านการทำแคปซูลกับการใช้โปรไบโอติคในรูปเซลล์อิสระเสริมในอาหารกุ้งขาว

1.2.2 เพื่อศึกษาผลของการเสริมโปรไบโอติคที่ผ่านการทำแคปซูลร่วมกับสารเสริม (เบต้ากลูแคน (ß-glucan) และนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ในการเลี้ยงกุ้งขาว

1.2.3 เพื่อศึกษาผลของการเสริมโปรไบโอติคที่ผ่านการทำแคปซูลร่วมกับสารเสริม (เบต้ากลูแคน (ß-glucan) และนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ต่อค่าโลหิตวิทยา และค่าภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะในกุ้งขาวที่ทำให้เกิดความเครียดด้วยน้ำที่มีแอมโมเนียสูง

1.3 สมมุติฐานของการศึกษา

1.3.1 กุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่เสริมโปรไบโอติคที่ผ่านการทำแคปซูล จะมีผลทำให้กุ้งขาวมีสมรรถนะการเจริญเติบโต และจำนวนแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติค (lactic acid bacteria) เพิ่มสูงขึ้น

1.3.2 กุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่เสริมโปรไบโอติคร่วมกับสารเสริมจะมีผลทำให้กุ้งขาวมีสมรรถนะการเจริญเติบโตและมีสุขภาพดีขึ้น

1.3.3 กุ้งที่ได้รับอาหารที่เสริมโปรไบโอติคร่วมกับสารเสริม เมื่อถูกทำให้เครียดด้วยสภาวะน้ำที่มีแอมโมเนียสูง กุ้งขาวจะมีค่าเคมีในเลือด และค่าภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะไม่แตกต่างจากกุ้งขาวที่อยู่ในสภาวะปกติ

1.4 ขอบเขตของการศึกษา

การวิจัยในครั้งนี้จะมุ่งเน้นศึกษาถึงผลของการเสริมโปรไบโอติค (*B. subtilis* และ *P. acidlacticis*) ที่ผ่านการทำแคปซูลร่วมกับสารเสริม (ß-glucan และ nucleotide) ผสมในอาหารกุ้งขาวต่ออัตราการเจริญเติบโต ค่าของภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ ค่าเคมีในเลือด ประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ องค์ประกอบทางเคมีในเนื้อ และกายวิภาคของลำไส้

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

งานวิจัยนี้จะทำให้ได้ข้อมูลของการพัฒนาการใช้โปรไบโอติคได้อย่างมีประสิทธิภาพในกุ้งขาว และเป็นการนำมโคส่วนเหลือจากโรงงานผลิตนมมาใช้ประโยชน์ในการผลิตนมหมัก สำหรับเป็นสารเสริมโปรไบโอติค นอกจากนี้เป็นการศึกษาผลของการใช้สารเสริมพรีไบโอติคและนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ผสมลงในอาหารกุ้งต่อสมรถนะการเจริญเติบโต และสุขภาพในกุ้งขาว

บทที่ 2
ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ชีววิทยาของกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*)

กุ้งขาวแวนนาไม (*L. vannamei*) เป็นสายพันธุ์ที่มีถิ่นกำเนิดบริเวณภาคตะวันออกของมหาสมุทรแปซิฟิก ซึ่งสามารถพบได้ตั้งแต่ชายฝั่งทะเลของประเทศเม็กซิโกจนถึงชายฝั่งทะเลของประเทศเปรู ซึ่งเป็นเขตที่มีอุณหภูมิของน้ำสูงกว่า 20 องศาเซลเซียส (Food and Agriculture Organization, 2011) อนุกรมวิธานของกุ้งขาวเป็นดังนี้

Phylum Arthropoda

Class Crustacea

Subclass Malacostraca

Order Decapoda

Suborder Natantia

Family Penaeidae

Genus *Litopenaeus*

Species *L.vannamei*

Farfante and Kenley (1997)

2.1.1 ลักษณะทั่วไป

กุ้งขาวแวนนาไมมีลักษณะเด่น คือ ลำตัวมี 6 ปล้อง ส่วนหัวมี 1 ปล้อง และสีของลำตัวเป็นสีขาวโปร่ง บางครั้งอาจเป็นสีฟ้าขึ้นอยู่กับรงควัตถุสีฟ้าที่อยู่บริเวณหาง และยูโรพอด (uropod) (Eldred and Hutton, 1960) ขนาดโตเต็มวัยของกุ้งขาวจะมีขนาดเล็กกว่ากุ้งกุลาดำ โดยความยาวจากกรีหัวถึงปลายกรีหาง 230 มิลลิเมตร ความยาวจากโคนหัวถึงปลายกรีหัว 65 มิลลิเมตร ความยาวจากโคนหัวถึงปลายกรีหาง 165 มิลลิเมตร เส้นรอบวงหัว 94 มิลลิเมตร เส้นรอบวงตัว 98 มิลลิเมตร แพนหางยาว 35 มิลลิเมตร ตาห่างกัน 20 มิลลิเมตร น้ำหนักตัวเฉลี่ย 90-120 กรัม สามารถหากินได้ทุกระดับความลึกของน้ำ ชอบว่ายน้ำ ลอกคราบทุก ๆ สัปดาห์ มีนิสัยที่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะของน้ำในบ่อเพาะเลี้ยง ตื่นตกใจง่าย (Food and Agriculture Organization, 2011) เป็นกุ้งที่เลี้ยงได้ทั้งในระบบธรรมชาติและระบบกึ่งหนาแน่น โดยเพาะเลี้ยงได้ในน้ำที่มีระดับความเค็ม 5-35 ส่วนในพันส่วน (parts per thousand : ppt) แต่ระดับความเค็มที่เจริญเติบโตได้ดี คือ 12-22 ส่วนในพันส่วน (parts per thousand : ppt) อุณหภูมิของน้ำที่เหมาะสมคือ 26-29 องศาเซลเซียส (Balakrishnan, Peyail, Ramachandran,

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Theivasigamani, Savji, Chokkaiah and Nataraj 2011)

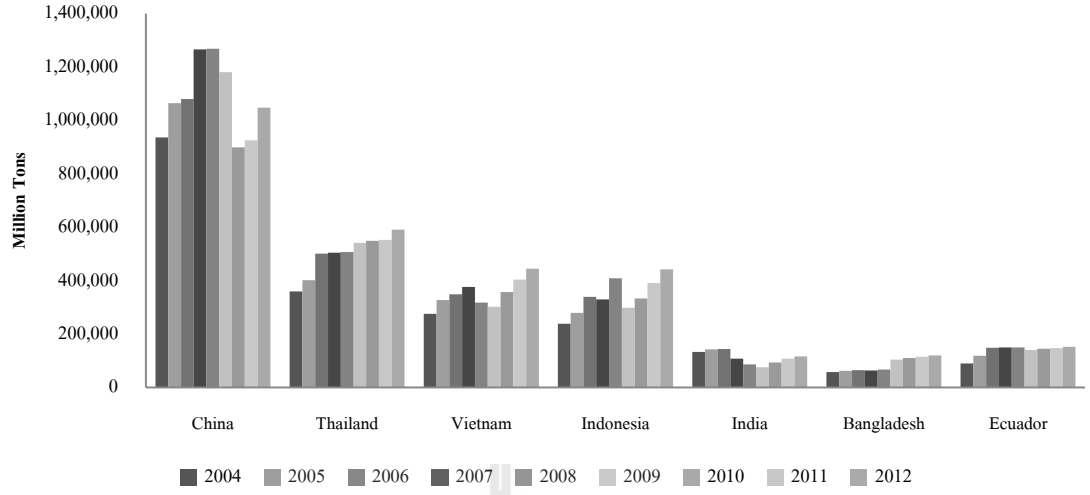
2.1.2 วงจรชีวิต

พ่อ-แม่พันธุ์กุ้งขาวจะอาศัยอยู่ในทะเล ซึ่งมีอุณหภูมิของน้ำประมาณ 26-28 องศาเซลเซียส ความเค็มประมาณ 35 ส่วนในพันส่วน (parts per thousand : ppt) โดยพ่อพันธุ์จะเริ่มเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ที่น้ำหนักประมาณ 20 กรัม และแม่พันธุ์ 28 กรัม อายุประมาณ 6-7 เดือน หลังจากผสมพันธุ์ ไข่กุ้งที่ได้รับการปฏิสนธิจะฟักเป็นตัวอ่อนในระยะนอเพียส (nauplius) และพัฒนาระยะตัวอ่อนในทะเลจนเข้าสู่ระยะโพสลาวา (post larva) จะอพยพเข้ามาอาศัยอยู่บริเวณชายฝั่งใกล้ปากแม่น้ำหรือป่าชายเลน ซึ่งเป็นบริเวณที่มีอาหารอุดมสมบูรณ์ และหลบภัยจากศัตรูได้ดี หลังจากเจริญเติบโตอยู่บริเวณชายฝั่งประมาณ 2-3 เดือน กุ้งขาวที่โตเต็มวัยจะอพยพกลับสู่ทะเลเพื่อพัฒนาความสมบูรณ์เพศไปเป็นพ่อ-แม่พันธุ์ และวางไข่ต่อไป (Munoz et al., 2003; Food and Agriculture Organization, 2011)

2.2 สภาวะการเลี้ยงกุ้งขาวในปัจจุบัน

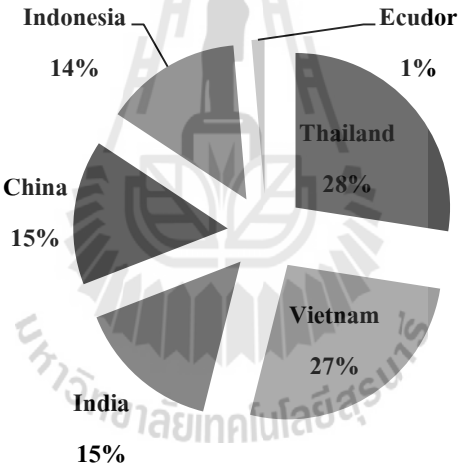
ผลผลิตกุ้งส่วนใหญ่อยู่ในทวีปเอเชีย และมีผลผลิตประมาณ 78% ของผลผลิตโลก รองลงมาคือทวีปอเมริกา มีผลผลิตประมาณ 15% ของผลผลิตโลก จากข้อมูลในปี 2009 มีการรายงานว่า ในทวีปเอเชีย ประเทศที่มีผลผลิตกุ้งมากที่สุด ได้แก่ จีน (คิดเป็น 36% ของผลผลิตทั้งหมดในทวีปเอเชีย) รองลงมาคือ ไทย (17%) เวียดนาม (9%) อินโดนิเซีย (9%) อินเดีย (2%) ตามลำดับ (ดังแสดงตามภาพที่ 1) แม้ว่าประเทศจีนจะเป็นผู้ผลิตกุ้งรายใหญ่ที่สุดของโลก แต่จากข้อมูลในภาพที่ 1.2 แสดงให้เห็นว่า ประเทศไทยเป็นประเทศส่งออกกุ้งแช่แข็ง เป็นอันดับต้น ๆ ของโลก ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่าประเทศไทยจัดเป็นแหล่งผลิตกุ้งที่สำคัญของโลก

ผลผลิตกุ้งภายในประเทศไทยได้มาจาก 2 แหล่ง คือ จากการจับในทะเล และการเพาะเลี้ยง โดยผลผลิตกุ้งส่วนใหญ่ได้มาจากการเพาะเลี้ยง พื้นที่เพาะเลี้ยงกุ้งจะอยู่ในเขตจังหวัดที่มีพื้นที่ชายฝั่งทะเล ได้แก่ จังหวัดต่าง ๆ ในภาคตะวันออก และภาคใต้ ผลผลิตกุ้งที่ได้ใช้ในการบริโภคภายในประเทศ และการส่งออกไปขายต่างประเทศ ซึ่งผลผลิตส่วนใหญ่เป็นการส่งออกต่างประเทศมีปริมาณสูงถึงร้อยละ 90 ของผลผลิตทั้งหมดที่ผลิตได้ในประเทศ ยกตัวอย่างเช่น จากข้อมูลในปี 2556 ประเทศไทยมีผลผลิตกุ้ง 256,765 ตัน และมีปริมาณการส่งออก 212,323 ตัน คิดเป็นมูลค่า 69,218 ล้านบาท การส่งออกจะอยู่ในรูปกุ้งแช่เย็น กุ้งแช่แข็ง กุ้งแปรรูป และกุ้งกระป๋อง ตลาดส่งออกผลิตภัณฑ์กุ้งของไทยได้แก่ ตลาดสหรัฐอเมริกา สหภาพยุโรป และในกลุ่มประเทศอาเซียน (กรมการค้าภายใน, 2557)



ภาพที่ 1.1 ผลผลิตกุ้งเพาะเลี้ยงในทวีปเอเชียในปี 2005-2013

ที่มา : FAO (2011b), FAO GOAL (2010, 2009)

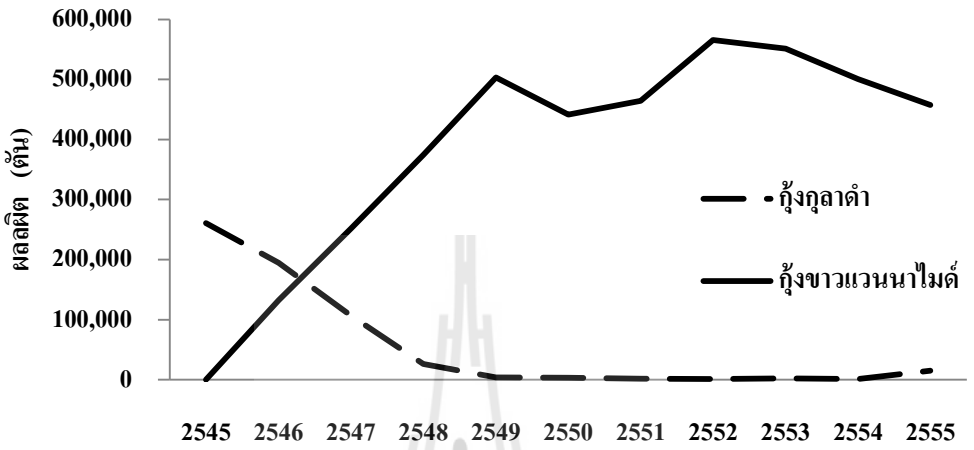


ภาพที่ 1.2 ปริมาณการส่งออกของแต่ละประเทศ ปี 2010

ที่มา : Food and agriculture organization of the united nations (2011)

การผลิตกุ้งในประเทศไทยเริ่มจากการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ต่อมาการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ มีปัญหาผลผลิตตกต่ำ เนื่องจาก ประสบปัญหาเรื่องโรคระบาดในกุ้งกุลาดำ การเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำในเมืองไทยลดน้อยลง ต่อมาเกษตรกรจึงมีการนำกุ้งขาวแวนนาไม (*L. vannamei*) เข้ามาเลี้ยงแทนกุ้งกุลาดำ ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2547 ดังภาพที่ 1.3 ที่แสดงให้เห็นว่าปริมาณการผลิตกุ้งกุลาดำภายในประเทศจะมีผลผลิตลดลง และปริมาณการผลิตกุ้งขาวจะผลผลิตเพิ่มมากขึ้น เนื่องจาก กุ้งขาวมีระยะเวลาเลี้ยงสั้นกว่า ทนทานต่อสภาพแวดล้อม และสามารถเลี้ยงในความหนาแน่นสูง เป็นต้น จน ณ ปัจจุบันประเทศไทยมีปริมาณการเลี้ยงกุ้งขาวไม่น้อยกว่า 97% ของพื้นที่เลี้ยงทั้งหมดที่มีการ

เลี้ยงกุ้งภายในประเทศ (สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล, 2551) จากข้อมูลในปี 2555 ผลผลิตกุ้งจากการเพาะเลี้ยงมีปริมาณผลผลิตรวม 472,881 ตัน ประกอบด้วยกุ้งขาวแวนนาไม 457,661 ตัน (ร้อยละ 96.78) และกุ้งกุลาดา 15,220 ตัน (ร้อยละ 3.22)



ภาพที่ 1.3 ปริมาณผลผลิตกุ้งจากการเพาะเลี้ยง ปี 2545-2555

ที่มา : ศูนย์สารสนเทศ กรมประมง (http://www.thai-frozen.or.th/news_45.php)

จากข้อมูลของ กรมการค้าภายใน (2557) ได้รายงานว่า ปี 2555 ประเทศไทยมีผลผลิตกุ้ง 450,000 ตัน ต่อมาในปี 2556 ประเทศไทยมีผลผลิตกุ้งรวม 256,765 ตัน ดังตารางที่ 2.1 ผลผลิตกุ้งที่ลดลง เกิดเนื่องจาก สภาพอากาศที่แปรปรวน ภัยธรรมชาติ ความเสียหายจากโรคระบาด เช่น กลุ่มอาการกุ้งตายด่วน (early mortality syndrome : EMS) กรมประมงคาดการณ์ว่าในปี 2557 ประเทศไทยจะสามารถผลิตกุ้งได้ประมาณ 300,000 ตัน

ได้มีการศึกษาวิจัยต่าง ๆ เพื่อหาแนวทางในการลดปัญหาความสูญเสียในการเลี้ยงกุ้ง วิธีการหนึ่งที่ได้รับความสนใจคือ การใช้สารเสริม (feed additive) ลงไปในอาหารเพื่อเพิ่มภูมิคุ้มกันให้กับสัตว์น้ำ เช่น การเสริมไปรไบโอติค (probiotic) พรีไบโอติค (perbiotic) และสมุนไพร (herb) ในอาหาร จากการศึกษาพบว่า การเสริมสารดังกล่าวนี้สามารถปรับปรุงการเจริญเติบโต (Ziaei-Nejad, Rezaei, Takami, Lovett, Mirvaghefi and Shakouri, 2006; Castex, Chim, Pham, Lemaire, Wabete, Jean-Louis, Schmidely and Mariojouls, 2008; Far, Saad, Daud, Harmin and Shakibazadeh, 2009; Boonthai et al., 2011) ช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรคได้ (ยุทธพล และนงนุช, 2549; ศจีนา และ มังกร, 2549; Moriarty, 1997; Ziaei-Nejad et al., 2006; Ferguson et al., 2010; Boonthai, Vuthiphandchai and Nimrat, 2011) จึงส่งผลทำให้สัตว์น้ำมีสุขภาพแข็งแรง และสามารถเพิ่มปริมาณผลผลิตในการเลี้ยงสัตว์น้ำได้ สำหรับการใช้สมุนไพรในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันสัตว์น้ำนั้นยังมีข้อกำจัด ในเรื่องของปริมาณสารออกฤทธิ์ใน

สมุนไพรแต่ละชนิดยังมีปริมาณไม่แน่นอน ขึ้นอยู่กับช่วงอายุของสมุนไพร บริเวณที่ปลูก และวิธีการเก็บเกี่ยวผลผลิต (สาโรส ค้าเจริญ, 2547) เป็นต้น ดังนั้นการพัฒนาการใช้สมุนไพรในอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์น้ำ จึงยังไม่สามารถทำได้ในเวลานี้ ต้องมีการศึกษาวิจัยด้านต่าง ๆ อีกมาก ดังนั้นการเลี้ยงสัตว์น้ำด้วยการเสริมโปรไบโอติคร่วมกับพรีไบโอติคในอาหาร จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่นำมาใช้เพิ่มสมรรถนะการเจริญเติบโต และความสามารถในการต้านทานโรคในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

ตารางที่ 2.1 สถานการณ์การผลิตกุ้งของประเทศไทยปี 2551-2557

ผลผลิต และความต้องการใช้	2552	2553	2554	2555	2556	2557
ผลผลิตโลก (ตัน)	2,192,000	2,200,000	2,33,5000	2,400,000	2,120,000	-
ผลผลิตไทย (ตัน)	566,970	553,909	502,188	450,000	256,765	300,000
• กุ้งขาวแวนนาไมด์	565,920	551,516	500,726	449,100	246,494	288,000
• กุ้งกุลาดำ	1,056	2,393	1,462	900	10,271	12,000
ความต้องการใช้ภายในประเทศ (ตัน)	55,000	55,000	55,000	55,000	25,676	30,000
นำเข้า ปริมาณ (ตัน)	19,372	21,988	30,504	9,667	22,467	8,919
มูลค่า (ล้านบาท)	1,640	1,628	1,561	1,256	3,447	1,886
ส่งออก ปริมาณ (ตัน)	378,658	427,723	393,099	192,370	212,323	41,672
มูลค่า (ล้านบาท)	93,372	101,069	110,310	55,309	69,218	17,169

ที่มา : กรมการค้าภายใน กระทรวงพาณิชย์ ประจำเดือน มิถุนายน พ.ศ. 2557

2.3 โปรไบโอติค (probiotic)

โปรไบโอติค (probiotics) มาจากภาษากรีก แปลว่า เพื่อชีวิต และต่อมามีคนให้ความหมายของโปรไบโอติคอีกมากมาย ดังนี้ Parker (1974) ให้คำจำกัดความของโปรไบโอติค คือ จุลินทรีย์ที่มีชีวิตและสารซึ่งสนับสนุนให้เกิดสมดุลของจุลินทรีย์ในทางเดินอาหาร ขณะที่ Fuller (1989) ให้ความหมายของโปรไบโอติค คือ จุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่ใช้เสริมในอาหาร และก่อให้เกิดประโยชน์กับสัตว์เจ้าบ้าน (host) โดยช่วยปรับสมดุลจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารของสัตว์เจ้าบ้าน ซึ่งพบได้ในบริเวณลำไส้ที่เรียกว่า gastrointestinal tract (GI) และยังรวมถึงจุลินทรีย์ที่เตรียมขึ้นเพื่อใช้เป็นส่วนผสมในอาหารในรูปที่มีชีวิต

2.3.1 คุณสมบัติ และประโยชน์ของโปรไบโอติค

2.3.1.1 โปรไบโอติคส่งเสริมสุขภาพของเจ้าบ้าน (host) โดยการช่วยปรับสมดุล

จุลินทรีย์ในร่างกาย และป้องกันการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารโดยการแข่งขันกับแบคทีเรียก่อโรคในการยึดเกาะผนังลำไส้ แย่งอาหารของแบคทีเรียก่อโรค และสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค (Fuller, 1993)

2.3.1.2 โปรไบโอติคสามารถเพิ่มจำนวน และยึดเกาะผนังลำไส้ใหญ่ได้ ซึ่งจะช่วยป้องกันไม่ให้แบคทีเรียก่อโรคเกาะ ทำให้การย่อยอาหาร และการดูดซึมอาหารเป็นไปอย่างปกติ (Fuller, 1993)

2.3.1.3 โปรไบโอติคสามารถมีชีวิตอยู่รอดในกระเพาะอาหาร เนื่องจาก ในกระเพาะอาหารจะมี pH อยู่ในช่วง 1-3 ซึ่งเกิดจากการที่ร่างกายมีการหลั่งกรด (hydrochloric acid) ออกมาเพื่อช่วยในกระบวนการย่อยอาหาร ทำให้ค่า pH ในกระเพาะอาหารมีค่าค่อนข้างต่ำ ดังนั้นโปรไบโอติคจะต้องมีความสามารถในการทนต่อ pH ในช่วงนี้ได้ จึงสามารถมีชีวิตรอดผ่านไปยังลำไส้ใหญ่ได้ (Kontula, Jaskali, Nollet, Smet, Wright, Poutanan and Sandholm, 1998)

2.3.1.4 โปรไบโอติคมีผลต่อระบบการย่อยอาหาร โดยโปรไบโอติคสามารถเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ เช่น อะไมเลส (amylase) โปรติเอส (protease) และไลเปส (lipase) ส่งผลทำให้สัตว์ดูดซึมอาหารได้ดียิ่งขึ้น (Gatesoupe, 1999; Balcazar et al., 2006) นอกจากนั้นแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติค (lactic acid bacteria) ยังสังเคราะห์วิตามินที่จำเป็นต่อร่างกาย เช่น วิตามินบี 1 (B1) บี 2 (B2) บี 6 (B6) บี 12 (B12) เป็นต้น

2.3.1.5 โปรไบติคช่วยเพิ่มระบบภูมิคุ้มกันให้กับร่างกาย โดยโปรไบโอติคบางสายพันธุ์สามารถผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียที่เรียกว่า แบคเทอริโอซิน (bacteriocin) มาช่วยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคได้ (Edward and Amold, 1977) นอกจากนั้นการสร้างกรด (lactic acid) ของแบคทีเรียในบริเวณลำไส้ทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ลดต่ำลง ส่งผลให้เกิดสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค นอกจากนี้แบคทีเรียบางสายพันธุ์ผลิตสารที่มีลักษณะเป็นเมือกในลำไส้ ซึ่งจะช่วยให้จับกับสารพิษบางอย่าง และขับถ่ายออกจากร่างกายได้ (ปิ่นมณี, 2548)

2.3.2 แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติค (lactic acid bacteria)

แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติค (lactic acid bateria : LAB) เป็นแบคทีเรียที่มีทั้งรูปกลมและรูปท่อน หรือเกาะกันเป็นสายยาว โดยสามารถเจริญเติบโตได้ในบริเวณที่มีออกซิเจน (aerobe) ไม่มีออกซิเจน (anaerobe) หรือมีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย (Axelsson, 1993)

2.3.2.1 ประเภทของแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติค สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม ตามกระบวนการ และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมัก (Axelsson, 1993) คือ

- Homofermentative เป็นแบคทีเรียที่หมักน้ำตาลคาร์บอน 6 อะตอม เช่น กลูโคส แล้วให้กรดแลคติค (lactic acid) มากกว่าหรือเท่ากับ 80% ได้แก่ *Pediococcus Streptococcus L.*

acidophilus และ *L. delbrueckii* เป็นต้น

- Heterofermentative เป็นแบคทีเรียที่หมักน้ำตาลคาร์บอน 6 อะตอม เช่น กลูโคส แล้วให้คาร์บอนไดออกไซด์ 20-25% กรดแลคติค (lactic acid) 50% กรดอะซิติก (acetic acid) และ เอธานอล (ethanol) 20-25% ได้แก่ *L. plantarum L. casei* และ *L. brevis* เป็นต้น

Pediococcus acidilactici เป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างกลม แบ่งตัวลักษณะ 2 ทิศทาง บนระนาบเดียวกัน โดยแบ่งตัวครั้งที่ 2 ในทิศด้านขวามือของครั้งแรก ทำให้เกิดลักษณะเฉพาะเป็น เซลล์ 4 เซลล์ติดกันคล้ายจัตุรัส (tetrad formation) ในปัจจุบันประกอบด้วย 6 สปีชีส์ ได้แก่ *P. acidilactici P. damonosus P. dextrinicus P. inopinatus P. parvulus* และ *P. pentosaceus* (Stiles and Hozapfel, 1997) สามารถเจริญเติบโตได้ดีในที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย และในที่มีเกลือ 6-8% (โดย สามารถทนเกลือมากกว่า 15%) ไม่สร้างสปอร์ มีความต้องการกรดอะมิโน และสารเร่งการ เจริญเติบโต เช่น ไรโบฟลาวิน (riboflavin) ไพริดอกซิน (pyridoxine) เพนทาโทนิกแอซิก (pentatonic acid) ในการเจริญเติบโต (Dellaglio and Torriani, 1995)

Bacillus subtilis เป็นแบคทีเรียแกรมบวก สามารถสร้างสปอร์ เมื่ออยู่ในสภาวะที่ ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต เจริญได้ดีในที่ที่มีออกซิเจน (aerobic) และอุณหภูมิปานกลาง (Trickett, 1978) เป็นจุลินทรีย์ที่พบได้ในสิ่งแวดล้อม ส่วนใหญ่อยู่ในแหล่งน้ำ และอาหาร พบได้ ทั่วไปในดิน เจริญเติบโตได้โดยใช้สารอาหารจากการย่อยสลายของ ซากพืช ซากสัตว์ และอื่น ๆ (Sanders, Morelli and Tompkins, 2003) แบคทีเรียจำพวก *B. subtilis* สร้างและหลั่งเอนไซม์ (amylase และprotease) ออกจากเซลล์ได้ นำไปสู่การเพิ่มการย่อย และการดูดซึมสารอาหาร (Ghosh, Sinha and Sahu, 2008)

2.3.3 ผลของการใช้โปรไบโอติคในสัตว์น้ำ

สัตว์น้ำเมื่ออยู่ในระยะวัยอ่อนที่จะต้องดำรงชีวิตอยู่อย่างอิสระในสภาพแวดล้อม หรือ บ่อเลี้ยง มีความจำเป็นที่จะต้องกินอาหารเพื่อการอยู่รอดทันที และมักประสบปัญหาเรื่องเกี่ยวกับ ระบบทางเดินอาหาร ได้แก่ การติดเชื้อก่อโรคในลำไส้ และเกิดภาวะไม่สมดุลระหว่างเชื้อที่มี ประโยชน์และไม่มีประโยชน์เกิดขึ้น สภาวะดังกล่าวมักพบว่าเชื้อที่ไม่มีประโยชน์รวมถึงเชื้อก่อโรค ต่าง ๆ จะมีมากกว่าเชื้อที่มีประโยชน์หรืออาจเรียกภาวะที่เกิดขึ้นว่า microbiotassociated disorder จึง ทำให้อัตราการรอดตายของสัตว์เลี้ยงต่ำ โดยสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดภาวะนี้ก็คือ สัตว์น้ำวัยอ่อนมี ระบบทางเดินอาหารที่ยังไม่พัฒนาเต็มที่ แต่จะต้องมีการใช้งานทันทีเมื่อดำรงชีวิตอิสระใน สภาพแวดล้อมเพื่อการอยู่รอด (Timmermans, 1987) และระบบภูมิคุ้มกันยังพัฒนาไม่สมบูรณ์เต็มที่ (Vadstein, 1997) การเสริมจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งในระยะนี้ เพื่อทำให้อัตรา การรอดชีวิตของสัตว์น้ำสูงขึ้นได้ (Gatesoupe, 1999) รูปแบบของโปรไบโอติคที่ใช้ในอาหารสัตว์ แบ่งออกเป็น 3 รูปแบบ (Valerie, Micheline and Vernoux, 2004) คือ

- เสริมอาหารในรูป feed additive โดยเสริมที่ปริมาณ 10^{10} CFU/g
- เสริมอาหารในรูป premixtures โดยเสริมที่ปริมาณ 10^{8} CFU/g
- ผสมในอาหารสัตว์ในรูปอาหารอัดเม็ด และอาหารผง โดยเสริมที่ปริมาณ 10^{6} CFU/g

โดยทั่วไปจะพบการเสริมโปรไบโอติคในรูปผง ซึ่งโปรไบโอติคสำหรับสัตว์ที่ใช้ส่วนใหญ่จะเป็นแบคทีเรียแกรมบวก และสายพันธุ์หลัก ๆ ที่เสริมในอาหารสัตว์ในปัจจุบัน (ดังตารางที่ 2.2)

ตารางที่ 2.2 ตัวอย่างโปรไบโอติคที่เสริมในอาหารสัตว์

โปรไบโอติค	สายพันธุ์
Bacillus	*B. licheniformis, B. subtilis*
Enterococcus	*E. Faecium, E. faecalis*
Lactobacillus	*L. acidophilus, L. casei, L. farciminis, L. plantarum, L. rhamnosus, L. bulgaricus, L. lactis*
Pediococcus	*P. acidilactici, P. pentosaceus*
Streptococcus	*S. infantarius, S. cremoris*
Bifidobacterium	*B. bifidum, B. longum, B. thermophilum*
Propionibacterium	*P. freudenreichii* subsp., *P. frendenreichii PFF-6*
Lactococcus	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
ยีสต์(yeast) และรา (fungi)	*Aspergillus, Saccharomyces cerevisiae, Kluyveromyces*

ที่มา : (Anadon, Martinez-Larranaga, and Aranzazu-Martinez, 2006; Simpson, Fitzgerald, Stanton and Ross, 2004)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

2.3.3.1 ผลของการใช้โปรไบโอติคต่อการเจริญเติบโต

จากการศึกษาการเสริมโปรไบโอติคในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ต่อการเจริญเติบโต (ดังตารางที่ 2.4) พบว่า การเสริมโปรไบโอติคในอาหาร ที่ระดับ 10^{6}-10^{9} CFU/g สามารถเพิ่มสมรรถนะการเจริญเติบโตของปลา และกุ้งให้สูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Ziaei-Nejad et al., 2006; Castex et al., 2008; Far et al., 2009; Boonthai et al., 2011) แบคทีเรียบางชนิดสามารถผลิตน้ำย่อยช่วยย่อยอาหาร ส่งผลทำให้กุ้งสามารถดูดซึมสารอาหารไปใช้ได้เร็วส่งผลทำให้กุ้งมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น แต่อย่างไรก็ตามมีบางรายงานที่พบว่า การเสริมโปรไบโอติคไม่ส่งผลต่อการเจริญเติบโต เช่นจากการศึกษาของ Castex et al., 2008 และ Merrifield et al., 2010 พบว่า กุ้ง และปลาเรนโบว์เทราห์ที่ได้รับการเสริม *P. acidilactici* ในอาหารที่ระดับ 10^{7}-10^{8} CFU/g มีอัตราการเจริญเติบโตไม่แตกต่าง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังนั้นจากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการ

เสริมโปรไบโอติคในสัตว์น้ำต่อการเจริญเติบโตยังมีความไม่แน่นอน ขึ้นอยู่กับ ชนิดของโปรไบโอติค ระยะเวลาที่สัตว์น้ำได้รับโปรไบโอติค รูปแบบของโปรไบโอติค สภาพแวดล้อมในการเลี้ยงและสายพันธุ์ของสัตว์ที่แตกต่างกัน จึงส่งผลทำให้ผลของการเสริมโปรไบโอติคในสัตว์น้ำต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน

2.3.3.2 ผลของการใช้โปรไบโอติคต่อประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้

จากการศึกษาการเสริมโปรไบโอติคในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ต่อประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ (ดังตารางที่ 2.5) พบว่า การเสริมโปรไบโอติค *Bacillus* และ *P. acidilactici* ในอาหาร ที่ระดับ 10^6-10^9 CFU/g สามารถลดปริมาณเชื้อ *Vibrio* spp. และสามารถเพิ่มแบคทีเรียที่ผลิตแลคติค (lactic acid bacteria) ได้สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (ยุทธพล คงกระจ่าง และ นงนุช เลาหะวิสุทธิ์.,2549; ศจีนา เลาหวิวัฒนกุล และ มังกร โรจน์ประภากร,2549; Ziaei-Nejad et al., 2006; Ferguson, Merrifield, Harper, Rawling, Mustafa, Picchietti, Balcazar and Davies, 2010; Boonthai, Vuthiphandchai and Nimrat, 2011) เนื่องจาก โปรไบโอติคจะช่วยปรับสมดุลของจุลินทรีย์ภายในระบบทางเดินอาหาร โดยจะเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ และลดจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค โดยการสร้างกรด (lactic acid) ของแบคทีเรียในบริเวณลำไส้ทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ลดต่ำลง ส่งผลให้เกิดสภาวะไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค สามารถช่วยเพิ่มภูมิต้านทานในสัตว์น้ำได้ และแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติค (lactic acid bacteria) บางสายพันธุ์สามารถผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียที่เรียกว่า antimicrobial มาช่วยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคได้ ดังนั้นจึงส่งผลทำให้ปริมาณแบคทีเรียก่อโรคมีปริมาณลดลงได้

2.3.3.3 ผลของการใช้โปรไบโอติคต่อองค์ประกอบทางเคมีในเนื้อ

จากการศึกษาผลของการเสริมโปรไบโอติคต่อองค์ประกอบทางเคมีในเนื้อ (ดังตารางที่ 2.6) พบว่า การเสริม *Bacillus* spp. ที่ระดับ 10^7-10^9 CFU/g สามารถเพิ่มปริมาณโปรตีน และลดปริมาณไขมันในเนื้อได้สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาใน ปลาเรนโบว์เทราท์ (Tahere, Hedayati, Vahid, Morteza and Ali, 2008) และกุ้งขาว (Yanbo, Linglin and Junda, 2012) แต่อย่างไรก็ตามมีบางรายงานที่พบว่า การเสริมโปรไบโอติคไม่ส่งผลกระทบต่อค่าองค์ประกอบทางเคมีในเนื้อปลา (Ghosh, Sinha and Sahu, 2008; Merrifield, Bradley, Harper, Baker, Munn and Davies, 2011)

2.3.3.4 ผลของการใช้โปรไบโอติคต่อความสูงของวิลไล

จากการศึกษาผลของการเสริมโปรไบโอติคต่อความสูงของวิลไล (ดังตารางที่ 2.3) พบว่า การเสริม *Bacillus* spp. และ *P. acidilactici* ที่ระดับ 10^7-10^9 CFU/g สามารถเพิ่มความสูงของวิลไลในลูกหมูหย่านม (Di Giancamillo, Vitari, Savoini, Bontempo, Bersani, Dell'Orto and Domeneghini, 2008) ปลาเรนโบว์เทราท์ (Merrifield, Bradley, Baker and Davies, 2010) ได้สูงกว่า

เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่อย่างไรก็ตามการเสริมโปรไบโอติคในลำไส้ปลาเรดซีบีม (Ferguson et al., 2010) พบว่า ไม่ส่งผลกระทบต่อความสูงของวิลไล แต่การศึกษาในกุ้งยังไม่มีรายงานการศึกษาที่ชัดเจน

2.3.3.5 ผลของการใช้โปรไบโอติคต่อค่าเคมีในเลือด

ค่าทางโลหิตวิทยาเป็นตัวแปรที่มีความสำคัญที่ใช้ประเมินสภาพทางกายภาพและชีวภาพของสัตว์น้ำ การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของเลือดขึ้นอยู่กับชนิด สายพันธุ์ อายุ และสุขภาพของสัตว์น้ำ การเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อม ไม่ว่าจะเป็นอุณหภูมิ สารพิษที่ปนเปื้อน การให้อาหารหรือวิตามินเสริมหรือความผิดปกติในระบบใดระบบหนึ่งของร่างกายจะส่งผลกระทบต่อองค์ประกอบของเลือด (Hrubec, Cardinale and Smith, 2000) ดังนั้นการศึกษาค่าโลหิตวิทยาบางประการจึงสามารถใช้เป็นข้อมูลบ่งชี้ถึงการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของสัตว์น้ำได้ และพบว่าการเสริมโปรไบโอติคในอาหารส่งผลทำให้ค่ากลูโคส (glucose) และค่าคลอเลสเตอรอล (cholesterol) ลดลงในกุ้งขาวแวนนาไมด์ (Al-Dohail, Hashim and Aliyu-Paiko, 2009) และปลาดุก (Jorge, Leonel, Paniagua-Michel and Rosalia, 2011) และนอกจากนี้การเสริมโปรไบโอติคในอาหารส่งผลทำให้ค่าโปรตีน (protein) และไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) ในเลือดเพิ่มขึ้นในกุ้งขาวแวนนาไมด์ (Yu, Li, Lin, Wen and Ma, 2008)

2.3.4.6 ผลของการใช้โปรไบโอติคต่อค่าภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ

ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีการใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติคกันอย่างแพร่หลาย เนื่องจาก จุลินทรีย์โปรไบโอติคมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค โดยการเข้าไปแย่งพื้นที่ยึดเกาะภายในลำไส้ ช่วยปรับปรุงคุณภาพน้ำให้ดีขึ้น และยังสามารถเพิ่มภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำให้ดีขึ้น (Heyman and Menard, 2002; Laurent, Geert, Patrick and Willy, 2000) ซึ่งจากการศึกษาผลของการเสริมโปรไบโอติคต่อค่าภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (ดังตารางที่ 2.8) พบว่า การเสริม *Bacillus* spp. และ *Lactobacillus* spp. ส่งผลทำให้ค่า respiratory burst activity, lysozyme, phagocytic activity และperoxidase assay เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Panigrahi, Kiron, Kobayashi, Puangkaew, Satoh and Sugita, 2004; Salinas, Cuesta, Esteban and Meseguer, 2005; Nayak, Swain and Mukherjee, 2007; Newaj-Fyzul, Adesiyun, Mutani, Ramsubhag, Brunt and Austin, 2007; Kumar, Mukherjee, Ranjan and Nayak, 2008; Xuxia, Ziqiang, Yanbo and Weifen, 2009) อาจเกิดจากเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) ที่เป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมบวกเป็นตัวกระตุ้นภูมิคุ้มกัน มีผลทำให้ระดับภูมิคุ้มกันของเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับ Itami, Takahashi, Tsuchihira and Igusa (1994) ศึกษาประสิทธิภาพของเปปติโดไกลเคน (peptidoglycan) จาก *Bifidobacterium thermophilum* ในกุ้ง *P. japonicas* พบว่า กุ้งที่ได้รับอาหารผสมเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) มีค่า phagocytic index สูง

กว่ากลุ่มควบคุม และยังมีความต้านทานโรคสูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเหนี่ยวนำด้วยเชื้อ *V. penaeicida* และไวรัส แต่อย่างไรก็ตามมีบางการรายงาน พบว่า การเสริมโปรไบโอติคไม่มีผลต่อค่า respiratory burst activity ในกุ้งขาว (Panigrahi et al., 2004; Aly, Abdel-Galil, Abdel-Aziz and Mohamed, 2008)

ดังนั้นจากการศึกษาการเสริมโปรไบโอติคในอาหารสัตว์ พบว่า การเสริมโปรไบโอติคในอาหารสัตว์สามารถปรับปรุงการเจริญเติบโต (Ziaei-Nejad et al., 2006; Castex et al., 2008; Far et al., 2009; Boonthai, Vuthiphandchai and Nimrat, 2011) ช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรคได้ (ยุทธพล คงกระจ่าง และ นงนุช เลาหะวิสุทธิ์, 2549; ศจีนา เลาหวิวัฒนกุล และ มังกร โรจน์ประภากร, 2549; Moriarty, 1997; Ziaei-Nejad et al., 2006; Ferguson et al., 2010; Boonthai, Vuthiphandchai and Nimrat, 2011) แต่อย่างไรก็ตามมีบางการศึกษาซึ่งพบว่า การเสริมโปรไบโอติคไม่ส่งผลต่อการปรับปรุงการเจริญเติบโต (Castex et al., 2008; Merrifield et al., 2010) ค่าองค์ประกอบทางเคมีในเนื้อ (Ghosh, Sinha and Sahu, 2008; Merrifield et al., 2011) ความสูงของวิลไลในลำไส้ (Ferguson et al., 2010) และค่าภูมิคุ้มกัน (Panigrahi et al., 2004; Aly et al., 2008) ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาการเสริมโปรไบโอติคเพิ่มเติมในสัตว์แต่ละชนิด เพื่อให้ทราบถึงปริมาณ และระยะเวลาที่เหมาะสมในการเสริมในอาหารสัตว์แต่ละชนิด

ตารางที่ 2.3 ผลของการเสริมโปรไบติคต่อความสูงของวิลไลในลำไส้

โปรไบโอติค	**สัตว์ทดลอง**	**ปริมาณที่ใช้ (CFU/g)**	**ความสูงของวิลไล (um)**	**อ้างอิง**
P. acidilactici	Weaning piglets	Control 10^9	300^a 327^b	Di Giancamillo et al. (2008)
P.acidilactici *Bacillus* spp. *E. faecium*	*Oncorhynchus mykiss*	Control 10^7	1.53 ± 0.31^a 1.99 ± 0.20^b 1.51 ± 0.08^a 1.41 ± 0.22^a	Merrifield et al. (2010)
P. acidilactici	*Oreochromis niloticus*	Control 10^7	3.34 ± 1.54 4.31 ± 0.28	Ferguson et al. (2010)

ตารางที่ 2.4 ผลของการเสริมโปรไบโอติคต่อการเจริญเติบโตในสัตว์น้ำ

โปรไบโอติค	ปริมาณที่ใช้ (CFU/g)	Initial weight (g)	Final weight (g)	Weight gain (g)	Survival rate%	FCR	อ้างอิง
control	0	-	12.26±0.37[b]	-	71.5±4.25[b]	1.98±0.06[a]	Ziaei-Nejad et al. (2006)
Bacillus 5 สายพันธุ์	10^6	-	13.22±0.48[ab]	-	82.25±6.08[ab]	1.87±0.06[ab]	
Bacillus 5 สายพันธุ์		-	14.31±0.28[a]	-	88.53±1.71[a]	1.73±0.07[b]	
B. subtilis		4.40±0.37[a]	9.07±0.3[a]	-	75.5±4.62[a]	2.61±0.14[a]	Far et al. (2009)
B. subtilis +โปรไบโอติคทางการค้า	10^{10}	3.89±0.44[a]	8.38±0.77[a]	-	59.5±5.97[b]	3.16±0.52[a]	
โปรไบโอติคการค้า		3.97±0.48[a]	7.39±1.02[a]	-	60.4.32[b]	3.80±1.17[a]	
control	0	4.01±0.42[a]	8.49±0.76[a]	-	45.5±9.98[c]	3.06±0.8[a]	
control	0	-	-	8.90±3.05[b]	81.67±0.58[b]	2.11±0.03[a]	Boonthai, Vuthiphandchai and Nimrat (2011)
Baccilus Live-sprayed	10^9	-	-	12.11±3.97[a]	91.68±1.15[a]	1.78±0.09[b]	
Baccilus Freeze-dried		-	-	10.17±4.23[a]	90±1.00[a]	1.86±0.02[b]	
control	0	9.32±0.04	37.97±4.23	28.65±4.19	95.45±4.55	1.01±0.08	Merrifield et al. (2010)
P. acidilactici	10^7-10^8	9.32±0.11	38.17±1.05	28.85±0.95	98.48±2.62	1.01±0.02	
		9.28±0.07	38.19±0.89	28.91±0.95	96.97±5.25	1.01±0.03	
		9.25±0.08	39.54±1.20	30.29±1.23	98.48±2.62	0.99±0.03	
		9.23±0.05	38.14±2.59	28.91±2.56	100.00±00	1.00±0.06	

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 2.5 ผลของการเสริมโปรไบโอติคต่อประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้

โปรไบโอติค	สัตว์ทดลอง	ปริมาณที่ใช้	Total viable counts (log CFU/g)	Lactic acid bacteria (log CFU/g)	*Vibiro* spp. (log CFU/g)	อ้างอิง
Lactobacillus spp.	*Penaeus monodon*	Control	1.49×10^{7}	-	2×10^{2}	ศจีนา และมังกร (2549)
		10^{9}	1.72×10^{6}	1.81×10^{3}	-	
			1.72×10^{7}	2.23×10^{4}	-	
			1.40×10^{7}	9.65×10^{4}	2×10^{1}	
			1.16×10^{6}	3.40×10^{4}	3.80×10^{1}	
			1.73×10^{6}	7.60×10^{3}	7.50×10^{1}	
Bacillus	*Fenneropenaeus indicus*	Control	19 ± 0.5^{a}	-	-	Ziaei-Nejad et al. (2006)
		10^{6}	19.3 ± 0.3^{a}	2.1 ± 0.1^{a}	-	
			19 ± 0.6^{a}	2.8 ± 0.1^{a}	-	
P. acidilactici	*Onchorhynchus mykiss*	Control	8.14	-	-	Merrifield et al. (2010)
		10^{7}	7.58	5.28	-	
		10^{8}	8.03	5.93	-	
		10^{7}	8.64	5.64	-	
Bacillus	*Penaeus monodon*	Control	1.15 ± 0.64^{a}	1.23 ± 0.80^{a}	21.72 ± 4.85^{b}	Boonthai, Vuthiphandchai and Nimrat (2011)
		10^{9}	1.32 ± 0.68^{a}	73.45 ± 8.89^{b}	10.23 ± 2.40^{a}	
			1.05 ± 0.52^{a}	70.43 ± 9.05^{b}	13.59 ± 4.23^{ab}	

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 2.6 ผลของการเสริมโปรไบโอติคต่อองค์ประกอบทางเคมีในเนื้อ

โปรไบโอติค	สัตว์ทดลอง	ปริมาณที่ใช้	ความชื้น (%)	โปรตีน (%)	ไขมัน (%)	เถ้า (%)	อ้างอิง
Bacillus spp.	*Onchorhynchus mykiss*	Control	74.7±1.4	10.3±0.1^{d}	10.1±0.2^{a}	-	Bagheri et al. (2008)
		4.8×10^{8}	71.9±0.5	10.8±0.2^{d}	9.0±0.1^{b}	-	
		1.2×10^{9}	73.4±0.4	11.9±0.1^{cd}	8.9±0.1^{b}	-	
		2.01×10^{9}	69.9±0.1	13.7±0.3^{b}	7.8±0.1^{bc}	-	
		3.8×10^{9}	67.8±0.7	15.0±0.3^{a}	6.5±0.1^{c}	-	
		6.1×10^{9}	69.98±0.5	12.1±0.3^{b}	5.9±0.0^{d}	-	
Bacillus spp.	*Poecilia sphenops*	Control	72.7±2.3^{a}	48.7±5.7^{a}	19.5±3^{a}	37.6±1.9^{a}	Ghosh et al. (2008)
		5×10^{8}	71±2.6^{a}	50.6±6.2^{a}	19.8±3.3^{a}	39.1±1.1^{a}	
		5×10^{7}	71.1±2.2^{a}	50.1±7.9^{a}	19.8±2^{a}	38.3±1.7^{a}	
		5×10^{6}	71.5±3.1^{a}	49.5±5.7^{a}	19.7±2.9^{a}	37.5±2^{a}	
		5×10^{5}	71.9±1.8^{a}	49.6±7.3^{a}	20.2±4.4^{a}	37.6±1.6^{a}	
Bacillus spp.	*Litopenaeus vannamei*	Control	76.98±1.64	18.63±1.83	2.34±0.11^{a}	1.37±0.13	Yanbo, Linglin and Junda (2012)
		10^{7}	75.53±0.79	19.82±1.77	1.94±0.12^{b}	1.46±0.11	
			76.26±1.38	18.38±2.13	2.15±0.12^{ab}	1.42±0.13	

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 2.7 ผลของการเสริมโปรไบโอติคต่อค่าเคมีในเลือด

โปรไบโอติค	สัตว์ทดลอง	ปริมาณที่ใช้	กลูโคส (mmol/L)	คอเลสเตอรอล (mmol/L)	ไตรกลีเซอไรด์ (mmol/L)	โปรตีน (mg/ml)	อ้างอิง
Bacillus	*Litopenaeus vannamei*	0	3.20±0.73^{a}	1.04±0.04^{b}	0.21±0.01^{ab}	3.17±0.03^{a}	Yu et al. (2008)
		0.10%	3.77±0.79^{ab}	0.85±0.05^{a}	0.26±0.01^{b}	3.33±0.02^{bc}	
		0.20%	4.18±0.19^{ab}	1.29±0.04^{c}	0.25±0.01^{b}	3.22±0.05^{ab}	
		0.30%	4.31±0.13^{ab}	1.22±0.08^{c}	0.28±0.02^{b}	3.40±0.06^{c}	
B. subtilis *B. megaterium*	*Litopenaeus vannamei*	0	0.675±0.02^{b}	0.323±0.08^{b}	-	-	Jorge, Leonel, Paniagua-Michel and Rosalia (2011)
		10^{4}	0.483±0.03^{a}	0.159±0.01^{a}	-	-	
			0.452±0.03^{a}	0.163±0.03^{a}	-	-	
L. acidophilus	*Clarias gariepinus*	0	0.26±2.10^{b}	5.31±3.02^{b}	-	3.58±0.04^{a}	Dohail et al. (2009)
		10^{7}	0.24±1.43^{a}	4.67±3.26^{a}	-	3.80±0.08^{b}	

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 2.8 ผลของการเสริมโปรไบโอติคต่อค่าภูมิคุ้มกัน

โปรไบโอติค	รูปแบบของโปรไบโอติค	วิธีการเสริมโปรไบโอติค	ผลการทดลอง	อ้างอิง
L. rhamnosus	มีชีวิต	ชนิดเดียว	Phagocytic activity (↑), Respiratory burst activity (↑↓)	Panigrahi et al. (2004)
L. rhamnosus	มีชีวิต	ชนิดเดียว	respiratory burst activity (↑↓), lysozyme (↑↓)	Panigrahi et al. (2005)
L. delbrueckii, B. subtilis	มีชีวิต	ชนิดเดียว และการใช้ร่วมกัน	phagocytic activity (↑I), respiratory burst activity (↑↓), peroxidase assay (↑↓)	Salinas et al. (2005)
B. subtilis	มีชีวิต	ชนิดเดียว	lysozyme (↑), respiratory burst activity (↑)	Nayak et al. (2007)
B. subtilis	มีชีวิต	ชนิดเดียว	lysozyme (↑), respiratory burst activity (↑), peroxidase assay (↑)	Newaj-Fyzul et al. (2007)
B. subtilis	มีชีวิต	ชนิดเดียว	respiratory burst activity (↑), serum bactericidal activity (↑)	Kumar et al. (2008)
B. subtilis, L. acidophilus	มีชีวิต	ชนิดเดียว และการใช้ร่วมกัน	respiratory burst activity (↑↓), lysozyme (↑)	Aly et al.(2008)
B. coagulans, B. subtilis	มีชีวิต	ชนิดเดียว	respiratory burst activity (↑), lysozyme (↑↓)	Xuxia, Ziqiang, Yanbo and Weifen (2009)

หมายเหตุ : ↑ : เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ, ↑↓ : ไม่เปลี่ยนแปลง และ I : การใช้ชนิดเดียว

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อโปรไบโอติคผ่านสู่ระบบทางเดินอาหารที่มีสภาวะเป็นกรด ความสามารถในการรอดชีวิตของโปรไบโอติคอาจลดจำนวนลงจนอยู่ในระดับที่ไม่มีประโยชน์ใด ๆ ต่อร่างกาย (Chandramouli et al., 2004) สอดคล้องกับการศึกษาของ Misra, Das, Mukherjee and Pattnaik (2005) พบว่า ความสามารถในการรอดชีวิตของ *Lactobacillus* 7 สายพันธุ์ในสภาวะต่าง ๆ ที่ pH 1 หลังจากการบ่มเชื้อนาน 1 ชั่วโมง ตรวจไม่พบการรอดชีวิตของ *Lactobacillus* ทั้ง 7 สายพันธุ์ แต่เมื่อ pH เพิ่มสูงขึ้นเป็น 2 และ 3 *Lactobacillus* ทั้ง 7 สายพันธุ์ มีการรอดชีวิตเพิ่มสูงขึ้น โดยเฉพาะที่ pH 3 แม้ว่าจะบ่มเชื้อไว้ 3 ชั่วโมง *Lactobacillus* ทั้ง 7 สายพันธุ์ยังคงรอดชีวิตได้ และเมื่อศึกษาผลของเกลือน้ำดี พบว่า เมื่อความเข้มข้นของเกลือน้ำดีเพิ่มขึ้นการรอดชีวิตของ *Lactobacillus* ทั้ง 7 สายพันธุ์ ลดลง และการรอดชีวิตของ *Lactobacillus* ทั้ง 7 สายพันธุ์ ยังขึ้นกับระยะเวลาที่ *Lactobacillus* ทั้ง 7 สายพันธุ์ สัมผัสกับน้ำดีด้วย เช่นเดียวกับการทดลองของ Maragkoudakis et al. (2006) ทดสอบการทนต่อกรดและเกลือน้ำดีของ *Lactobacillus* 29 สายพันธุ์ พบว่าที่ pH 3 ทุกสายพันธุ์รอดชีวิตหลังจากการบ่มไว้ 3 ชั่วโมง ในขณะที่ pH 2 มี 16 สายพันธุ์ที่รอดชีวิตเมื่อบ่มนาน 3 ชั่วโมง *Lactobacillus* มีการรอดชีวิตน้อยที่สุดที่ pH 1 พบว่า หลังจากการบ่มเพียง 1 ชั่วโมง มีเพียง 6 สายพันธุ์เท่านั้นที่รอดชีวิต เมื่อทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดีความเข้มข้น 0.3% ที่ pH 8.0 พบว่ามี *Lactobacillus* 13 สายพันธุ์ที่สามารถรอดชีวิตได้ ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาถึงวิธีการเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของโปรไบโอติค โดยเทคนิคที่ได้รับการศึกษาอย่างแพร่หลายคือ encapsulation techniques ซึ่งส่งผลทำให้ความสามารถในการรอดชีวิตโปรไบโอติคในสภาวะที่ไม่เหมาะสมเพิ่มสูงขึ้น

2.4 เอ็นแคปซูเลชั่น (Encapsulation)

เอ็นแคปซูเลชั่น(encapsulation) หมายถึง กระบวนการที่สารหรือส่วนผสมของสารถูกเคลือบด้วยสารชนิดอื่น โดยสารที่ถูกเคลือบ (coated) หรือถูกยึดจับไว้ (entrapped) ส่วนใหญ่จะเป็นของเหลว แต่บางครั้งอาจเป็นอนุภาคของแข็งหรือก๊าซ ซึ่งจะเรียกชื่อแตกต่างกันไป เช่น core material หรือ internal phase สารที่นำมาเคลือบจะเรียกว่า wall material, carrier, membrane, shell หรือ coating ซึ่งเป็นเทคนิคที่ได้รับการศึกษาในการป้องกันโปรไบโอติคจากสภาวะแวดล้อมที่มีผลต่อการรอดชีวิตของโปรไบโอติค เนื่องจาก เม็ดเจลภายนอกสามารถปกป้องอันตรายให้กับเซลล์ที่อยู่ภายในจากสภาวะต่าง ๆได้ (Kailasapathy, 2006) นอกจากการทำ micro encapsulation จะช่วยเพิ่มการรอดชีวิตของโปรไบโอติคในระบบทางเดินอาหารแล้วยังช่วยป้องกันเซลล์แบคทีเรียจาก bacteriophages และช่วยเพิ่มการรอดชีวิตระหว่างการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze drying) (Wunwisa, Bhesh and Hilton, 2003) เทคนิคในการทำ microencapsulation ที่ประยุกต์มาใช้กับโปรไบโอติคสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ extrusion technique (droplet method) และ emulsion technique (two phase system)

- Extrusion technique (droplet method) เป็นวิธีการดั้งเดิม และใช้กันโดยทั่วไปในการทำเม็ดเจลด้วยไฮโดรคอลลอยด์ (hydrocolloid) ทำโดยการเตรียมสารละลายไฮโดรคอลลอยด์ (hydrocolloid) แล้วจึงเติมเซลล์แบคทีเรียลงไปผสมกัน และใช้วิธีการปล่อยเซลล์ผ่านหัวเข็มฉีดยาให้มีลักษณะเป็นหยด ลงไปในสารละลายสำหรับทำให้เจลแข็งตัว (hardening solution) ซึ่งขนาดและรูปร่างของเม็ดเจลขึ้นกับเส้นผ่านศูนย์กลางของเข็มฉีดยาที่ใช้ และความสูงของการหยดของเซลล์ลงใน สารละลายสำหรับทำให้เจลแข็งตัว (hardening solution) วิธีการนี้เป็นวิธีได้รับความนิยมเป็นอย่างมากเนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย ไม่ซับซ้อน ต้นทุนในการผลิตต่ำ และส่วนผสมที่ใช้มีสภาวะที่ไม่รุนแรงต่อเซลล์แบคทีเรีย จึงมีอัตราการรอดชีวิตได้สูง

- Emulsion technique (two phase system) เทคนิคนี้ใช้การเติมสารแขวนลอยของเชื้อในไฮโดรคอลลอยด์ (hydrocolloid) ปริมาตรเล็กน้อยลงในน้ำมันพืชที่มีปริมาตรมากกว่า น้ำมันพืชที่ใช้ เช่น น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันทานตะวัน น้ำมันคาโนล่าหรือน้ำมันข้าวโพด เป็นต้น ส่วนผสมจะถูกตีปั่นจนอยู่ในรูปอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (water in oil emulsion) จากนั้นจึงเติมสารละลายสำหรับทำให้เจลแข็งตัว (hardening solution) ลงไป ซึ่งส่วนใหญ่แล้วนั้นจะใช้สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) สำหรับขนาดของเม็ดเจลที่เกิดขึ้น ขึ้นอยู่กับความเร็วในการตีปั่น ชนิด และความเข้มข้นของไฮโดรคอลลอยด์ (hydrocolloid) (Wunwisa, Bhesh and Hilton, 2003)

2.4.1 ผลของการทำเอ็นแคปซูเลชั่นในจุลินทรีย์

จากการรวบรวมเอกสารผลของการทำเอ็นแคปซูเลชั่น (encapsulation) ในเซลล์จุลินทรีย์ (ดังตารางที่ 2.9) พบว่า สารที่นิยมนำมาใช้เคลือบภายนอก เช่น sodium alginate และโปรตีนจากนม (milk protein) ซึ่งจากการศึกษาการทำเอ็นแคปซูเลชั่น (encapsulation) ในเซลล์จุลินทรีย์ *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* สามารถเพิ่มอัตรารอดของเซลล์จุลินทรีย์ ได้สูงกว่าเมื่อเทียบกับเซลล์จุลินทรีย์ที่ไม่ได้ทำเอ็นแคปซูเลชั่น (encapsulation) ภายใต้สภาวะที่มีการจำลองระบบย่อยอาหาร (มังกร โรจน์ประภากร และ อุไรลักษณ์ พงษ์เกษ, 2550; สุรีย์ นานาสมบัติ, พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์, ภารวิณี ยังเจริญยืนยง, ศศวรรณ ศรีบุญทรง และ ศิริวรรณ แซ่โง้ว, 2550; Chandramouli et al., 2004; Picot and Lacroix, 2004; Kima, Chob, Kimc, Songd, Shind, Chaa and Parke, 2008; Thomas, Petra and Ulrich, 2009) ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จึงได้กำหนดสารที่จะใช้เป็นสารใช้ห่อหุ้ม (wall) คือ โปรตีนจากนม (milk protein) เนื่องจาก ในงานวิจัยนี้จะนำนมส่วนเหลือจากโรงงานผลิตนม มาใช้ในการผลิตมหมักด้วยแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติค (lactic acid bacteria) เพื่อใช้ตรึงเซลล์เซลล์โปรไบโอติคในรูปเอ็นแคปซูเลชั่น (encapsulation) เพื่อผสมลงในอาหารกุ้งขาว และนอกจากนี้ยังมีความพยายามเพิ่มประสิทธิภาพของโปรไบโอติค โดยการเสริมสารเสริมสุขภาพ (feed additive) เช่น พรีไบโอติค (prebiotic) ลงไปในอาหาร เพื่อเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ส่งผลทำให้กุ้งขาวมีสุขภาพแข็งแรงขึ้น

ตารางที่ 2.9 ผลการทำเอ็นแคปซูเลชั่น (encapsulation) ในเซลล์จุลินทรีย์ต่ออัตราการรอดชีวิต

สารบรรจุภายใน (core)	สารที่ใช้ห่อหุ้ม (wall)	ผลการทดลอง	อ้างอิง
L. casei และ *Bifidobacterium*	sodium alginate	เซลล์ *L. casei* และ *Bifidobacterium* ที่ผ่านการปรับตัวต่อกรด และทำเอ็นแคปเลชั่น (encapsulation) จะมีอัตราการรอดในน้ำสลัดสูงกว่าเมื่อเทียบเซลล์ในรูปอิสระ	สุรีย์ และคณะ (2250)
L. plantaru LP64	sodium alginate	การใช้โซเดียมอัลจีเนต (sodium alginate) ที่ความเข้มข้น 3% มีประสิทธิภาพการห่อหุ้มเซลล์ และปลดปล่อยเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุด 96.57% ของปริมาณเชื้อเริ่มต้น	มังกร และอุไรลักษณ์ (2550)
Lactobacillus	sodium alginate	เซลล์ *Lactobacillus* ที่ผ่านการทำเอ็นแคปซูเลชั่น (encapsulation) จะมีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าเมื่อเทียบกับเซลล์ *Lactobacillus* ที่ไม่ได้ผ่านการทำเอ็นแคปซูเลชั่น (encapsulation)	Chandramouli et al. (2004)
Bifidobacterium breve RO70B *Bifidobacterium longum RO23*	whey protein	เซลล์ *B. breve* และ *B. longum* ที่ผ่านการทำเอ็นแคปซูเลชั่น (encapsulation) สามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิตได้สูงกว่าเมื่อเทียบกับเซลล์ในรูปอิสระ	Picot and Lacroix (2004)
L. cidophilus	sodium alginate	การทำเอ็นแคปซูเลชั่น (encapsulation) สามารถปรับปรุงอัตราการรอดของเชื้อ *L. acidophilus* ในสภาวะการจำลองระบบย่อยอาหารในกระเพาะอาหาร และลำไส้เล็กได้ เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้ผ่านการทำเอ็นแคปซูเลชั่น (encapsulation)	Kima et al. (2008)
L.paracasei *Bifidobacterium*	milk protein	การทำเอ็นแคปซูเลชั่น (encapsulation) สามารถปรับปรุงอัตรารอดของเชื้อ*L. Paracasei* และ *Bifidobacterium* ได้สูงกว่าเมื่อเทียบกับเซลล์อิสระที่ไม่ได้ทำแคปซูล หลังจากบ่มที่ pH 2.5 เป็นเวลา 90 นาที	Thomas, Petra and Ulrich (2009)

2.5 พรีไบโอติค (prebiotic)

พรีไบโอติคเป็นสารอาหารที่ไม่ถูกย่อย และไม่ดูดซึมในกระเพาะอาหาร และลำไส้เล็ก แต่แบคทีเรียบางกลุ่มที่อาศัยอยู่ในลำไส้ใหญ่สามารถหมักสารอาหารเหล่านั้น เพื่อใช้ในการเจริญเติบโต และมีผลต่อการส่งเสริมสุขภาพให้ดีขึ้น เช่น จุลินทรีย์กลุ่ม *Bifidobacterium Lactobacillus* และ *Eubacterium* (Manning, 2004) และบางชนิดมีตำแหน่งจำเพาะสำหรับจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค เช่น *Salmonella* และ *E.* coli ซึ่งต่อมาถูกกำจัดออกจากระบบทางเดินอาหารไปกับอุจจาระ

2.5.1 คุณสมบัติของพรีไบโอติค คือ

2.5.1.1 พรีไบโอติคสามารถเคลื่อนไปถึงลำไส้ได้โดยไม่ถูกย่อย และไม่ถูกดูดซึมในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก (Manning and Gibson, 2004; Kolida, Tuohy and Gibson, 2002)

2.5.1.2 พรีไบโอติคสามารถเกิดการหมักในลำไส้ใหญ่โดยแบคทีเรียที่มีประโยชน์ เช่น *Bifidobacterium* และ *Lactobacillus* (Kolida, Tuohy and Gibson, 2002)

2.5.1.3 พรีไบโอติคส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในระบบทางเดินอาหาร เช่น *Bifidobacterium* และ *Lactobacillus* เป็นต้น และไม่ส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อโรค เช่น *Clostidium perfrigens* เป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในลำไส้ได้ (Gibson and Roberfoid, 1995; Kolida, Tuohy and Gibson, 2002)

สารอาหารที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติคนั้นต้องสามารถทนต่อการย่อยของกรด และเอนไซม์ในกระเพาะอาหารจึงสามารถเคลื่อนที่ไปจนถึงลำไส้ได้โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลง และไม่ถูกดูดซึมในลำไส้เล็ก เพื่อใช้เป็นอาหารให้กับจุลินทรีย์ประจำถิ่น (microflora) ที่อาศัยอยู่ในลำไส้ใหญ่ ซึ่งสามารถใช้สารเหล่านี้ในการเจริญเติบโต และเพิ่มจำนวน (Manning and Gibson, 2004) และส่งผลให้สุขภาพของสัตว์ดีขึ้น

2.5.2 บทบาทของพรีไบโอติค

สารที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติคไม่ได้มีผลต่อสุขภาพ แต่จะใช้เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการหมักในลำไส้ใหญ่ โดยไปส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์โปรไบโอติคซึ่งแต่ละสายพันธุ์มีความสามารถผลิตผลผลิตจากกระบวนการหมักได้แตกต่างกัน

2.5.2.1 การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค โดยพรีไบโอติคจะไปกระตุ้นการเจริญเติบโตของแบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacillus* และ *Bifidobacteria* ให้มีการสร้างกรดเพิ่มขึ้น เช่น กรดไขมันสายสั้น (short chain fatty acid) ซึ่งมีผลทำให้ pH ในลำไส้ลดลง ส่งผลให้เกิดสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค (Moriarty, 1998)

2.5.2.2 พรีไบโอติคเพิ่มการดูดซึมแร่ธาตุ โดยกระบวนการหมักของสารพรีไบโอติคในลำไส้ใหญ่สามารถเพิ่มการดูดซึมของสารอาหาร และแร่ธาตุต่าง ๆ เช่น แคลเซียม (Ca) แมกนีเซียม

(Mg) สังกะสี (Zn) และเหล็ก (Fe) (Scholz-Ahrens, Schaafsma, van der Heuvel and Schrezenmerir, 2001)

2.5.2.3 มีการรายงานว่า พรีไบโอติคช่วยลดระดับคอเลสเตอรอล (cholesterol) เนื่องจาก ด้วยจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่ *L. acidophilus* ช่วยสลาย และยับยั้งการดูดซึมของคอเลสเตอรอล (cholesterol) ผ่านผนังลำไส้โดย

- สารกลุ่มกัวกัม (guar gum) และß-glucan ที่มีเส้นใยสูงจะสามารถลดการดูดซึมคอเลสเตอรอล (cholesterol) ได้ โดยลักษณะเหนียวหนืดของเส้นใยจะเคลือบผนังลำไส้ทำให้ความสามารถในการดูดซึมคอเลสเตอรอล (cholesterol) ลดลง

- กระบวนการหมักสารพรีไบโอติคในลำไส้ใหญ่จะเกิดผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นกรดไขมันสายสั้น พบว่า โพรพิโอเนท (propionate) สามารถไปลดการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลในเซลล์ตับได้ (Conway, 2001)

2.5.3 การใช้พรีไบโอติคในสัตว์น้ำ

การป้องกันโรคในสัตว์น้ำถือเป็นขั้นตอนสำคัญ ที่สามารถลดความสูญเสียจากปัญหาการเกิดโรคได้ รวมไปถึงการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ซึ่งจะช่วยเพิ่มความต้านทานให้ตัวสัตว์ และช่วยลดความสูญเสียจากการเกิดโรคติดเชื้อขึ้นได้ (Ratcliffe, Rowley, Fitzgerald and Rhodes, 1985) สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน คือ สารที่สัตว์ได้รับในปริมาณน้อย และมีผลในการทำให้เกิดความแข็งแรง มีภูมิคุ้มกันโรคสูงขึ้น เมื่อเชื้อโรคเข้าสู่ร่างกายก็จะสามารถป้องกันตัวเองได้ จึงลดปัญหาการเกิดโรคระบาดและการใช้ยาในเวลาเดียวกัน โดยในปัจจุบันมีการใช้สารเสริมสุขภาพซึ่งเป็นแนวทางหนึ่งที่จะช่วยให้กุ้งมีความแข็งแรงในสภาพการเลี้ยงแบบพัฒนา ปัจจุบันมีการศึกษาสารที่มีเกี่ยวข้องในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดยพบว่า เบต้ากลูแคน (ß-glucan) เป็นสารประเภทโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharides) ที่ละลายน้ำได้ ซึ่งพบในผนังเซลล์ของรา สาหร่าย โครงสร้างของเบต้ากลูแคน (ß-glucan) ประกอบด้วยส่วนที่เป็นโซ่หลัก มีการเรียงตัวต่อกันของกลูโคส (glucose) ที่ตำแหน่ง beta 1-3 และระหว่างโมเลกุลจะเชื่อมกันที่ตำแหน่ง beta 1-6 และนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) สกัดจากเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae*

2.5.3.1 ผลของการเสริมนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) และเบต้ากลูแคน (ß-glucan) ต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต

มีการรายงานผลการศึกษาการเสริมนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) และเบต้ากลูแคน (ß-glucan) ต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตในสัตว์น้ำ พบว่า การเสริมนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ที่ระดับ 0.1-0.2% ในปลา red drum (Peng, Gatlin and Neill, 2007; Cheng, Buentello and Gatlin, 2011) กุ้งกุลาดำ (Tahmasebi-Kohyani, Saeed, Amin, Nemat and Pasha-Zanoosi, 2012) และปลาเรนโบว์เทราห์ ส่งผลทำให้มีสมรรถนะการเจริญเติบโตเพิ่มสูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม เช่นเดียวกับการเสริมเบต้ากลูแคน (ß-glucan) ในอาหารปลากะพงขาว (Olioa-Teles amd Goncalves,

2001) ปลานิล (Whittington, Lim and Klesius, 2005; Abdel-Tawwab, Azza, Abdel-Rahman and Nahla, 2008) กุ้งขาว (Chotikachinda, Lapjatupon, Chaisilapasung, Sangsuel and Tantikitti, 2008) และ ปลาเรนโบว์เทราห์ (Sealey, Barrows, Hang, Johansen, Overturf, LaPatra and Hardy, 2008) พบว่า ส่งผลทำให้มีสมรรถนะการเจริญเติบโตสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมดังตารางที่ 2.11 แต่อย่างไรก็ตามมีการศึกษาบางการศึกษาที่พบว่า การเสริมนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) และเบต้ากลูแคน (ß-glucan) ไม่ส่งผลต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต (Whittington et al., 2005; Chotikachinda et al., 2008; Huua, Simon, Klaus, Peter, Lucasa and Barnes, 2012)

2.5.3.2 ผลของการเสริมนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) และเบต้ากลูแคน (ß-glucan) ต่อองค์ประกอบทางเคมีในเนื้อ

มีการรายงานผลการศึกษาการเสริมนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) และเบต้ากลูแคน (ß-glucan) ต่อองค์ประกอบทางเคมีในเนื้อ พบว่า การเสริมนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) (ดังตารางที่ 2.14) ไม่ส่งผลกระทบต่อปริมาณความชื้น โปรตีน และเถ้าในเนื้อ แต่ส่งผลทำให้ปริมาณไขมันเนื้อปลาเพิ่มสูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Peng and Gatlin, 2005; Oliva-Teles, Guedes, Vachot and Kaushik, 2006; Peng, Gatlin and Neill, 2007) และการเสริมเบต้ากลูแคน (ß-glucan) ในอาหาร (ดังตารางที่ 2.13) ส่งผลทำให้ปริมาณไขมันในเนื้อลดลง และเพิ่มปริมาณโปรตีนในเนื้อปลากะพงขาว (Abdel-Tawwab et al., 2008) และปลานิล (Olioa-Teles and Goncalves, 2001) แต่อย่างไรก็ตามมีการศึกษาที่พบว่า การเสริมนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) และเบต้ากลูแคน (ß-glucan) ในอาหารไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าองค์ประกอบทางเคมีในเนื้อปลา (Peng and Gatlin, 2003; Peng, Gatlin and Neill, 2007)

2.5.3.3 ผลของการเสริมนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) และเบต้ากลูแคน (ß-glucan) ต่อความสูงของวิลไลในลำไส้

มีการรายงานผลการศึกษาการเสริมนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) และเบต้ากลูแคน (ß-glucan) ต่อความสูงของวิลไลในลำไส้ (ดังตารางที่ 2.10) พบว่า การเสริมนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) และเบต้ากลูแคน (ß-glucan) ในอาหารส่งผลทำให้วิลไลในลำไส้ของหนู (Uauy, Stringel, Thomas and Quan, 1990) ปลาเรดดัม (Cheng, Buentello and Gatlin, 2011) ปลาเทอร์บอต (Mo, Wei, Qinghui, Kangsen, Zhiguo and Kaikai, 2013) และปลาไน (Kuhlwein, Emery, Rawling, Harper, Merrifield and Davies, 2013) เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

2.5.3.4 ผลของการเสริมนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) และเบต้ากลูแคน (ß-glucan) ต่อค่าภูมิคุ้มกัน

มีการรายงานผลศึกษาการเสริมนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) และเบต้ากลูแคน (ß-glucan) ต่อค่าภูมิคุ้มกัน (ดังตารางที่ 2.15) พบว่า การเสริมนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) และเบต้า

กลูแคน (ß-glucan) ในอาหารส่งผลทำให้ค่า prophenoloxidase, phagocytosis, respiratory burst, complement and lysozyme ในกุ้ง (Abdulaziz, Douglas, David, Stewart, Srinivas, Sajeevan, Rosamma and Singh, 2009; Nan, Wenbing, Kangsen, Xiaojie, Wei and Hongming, 2010) ปลาเรนโบว์เทราห์ (Burrells et al., 2001) ปลาซีเบส (Bonaldo et al., 2007) และปลาไน (Sakai et al., 2001; Kim et al., 2009) เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

2.5.3.5 ผลของการเสริมเบต้ากลูแคน (ß-glucan) ต่อค่าเคมีในเลือด

จากการศึกษาการเสริมเบต้ากลูแคน (ß-glucan) ต่อค่าเคมีในเลือด (ดังตารางที่ 2.16) พบว่า การเสริมเบต้ากลูแคน (ß-glucan) ในอาหารส่งผลทำให้ค่ากลูโคส (glucose) โปรตีน (protein) และคอเลสเตอรอล (cholesterol) ของปลา (Misra et al., 2006; Abdel-Tawwab et al., 2008) เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

ดังนั้นจากการศึกษาการเสริมนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) และเบต้ากลูแคน (ß-glucan) ในอาหารสัตว์ พบว่า การเสริมนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) และเบต้ากลูแคน (ß-glucan) ในอาหารสัตว์สามารถปรับปรุงการเจริญเติบโต (Whittington, Lim and Klesius, 2005; Abdel-Tawwab et al., 2008) เพิ่มความสูงของวิลไลในลำไส้ (Uauy et al., 1990; Cheng, Buentello and Gatlin, 2011; Kuhlwein et al., 2013; Mo et al., 2013) และช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Nan et al., 2010; Abdulaziz et al., 2009) แต่อย่างไรก็ตามมีบางการศึกษา ซึ่งพบว่า การเสริมนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) และเบต้ากลูแคน (ß-glucan) ไม่ส่งผลต่อการปรับปรุงการเจริญเติบโต (Whittington, Lim and Klesius, 2005; Chotikachinda et al., 2008; Huua et al., 2012) ค่าองค์ประกอบทางเคมีในเนื้อ (Peng and Gatlin, 2003; Peng, Gatlin and Neill, 2007) และค่าภูมิคุ้มกัน (Nikl, Albright and Evelyn, 1991) ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาการเสริมนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) และเบต้ากลูแคน (ß-glucan) เพิ่มเติมในสัตว์แต่ละชนิด เพื่อให้ทราบถึงปริมาณ และระยะเวลาที่เหมาะสมในการเสริมในอาหารสัตว์แต่ละชนิด

ตารางที่ 2.10 ผลของการเสริมนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) และเบต้ากลูแคน (ß-glucan) ต่อความสูงของวิลไลในลำไส้

สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน	สัตว์ทดลอง	ระดับ (%)	ความสูงของวิลไล (um)	อ้างอิง
Nucleotide	RAT	0	75±2.3[a]	Uauy et al. (1990)
		0.8	95±4.7[b]	
	Sciaenops ocellatus	0	1.8[a]	Cheng, Buentello and Gatlin (2011)
		0.5	1.7[b]	
		0.1	2[b]	
	Scophthalmus maximus	0	3.94[a]	Mo et al. (2013)
		0.03	4.41[b]	
		0.1	4.45[b]	
ß-glucan	*Cyprinus carpio*	0	1.32± 0.15[a]	Kuhlwein et al. (2013)
		0.1	1.46±0.15[a]	
		1	1.68±0.12[b]	

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 2.11 ผลของการเสริมนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตในสัตว์น้ำ

สารกระตุ้นมิคุ้มกัน	สัตว์ทดลอง	ระดับ (%)	Final weight (g)	Weight gain (g)	Survival rate %	อ้างอิง
Nucleotide	*Sciaenops ocellatus*	0	-	0.41±0.8[a]	-	Peng, Gatlin and Neill (2007)
		0.03	-	0.43±0.6[ab]	-	
		0.1	-	0.46±1.7[b]	-	
		0.2	-	0.46±0.6[b]	-	
		0.3	-	0.44±1.1[ab]	-	
	Penaeus monodon	0	11.82±0.66	-	96.67±1.36	Huua et al. (2012)
		0.1	13.05±0.32	-	96.67±1.36	
		0.2	12.4±0.78	-	100.0±0.00	
		0.4	13.19±1.02	-	96.97±1.36	
		0.8	12.81±0.26	-	95±2.26	
		1.6	12.68±0.38	-	98.33±1.18	
	Oncorhynchus mykiss	0	46.38±0.76[a]	0.99±8.76[a]	-	Tahmasebi-Kohyani et al. (2012)
		0.05	46.32±0.59[a]	0.99±6.59[a]	-	
		0.1	58.70±0.47[b]	1.52±9.34[b]	-	
		0.15	66.68±0.72[c]	1.88±7.78[c]	-	
		0.2	67.76±0.85[c]	1.92±5.43[c]	-	

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 2.12 ผลของการเสริมเบต้ากลูแคน (ß-glucan) ต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต

สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน	สัตว์ทดลอง	ระดับ (%)	Final weight (g)	Weight gain (g)	Survial rate (%)	FCR	อ้างอิง
Brewer's yeast	*Dicentrarchus labrax*	0	40.7±1.0^{ab}	-	-	1.48±0.01^{a}	Olioa-Teles and Goncalves (2001)
		10	42.8±0.4^{ab}	-	-	1.35±0.01^{bc}	
		20	42.9±0.8^{ab}	-	-	1.38±0.02^{b}	
		30	45.6±0.9^{b}	-	-	1.28±0.02^{c}	
		50	40.9±1.8^{ab}	-	-	1.42±0.0^{ab}	
	Nile tilapia	0	7.22±0.11^{d}	6.89±0.098^{d}	96.7±1.7^{a}	1.72±0.028^{a}	Abdel-Tawwab et al. (2008)
		0.25 g/kg	8.00±0.06^{c}	7.66±0.061^{c}	95.0±2.9^{a}	1.61±0.073^{ab}	
		0.5 g/kg	8.50±0.23^{bc}	8.16±0.228^{bc}	100.0±0.0^{a}	1.55±0.052^{b}	
		1 g/kg	9.90±0.29^{a}	9.57±0.028^{a}	95.0±2.9^{a}	1.48±0.034^{c}	
		2 g/kg	10.05±0.11^{a}	9.72±0.089^{a}	100.0±0.0^{a}	1.39±0.045^{cd}	
		5 g/kg	10.00±0.29^{a}	9.68±0.294^{a}	96.7±1.7^{a}	1.35±0.032^{d}	
	L. vannamei	0	11.21±0.95	0.04±0.92	-	2.19±0.57	Chotikachinda et al. (2008)
		1 g kg^{-1}	11.51±1.57	0.04±1.58	-	2.23±0.74	
		2 g kg^{-1}	12.28±0.68	0.05±0.70	-	1.75±0.23	

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 2.13 ผลของการเสริมเบต้ากลูแคน (ß-glucan) ต่อองค์ประกอบทางเคมีในเนื้อ

สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน	สัตว์ทดลอง	ระดับ (%)	ความชื้น (%)	โปรตีน (%)	ไขมัน (%)	เถ้า (%)	อ้างอิง
Brewer's yeast	*Dicentrarchus labrax*	0	69.9±1.4	15.0±0.2^{c}	12.1±0.8	3.8±0.3	Olioa-Teles and Goncalves (2001)
		10	69.0±0.1	16.3±0.2^{a}	11.8±0.6	3.6±0.1	
		20	69.5±0.6	16.2±0.1^{bc}	10.9±0.4	3.9±0.02	
		30	69.3±0.2	16.0±0.1^{bc}	11.6±0.6	3.8±0.1	
		50	69.2±0.1	16.0±0.1^{bc}	11.2±0.3	4.1±0.2	
	Hybrid striped bass	0	68.9	17.1	8.4	4.1	Peng and Gatlin (2003)
		1	69.2	17.2	7.8	4.3	
		2	68.1	17.6	7.8	4.5	
		4	69.4	17.1	8.3	4.2	
	Nile tilapia	0	73.8±0.42^{a}	55.2±2.28^{b}	26.1±1.32^{a}	11.9±0.22^{c}	Abdel-Tawwab et al. (2008)
		0.25 g/kg	74.4±0.50^{a}	56.1±1.37^{ab}	25.1±0.75^{a}	12.1±0.28^{bc}	
		0.5 g/kg	74.7±0.41^{a}	56.4±0.69^{ab}	25.3±1.08^{a}	12.6±0.40^{b}	
		1 g/kg	74.2±0.71^{a}	57.2±0.61^{a}	25.5±0.67^{a}	13.0±1.09^{ab}	
		2 g/kg	74.6±0.49^{a}	57.6±1.65^{a}	23.8±0.83^{b}	13.6±0.34^{ab}	
		5 g/kg	74.3±0.49^{a}	57.7±1.19^{a}	23.9±0.58^{b}	14.4±0.34^{a}	

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 2.14 ผลของการเสริมนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ต่อค่าองค์ประกอบทางเคมีในเนื้อ

สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน	สัตว์ทดลอง	ระดับ (%)	ความชื้น (%)	โปรตีน (%)	ไขมัน (%)	เถ้า (%)	อ้างอิง
Nucleotide	*Sciaenops ocellatus*	0	73.1±0.5	16.9±0.3	3.4±0.1[a]	3.9±0.5	Peng and Gatlin (2005)
		0.2 BY	72.1±0.6	17.4±0.3	3.6±0.1[ab]	4.3±0.3	
		0.2 NT	72.4±0.5	17.3±0.3	4.1±0.2[b]	4.4±0.6	
		0.2 BY + 0.2 NT	73.2±0.3	17.3±0.3	3.9±0.1[ab]	4.0±0.1	
	Sparus aurata	0	69.9	15.2	10.2[ab]	4.5	Oliva-Teles et al. (2006)
		11.5 BY	68.5	15.7	10[a]	4.2	
		23 BY	68	14.9	11.4[b]	4.1	
		5.8 NT	69.1	15.8	9.6[a]	4.5	
		11.5 NT	69	15.6	9[a]	4.4	
	Sciaenops ocellatus	0	73.9±0.8	17.0±0.3	5.5±0.5	4.2±0.3	Peng, Gatlin and Neill (2007)
		0.03	72.7±0.7	18.2±0.4	4.6±0.6	4.7±0.3	
		0.1	73.0±1.2	17.9±0.9	4.6±0.4	4.3±0.4	
		0.2	73.2±1.1	18.0±0.8	4.6±0.5	4.4±0.3	
		0.3	72.7±1.3	18.4±0.7	4.4±0.2	4.7±0.4	

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 2.15 ผลของการเสริมนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) และเบต้ากลูแคน (ß-glucan) ต่อระบบภูมิคุ้มกัน

สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน	สัตว์ทดลอง	ระดับ	ผลการทดลอง	อ้างอิง
Nucleotide	Common carp	15 mg/fish	↑ phagocytosis, respiratory burst, complement and lysozyme	Sakai et al. (2001)
	Rainbow trout	0.03% NT, 2% BY	↑ survival after challenge with *V. anguillarum*	Burrells et al. (2001)
	Rainbow trout	0.03% NT, 1% BY	↑ survival after challenge with infectious salmon anaemia virus	
	Coho salmon	0.03% NT, 2% BY	↑ survival after challenge with *Piscirickettsia salmonis*	
	Hybrid striped bass	5 g/ kg	↑ neutrophil oxidative radical productionz , ↑ survival after challenge with *Streptoccus iniaez*	Liu and Chen (2004)
ß-glucan	Salmon	10 µg/ml	↑ lysozyme activity	Paulsen, Engstad and Robertsen (2001)
	Carp	10 mg/kg	↑ superoxide dismutase and catalase activities	Kim, Feo and Zhang (2009)
	Shrimp	0.20%	↑ prophenoloxidase	Anas et al. (2009)

หมายเหตุ : ↑ : เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ; ⟶ : ไม่เพิ่มขึ้นหรือไม่เปลี่ยนแปลง; NT : Nucleotide; BW : Brewer's yeast

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 2.16 ผลของการเสริมนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) และเบต้ากลูแคน (ß-glucan) ต่อค่าเคมีในเลือด

สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน	สัตว์ทดลอง	ระดับ	กลูโคส (mg/dl)	คอเลสเตอรอล (g/L)	โปรตีน (g/L)	อ้างอิง
ß-glucan	*Labeo rohita*	o	41.95±4.89[b]	-	11.2±0.07[a]	Misra et al. (2006)
		100 mg/kg	41.05±0.24[b]	-	17.2±0.12[b]	
		250 mg/kg	31.77±0.13[a]	-	19.2±0.12[b]	
		500 mg/kg	36.43±0.07[ab]	-	17.8±0.08[b]	
Brewer's yeast	Nile tilapia	0	12.2±9.8[a]	5.97±0.09[a]	36.1±0.9[a]	Abdel-Tawwab et al. (2008)
		0.25 g/kg	19.6±9.8[b]	7.45±0.31[b]	47.0±0.9[b]	
		0.5 g/kg	23.2±16.3[c]	7.84±0.98[b]	58.7±2.1[cd]	
		1 g/kg	39.9±18.8[d]	14.51±1.37[d]	66.1±5.1[d]	
		2 g/kg	24.2±11.7[c]	12.21±0.3[c]	56.2±1.2[c]	
		5 g/kg	25.8±11.1[c]	11.83±0.22[c]	55.1±2.3[c]	

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สถานที่ทำการทดลอง

ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (งานสัตว์น้ำ)
อาคารเครื่องมือ 3 9 และ 10 ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.2 การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของการใช้โปรไบโอติคที่ผ่านการทำแคปซูลเปรียบเทียบกับการใช้เซลล์โปรไบโอติคในรูปเซลล์อิสระเสริมในอาหารกุ้งขาว

3.2.1 วางแผนการทดลองและการเลี้ยงกุ้ง

การศึกษานี้มีการวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบรูณ์ (completely randomized design : CRD) โดยมีจำนวนทรีตเมนต์ 5 ทรีตเมนต์ เป็นอาหารทดลองทั้งหมด 5 สูตร (ตารางที่ 3.1) โดยในแต่ละสูตรอาหารจะมีทั้งหมด 5 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ตัว ทำการเลี้ยงกุ้งขาวเป็นระยะเวลา 45 วัน

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง จะทำการสุ่มกุ้งขาวมาชั่งน้ำหนัก วัดความยาว และบันทึกอัตราการรอด เพื่อนำไปวิเคราะห์การเจริญเติบโต เก็บลำไส้กุ้ง เพื่อนำไปวิเคราะห์ประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ และทำการเก็บตัวอย่างเนื้อ เพื่อนำไปวิเคราะห์หาค่าองค์ประกอบเคมีในเนื้อ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 3.1 การจัดกลุ่มการทดลอง

สูตรอาหาร	โปรไบโอติค	รูปแบบ	จำนวนกุ้ง (ตัว)
1	*B. subtilis*	Free cell	10×5
2	*B. subtilis*	Encapsulation	10×5
3	*P. acidilactici*	Free cell	10×5
4	*P. acidilactici*	Encapsulation	10×5
5		Control	10×5

3.2.2 เตรียมอาหารทดลอง

3.2.2.1 การเตรียมเชื้อโปรไบโอติค

นำแบคทีเรียโปรไบโอติคทั้ง 2 สายพันธุ์ (*P. acidilactici* และ *B. subtilis*) มาเลี้ยงในอาหาร lactobacillus broth (MRS Broth) ที่ผสม 3% Sodium chloride ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเขย่า 150 rpm เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง หลังจากนั้นถ่ายเชื้อ 5 มิลลิลิตร ลงในอาหาร lactobacillus broth (MRS Broth) ที่ผสม 3% sodium chloride ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ลงในขวดลูกชมพู่ขนาด 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำไปเลี้ยงต่ออีก 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บเกี่ยวเซลล์ โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอน 2 ครั้ง ด้วย peptone water ปลอดเชื้อ

3.2.2.2 การผลิตไฮโดรไลเสทโปรตีนนม (milk protein hydrolysate)

ตามวิธีของ Sirilux and Wanpen (2012) โดยชั่งข้าวเหนียว 500 กรัม ล้างด้วยน้ำประปา 1 ครั้ง แล้วเติมน้ำปราศจากไอออน (deionized water) 500 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นชั่งนมพลาเจอร์ไลท์ 4 กิโลกรัม ผสมกับน้ำแช่ข้าว 400 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 ชั่วโมงหรือจนนมหมักแยกออกเป็น 2 ส่วน คือ ของเหลว (whey) และของแข็ง (curd) มี pH ประมาณ 4.1-4.5 แล้วทำการแยกส่วนของเหลว (whey) และของแข็ง (curd) โดยวิธีการกรองด้วยผ้าขาวบาง และทำการบันทึกน้ำหนักของเหลว (whey) และของแข็ง (curd) แล้วผสมของเหลว (whey) และของแข็ง (curd) ในอัตราส่วนของแข็ง (curd) 28% โดยชั่งของเหลว (whey) 720 กิโลกรัม เติมของแข็ง (curd) 280 กรัม (บดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดละเอียดแล้วค่อย ๆ เติมของเหลว (whey) ลงไปบดด้วยจนเป็นเนื้อเดียวกัน) แล้วย่อยด้วย 10 N sodium hydroxide ให้มีค่า pH 9.0 แล้วนำไปบ่มที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเย็น แล้วปรับให้มีค่า pH 7.0 ด้วย 10 N acetic ทำการฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เก็บไว้ในตู้เย็นจนกว่าจะนำมาใช้งาน

3.2.2.3 ไมโครเอ็นแคปซูลเลชั่น (microencapsulation)

ตามวิธีของ Sirilux and Wanpen (2012) โดยการห่อหุ้มเซลล์โปรไบโอติค โดยใช้เซลล์ของแบคทีเรียโปรไบโอติค *P. acidilactici* และ *B. subtilis* น้ำหนัก 10 กรัม มาละลายในไฮโดรไลเสทโปรตีนนม (milk protein hydrolysate) 75 กรัม ผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วจึงเติม 10% calcium chloride ลงไป 0.9 มิลลิลิตร ทำการปั่นผสมให้อยู่ในรูปอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (water in oil emulsion) โดยการเติมน้ำมันพืช 750 กรัม แล้วผสมด้วยเครื่องกวนโดยใช้ความเร็ว 1,400 rpm อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ตั้งทิ้งไว้จนแคปซูลตกตะกอน โดยน้ำมันลอยมาอยู่ชั้นบนสุด ชั้น calcium chloride และชั้นของเม็ดเจลจะอยู่ชั้นล่างสุด หลังจากนั้นจึงดูดแยกน้ำมันพืชออก พร้อมนำไปผสมกับอาหารกุ้ง

3.2.2.4 การเตรียมอาหารกุ้งขาวที่ผสมกับจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติค

ในการทดลองครั้งนี้ จะใช้อาหารทดลองทั้งหมด 5 สูตร โดยในสูตรที่ 2 และ 4 จะใช้ *B. subtilis* และ*P. Acidilactici* ที่ผ่านการทำแคปซูล แล้วนำมาผสมกับอาหารสูตรทางการค้าในอัตราส่วน 5×10^7 CFU/g แล้วคลุกให้ทั่ว หลังจากนั้นทำการผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที และเก็บในตู้เย็น ส่วนสูตรที่ 1 และ 3 จะทำการผสม *B. subtilis* และ*P. Acidilactici* ในรูปเซลล์อิสระกับอาหารสูตรทางการค้าในอัตราส่วน 5×10^7 CFU/g แล้วคลุกให้ทั่ว หลังจากนั้นทำการผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที และสูตรที่ 5 จะใช้อาหารสูตรทางการค้า ผสมกับแคปซูล (75 กรัม ไฮโดรไลเสทโปรตีนนม (milk protein hydrolysate) ผสมกับ 10% calcium chloride 0.9 มิลลิลิตร ผสมในน้ำมันพืช 750 กรัม) ที่ไม่มีการผสมเชื้อ และเก็บในตู้เย็นจนกว่าจะนำมาใช้

3.2.3 วิเคราะห์อัตราการเจริญเติบโต

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง จะทำการเก็บรวบรวมข้อมูลการเจริญเติบโต อัตรารอด และประสิทธิภาพการใช้อาหารของกุ้งขาว โดยทำการสุ่มชั่งน้ำหนัก วัดความยาว และบันทึกจำนวนกุ้งขาว เพื่อศึกษาด้านการเจริญเติบโต และอัตรารอดในแต่ละชุดทดลอง ได้แก่ น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (weight gain : WG) อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน (daily gain : DG) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate : SGR%) อัตรารอด (survival rate : SV%) และอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนักตัว (feed conversion ratio : FCR)

น้ำหนักเฉลี่ย (final weight) = ผลบวกของน้ำหนักกุ้งทุกตัว/จำนวนตัว

น้ำหนักเพิ่มขึ้น (weight gain : WG) = น้ำหนักสุดท้าย (กรัม) – น้ำหนักเริ่มต้น (กรัม)

อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน (daily gain : DG)

$$= \frac{\text{น้ำหนักกุ้งเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} - \text{น้ำหนักกุ้งเมื่อเริ่มต้นการทดลอง}}{\text{ระยะเวลาที่เลี้ยง}}$$

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate : SGR%)

$$= \frac{\left(\text{Ln น้ำหนักกุ้งเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} - \text{Ln น้ำหนักกุ้งเมื่อเริ่มต้นการทดลอง}\right)}{\text{ระยะเวลาที่เลี้ยง}} \times 100$$

อัตรารอด (survival rate : SV%)

$$= \frac{\text{จำนวนกุ้งเมื่อสิ้นสุดการทดลอง}}{\text{จำนวนกุ้งเริ่มต้นการทดลอง}} \times 100$$

อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนักตัว (feed conversion ratio : FCR)

$$= \frac{\text{น้ำหนักอาหารที่กุ้งกินทั้งหมด}}{\text{น้ำหนักกุ้งเมื่อสิ้นสุดการทดลอง–น้ำหนักกุ้งเริ่มต้นการทดลอง}}$$

3.2.4 ศึกษาประชากรจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารกุ้งขาว

สุ่มเก็บตัวอย่างลำไส้กุ้งขาว โดยใช้มีดผ่าตัดที่ปลอดเชื้อกรีดเนื้อกุ้งบริเวณหลังจนเห็นทางเดินอาหาร แล้วทำการเลาะเพื่อแยกส่วนที่เป็นลำไส้ออกมาโดยไม่ฉีกขาด นำลำไส้กุ้งมาบดให้ละเอียดในที่บดปลอดเชื้อ แล้วนำมาเจือจางด้วย 0.85% sodium chloride ในอัตราส่วน 1 ต่อ 10 เพื่อให้ระดับความเข้มข้นเจือจางครั้งละ 10 เท่า (ten floded dilutions) โดยเจือจาง 2 ความเข้มข้นที่ 10^{-1} และ10^{-2} จากนั้นการตรวจนับเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ thiosulphate citrate bile salt sucrose (TCBS) plate count agar (PCA) และ sabouraud dextrose agar บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง lactobacillus agar (MRS) และbifidobacterium agar บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เพื่อนับจำนวนโคโลนี

3.2.5 วิเคราะห์องค์ประกอบของเคมีในเนื้อ

หลังสิ้นสุดการทดลอง จะทำการสุ่มเก็บตัวอย่างเนื้อกุ้งขาวจากแต่ละทรีตเมนต์ หลังจากนั้นนำไปบดให้ละเอียด เพื่อนำไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมี (proximate analysis) ด้วยวิธี AOAC (2000) ได้แก่ การวิเคราะห์โปรตีน (crude protein) ไขมัน (crude lipid) เถ้า (ash) และความชื้น (moisture)

3.2.6 วิเคราะห์ค่าทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลโดยใช้ analysis of variance (ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มโดยใช้ (DMRT) duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ด้วยโปรแกรม สำเร็จรูป SPSS version 16.0

3.3 แผนการทดลองที่ 2 ศึกษาผลของการเสริมโปรไบโอติคที่ผ่านการทำแคปซูลร่วมกับสารเสริมนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) และเบต้ากลูแคน (ß-glucan) ในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมด์

3.3.1 วางแผนการทดลอง

การศึกษานี้มีการวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบรูณ์ (completely randomized design : CRD) โดยมีจำนวนทรีตเมนต์ 10 ทรีตเมนต์ เป็นอาหารทดลองทั้งหมด 10 สูตร (ตารางที่ 3.2) โดยในแต่ละสูตรอาหารมีทั้งหมด 5 ซ้ำ ซ้ำละ 20 ตัว และทำการเลี้ยงกุ้งขาวเป็นระยะเวลา 90 วัน

ตารางที่ 3.2 การจัดกลุ่มการทดลองการเสริมโปรไบโอติคร่วมกับสารเสริมในอาหารกุ้งขาว

กลุ่มการทดลอง	โปรไบโอติค	สารเสริม	จำนวนกุ้ง (ตัว)
Bb	*B. subtilis*	ß-glucan	20×5
Bn	*B. subtilis*	nucleotide	20×5
Bbn	*B. subtilis*	ß-glucan+nucleotide	20×5
Pb	*P. acidilactici*	ß-glucan	20×5
Pn	*P. acidilactici*	nucleotide	20×5
Pbn	*P. acidilactici*	ß-glucan+nucleotide	20×5
b	0	ß-glucan	20×5
n	0	nucleotide	20×5
bn	0	ß-glucan+nucleotide	20×5
C	0	0	20×5

3.3.2 การเตรียมอาหารทดลอง

การผลิตอาหารทดลองทำขึ้น ณ ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีอาหารสัตว์น้ำ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยนำวัตถุดิบที่เป็นส่วนประกอบของอาหารมาบดให้ละเอียด ชั่งน้ำหนักวัตถุดิบแต่ละชนิดตามสูตร (ตารางที่ 3.3) ผสมส่วนประกอบทั้งหมดให้เข้ากันเป็นเนื้อเดียวประมาณ 20 นาที นำวัตถุดิบที่ผสมแล้วเข้าเครื่องอัดเม็ดอาหาร ปรับขนาดเม็ดอาหารให้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2 มิลลิเมตร ยาวประมาณ 3 มิลลิเมตร อาหารที่ได้มีลักษณะเป็นเม็ดกึ่งชื้น หลังจากนั้นนำไปอบไอน้ำที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วคัดขนาดอาหารอัดเม็ดที่ต้องการผ่านตะแกรงคัดขนาด บรรจุอาหารแต่ละขนาดใส่ถุงพลาสติกและเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะนำไปใช้

ตารางที่ 3.3 ปริมาณที่ใช้ในการทำอาหารกุ้งขาว และองค์ประกอบทางเคมีในอาหาร

ส่วนประกอบ	Bb	Bn	Bbn	Pb	Pn	Pbn	b	n	bn	C
ปลาป่น					22					
กากถั่วเหลือง					36					
แป้งสาลี					25					
wheat gluten					6					
เปลือกกุ้งป่น					2					
น้ำมันปลา					4					
แร่ธาตุรวม					2					
วิตามินรวม					2					
เลซิทิน					1					
ß-glucan[1] (%)	0.05	-	0.05	0.05	-	0.05	0.05	-	0.05	-
nucleotide[1] (%)	-	1	1	-	1	1	-	1	1	-
Pediococcus	-	-	-	5×10^7	5×10^7	5×10^7	-	-	-	-
Bacillus	5×10^7	5×10^7	5×10^7	-	-	-	-	-	-	-
Chemical composition									**(%)**	
moisture									7.37	
crude protein									44.34	
ether extract									8.36	
crude fiber									3.59	
ash									8.44	

หมายเหตุ : [1]บริษัท นิวโวเทค จำกัด

3.3.3 การเตรียมเชื้อโปรไบโอติค

3.3.3.1 การเตรียมเชื้อโปรไบโอติค

ดังวิธีการตามข้อ 3.3.2.1

3.3.3.2 การผลิตไฮโดรไลเสทโปรตีนนม (milk protein hydrolysate)

ดังวิธีการตามข้อ 3.3.2.2

3.3.3.3 การตรึงเซลล์แบบไมโครเอ็นแคปซูลเลชั่น (microencapsulation)

ดังวิธีการตามข้อ 3.3.2.3

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.3.3.4 ศึกษาลักษณะของแคปซูลด้วยกล้อง SEM

แช่ตัวอย่าง (pre fix) ใน 2.5% glutaraldehyde ใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.2 นาน 1 ชั่วโมงหรือทิ้งไว้ข้ามคืนในตู้เย็น หลังจากนั้นล้างตัวอย่างด้วย phosphate buffer 3 ครั้ง ครั้งละ 10-15 นาที และนำตัวอย่างไปแช่ใน 1% osmium ใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.2 นาน 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างตัวอย่างด้วย phosphate buffer 3 ครั้ง ครั้งละ 10-15 นาที เสร็จแล้วนำไปขจัดน้ำออกจากตัวอย่าง (dehydrate) ด้วย ethanol ที่ความเข้มข้น 30% 50% 70% 90% 95% และ 100% จำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที แล้วนำตัวอย่างไปทำให้แห้ง ณ จุดวิกฤตด้วยเครื่องทำให้แห้ง (critical point dryer) และนำตัวอย่างไปติดบนฐานรองตัวอย่าง (stap) ด้วยกาว 2 หน้า หลังจากนั้นนำตัวอย่างไปฉาบทองด้วยเครื่องฉาบทอง (ion sputter) เป็นเวลา 8 นาที เสร็จแล้วจึงนำตัวอย่างไปส่องดูลักษณะแคปซูลด้วยกล้อง SEM

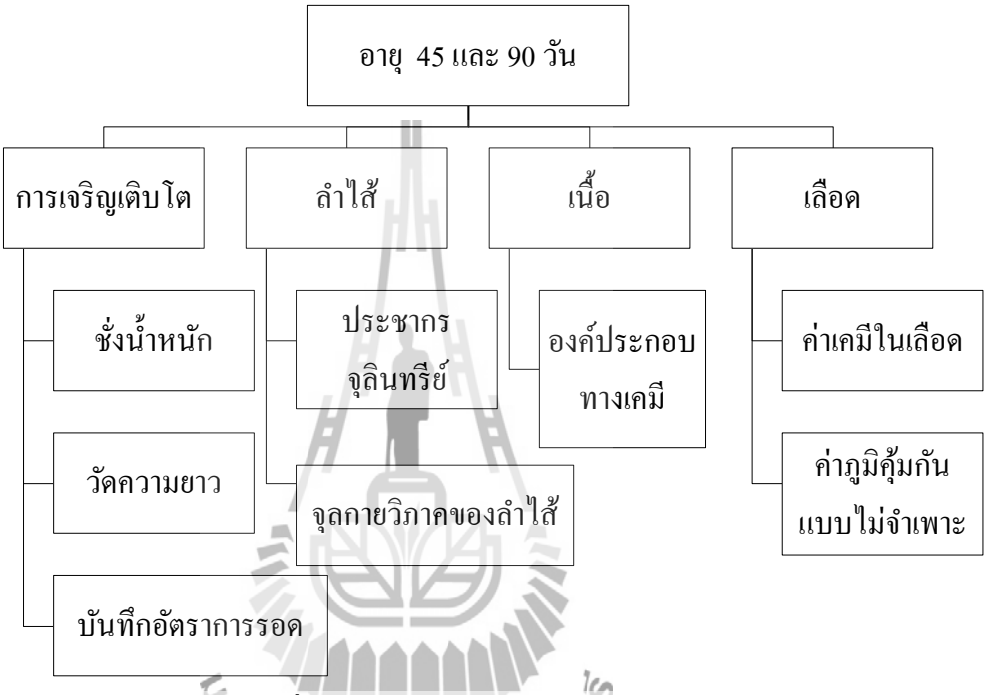
3.3.3.5 การเตรียมอาหารกุ้งขาวที่ผสมกับจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติคโอติค

ในการทดลองครั้งนี้ จะใช้อาหารทดลองที่แตกต่างกันทั้งหมด 10 สูตร โดยในสูตรที่ 1-3 และ 4-6 จะทำการผสม *B. subtilis* และ*P. acidilactici* ที่ผ่านการทำแคปซูลผสมกับอาหารเลี้ยงกุ้งในอัตราส่วน 5×10^{7} CFU/g แล้วคลุกให้ทั่ว หลังจากนั้นทำการผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ส่วนสูตรที่ 7-10 จะทำการผสมอาหารกับแคปซูล (75 กรัม ไฮโดรไลเสทโปรตีนนม (milk protein hydrolysate) ผสมกับ 10% calcium chloride 0.9 ml ผสมในน้ำมันพืช 750 กรัม) ที่ไม่มีการผสมเชื้อ

3.3.4 เตรียมสัตว์ทดลองและการเก็บตัวอย่าง

นำกุ้งขาวระยะโพสลาร์วา (post larvae 15) จากฟาร์มอนุบาลกุ้งในจังหวัดชลบุรี มาเลี้ยงปรับสภาพในบ่อซีเมนตร์ขนาด 2×3 เมตร ที่มีความเค็ม 10 ส่วนในพันส่วน (parts per thousand : ppt) โดยให้อาหารสูตรการค้า (basal diet) ทุก ๆ 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยในระหว่างการเลี้ยงจะทำการดูดตะกอนเศษอาหารทุกวัน และเติมน้ำให้ได้ระดับเดิม เมื่อเลี้ยงปรับสภาพจนกุ้งแข็งแรง จึงทำการสุ่มคัดขนาดกุ้งขาวที่แข็งแรงสมบูรณ์เข้าสู่หน่วยการทดลอง โดยมีน้ำหนักก่อนการทดลองเฉลี่ย 0.15-0.16 กรัม หลังจากนั้นจะสุ่มกุ้งลงถังพลาสติกขนาด 36×63×43 เซนติเมตร^{3} ปริมาตรน้ำในการเลี้ยงประมาณ 84 ลิตร จำนวน 50 ตู้ ตู้ละ 20 ตัว เลี้ยงในน้ำที่มีความเค็ม 10 ส่วนในพันส่วน (parts per thousand : ppt) และมีระบบน้ำหมุนเวียนแบบปิดแบบระบบ air lift โดยใช้อากาศดันน้ำเข้าสู่ระบบผ่านตัวกรองชีวภาพที่ประกอบด้วย เปลือกหอย และใยสังเคราะห์ ให้อากาศตลอดเวลา และทำการให้อาหารกุ้งปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัวกุ้งต่อมื้อ วันละ 5 ครั้ง (ที่เวลา 9.00 12.00 15.00 21.00 และ0.00 น.) โดยในระหว่างการเลี้ยงจะทำการดูดตะกอนเศษอาหารทุกวัน หลังจากนั้นจะเติมน้ำให้ได้ระดับเดิม หลังจากทดลองเป็นระยะ 45 วัน จะทำการสุ่มกุ้งขาวมาชั่งน้ำหนัก เพื่อนำไปวิเคราะห์การเจริญเติบโต เก็บลำไส้กุ้ง เพื่อนำไปวิเคราะห์ประชากรจุลินทรีย์

และกายวิภาคของลำไส้ และทำการเก็บตัวอย่างเนื้อกุ้งขาวเพื่อนำไปวิเคราะห์หาค่าองค์ประกอบทางเคมีในเนื้อ และที่ระยะเวลาการทดลอง 90 วัน จะทำการสุ่มกุ้งขาวมาชั่งน้ำหนัก เพื่อนำไปวิเคราะห์การเจริญเติบโต เก็บลำไส้กุ้ง เพื่อนำไปวิเคราะห์ประชากรจุลินทรีย์ และกายวิภาคของลำไส้ ทำการเจาะเลือดกุ้ง เพื่อนำไปวิเคราะห์ค่าโลหิตวิทยา ค่าเคมีในเลือด และค่าภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะและทำการเก็บตัวอย่างเนื้อกุ้งขาวเพื่อนำไปวิเคราะห์หาค่าองค์ประกอบในเนื้อ (สรุปแผนภาพที่ 3.1)



ภาพที่ 3.1 การวางแผนการเก็บตัวอย่าง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.3.5 วิเคราะห์คุณภาพน้ำ

ในระหว่างการทดลองทำการวัดค่า pH โดยใช้เครื่อง pH Meter ค่าความเค็มโดยใช้เครื่อง salinity refract meter ค่าออกซิเจนละลายในน้ำโดยใช้เครื่อง dissolved oxygen meter แอมโมเนีย และความกระด่างใช้ชุดวิเคราะห์สำเร็จรูป (ด้วยชุดทดสอบ aqua-VBC) สัปดาห์ละ 1 ครั้ง

3.3.6 การทำให้กุ้งเกิดความเครียดด้วยน้ำที่มีแอมโมเนียสูง

เมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 2 นำกุ้งขาวจำนวน 2 ตัว ที่เหลือจากการสุ่มตัวอย่างวัดค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ นำไปทำให้เครียดด้วยน้ำที่มีแอมโมเนียปริมาณ 11.1 mg/L เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นจึงทำการสุ่มเจาะเลือดกุ้งขาวบริเวณ ventral sinus เพื่อนำไปวิเคราะห์ค่าเคมีในเลือด และค่าภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ

ตารางที่ 3.4 คุณภาพน้ำในระหว่างการทดลอง

ข้อมูลคุณภาพอากาศ	ค่าที่วัดได้	หน่วย
ความเป็นกรดเป็นด่างของน้ำ (pH)	7.8 ± 0.17	-
ออกซิเจนละลายน้ำ (dissolved oxygen)	6.47±0.64	mg/L
แอมโมเนีย (ammonia nitrogen)	0.21±0.08	ppm
ความเค็ม (salinity)	10.78±0.70	ppt
ความเป็นด่างรวม (total alkalinity)	1,015±62.58	ppm
ความกระด้าง (hardness)	1,435±142.38	ppm
อุณหภูมิ (temperature)	26.83±0.28	C^o

3.3.7 การวิเคราะห์อัตราการเจริญเติบโตและการบันทึกผลการทดลอง

ทำการเก็บรวบรวมข้อมูลการเจริญเติบโต อัตรารอด และประสิทธิภาพการใช้อาหารของกุ้งขาวทุก ๆ 45 วัน โดยทำการสุ่มชั่งน้ำหนัก วัดความยาว และบันทึกจำนวนกุ้งขาว เพื่อศึกษาด้านการเจริญเติบโต และอัตรารอดในแต่ละชุดทดลอง ได้แก่ น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (weight gain : WG) อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน (daily gain : DG) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate : SGR%) อัตรารอด (survival rate : SV%) และอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนักตัว (feed conversion ratio : FCR) (ดังวิธีการตามข้อ 3.3.2.2)

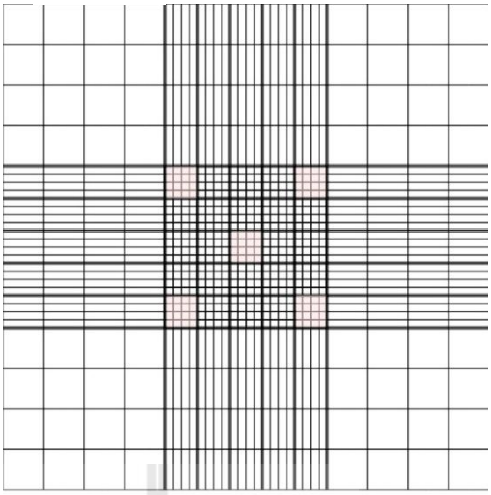
3.3.8 การวิเคราะห์ค่าโลหิตวิทยา

3.3.8.1 การวิเคราะห์จำนวนเม็ดเลือดรวม (total haemocyte count : THC) ตามวิธีของกิจการ อุษณีย์ และจิราพร (2543) โดยเจาะเลือดกุ้งจาก ventral sinus ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ด้วยเข็มฉีดยาเบอร์ 24G ผสมกับสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดปริมาณ 200 ไมโครลิตร (อัตราส่วนเลือดกุ้งต่อสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด 1:2) ผสมให้เข้ากันเบา ๆ หลังจากนั้นหยดเลือดปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนสไลด์ (haemacytometer) นับจำนวนเม็ดเลือดทั้งหมดด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10 เท่า โดยนับในช่องใหญ่ทั้งหมด 5 ช่อง ตรงบริเวณมุมบน ล่าง ซ้าย ขวา และตรงกลาง ดังรูปภาพที่ 3.2

การคำนวณปริมาณเม็ดเลือด (total hemocytes count)

จำนวนเซลล์เม็ดเลือด/mm^3

= เซลล์เม็ดเลือดที่นับได้ทั้งหมด 5 ช่อง$\times 10^4 \times$ค่า dilution



ภาพที่ 3.2 ช่อง hemocytometer chamber ที่ใช้นับจำนวนเม็ดเลือด

ที่มา : ดัดแปลงมาจาก: http://www.microbehunter.com/the-hemocytometer-counting-chamber/

3.3.9 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเลือด

3.3.9.1 การวิเคราะห์ค่า plasma total protein ใช้ชุด total protein set (biuret method) โดยใช้น้ำยาสำเร็จรูปของบริษัท BIOTEH ทำโดยเติม biuret reagent ลงในหลอด 300 ไมโครลิตร แล้วปิเปตพลาสมาลงในหลอด 5 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร โดยใช้ biuret reagent เป็น blank หลังจากนั้นนำค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปคำนวณหาค่า total protein โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่มีสารละลายมาตรฐาน (protein standard) ความเข้มข้น 0 5 10 20 และ 25 (mg/dl) (Weichselbaum, 1964; Rosenthal and Cenditt, 1956)

3.3.9.2 การวิเคราะห์ค่า plasma cholesterol ใช้ชุด liquid-cholesterol (CHOD-PAP method) โดยใช้น้ำยาสำเร็จรูปของบริษัท BIOTEH ทำโดยเติม enzyme reagent (liquid CHOD-POD enzyme) ลงในหลอด 500 ไมโครลิตร ปิเปตพลาสมาลงในหลอด 5 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร โดยใช้ enzyme reagent (liquid CHOD-POD enzyme) เป็น blank หลังจากนั้นนำค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปคำนวณหาค่า cholesterol โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่มีสารละลายมาตรฐาน (cholesterol standard) ความเข้มข้น 0 5 10 20 และ 25 (mg/dl) (Richmond, 1973; Thomas, Labor and Diagnose, 1992)

3.3.9.3 การวิเคราะห์ค่า plasma urea nitrogen (BUN) ใช้ชุด liquid-BUN (urease colorimetric method) โดยใช้น้ำยาสำเร็จรูปของบริษัท BIOTEH ทำโดยเติม working enzyme reagent (ละลาย liquid urease ด้วย BUN enzyme diluent) ลงในหลอด 500 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่

37 องศาเซลเซียส ปิเปตพลาสมาลงในหลอด 10 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม color reagent (เจือจาง conc. BUN color reagent 1 ส่วน ด้วยน้ำกลั่น 3 ส่วน) 500 มิลลิลิตร ในหลอดเดิม ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 580 นาโนเมตร โดยใช้ working enzyme reagent ผสมกับ color reagent เป็น blank หลังจากนั้นนำค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปคำนวณหาค่า urea nitrogen โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่มีสารละลายมาตรฐาน (BUN standard) ความเข้มข้น 0 3 9 15 และ 21 (mg/dl) (Searcy, Rearcy, Reardon and Foremwn, 1967)

3.3.9.4 การวิเคราะห์ค่า plasma chloride ใช้ชุด chloride set (thyocyanate method) โดยใช้น้ำยาสำเร็จรูปของบริษัท BIOTEH ทำโดยการเติม chloride reagent 500 ไมโครลิตร หลังจากนั้นปิเปตพลาสมาลงในหลอด 7.5 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร โดยใช้ chloride reagent เป็น blank หลังจากนั้นนำค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปคำนวณหาค่า chloride โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่มีสารละลายมาตรฐาน (chloride standard) ความเข้มข้น 0 10 20 30 และ 40 (mg/dl) (Swain, 1956)

3.3.9.5 การวิเคราะห์ค่า plasma glucose ใช้ชุด liquid-glucose (GOD-PAP method) โดยใช้น้ำยาสำเร็จรูปของบริษัท BIOTEH ทำโดยเติม enzyme reagent 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นปิเปตพลาสมาลงในหลอด 5 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตรโดยใช้ enzyme reagent เป็น blank หลังจากนั้นนำค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปคำนวณหาค่า glucose โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่มีสารละลายมาตรฐาน (glucose standard) ความเข้มข้น 0 5 10 15 และ 20 (mg/dl) (Trinder, 1969)

3.3.9.6 การวิเคราะห์ค่า plasma triglycerides ใช้ชุด triglycerides liquid stable reagent (GPO-PAP method) โดยใช้น้ำยาสำเร็จรูปของบริษัท Erba Mannheim ทำโดยเติม triglycerides reagent 500 ไมโครลิตร แล้วปิเปตพลาสมาลงในหลอด 5 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 670 นาโนเมตรโดยใช้ triglycerides reagent เป็น blank หลังจากนั้นนำค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปคำนวณหาค่า triglycerides โดยเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐานที่มีสารละลายมาตรฐาน (triglycerides standard) ความเข้มข้น 0 5 10 15 และ20 (mg/dl) (Jacobs and Van Dnmark, 1960; Kodischeck and Umbreit, 1969; Trinder, 1969; Schelttler and Nussel, 1975)

3.3.9.7 วิเคราะห์ค่าสมดุลออสโมซีส (osmosis balance) โดยเจาะเลือดกุ้งบริเวณventral sinus เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารทดลองเป็นเวลา 90 วัน โดยสุ่มเก็บเลือดกุ้งมาวิเคราะห์ ค่าออสโมลาริตี้ด้วยเครื่อง osmometer

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.3.10 การวิเคราะห์ค่าภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ

3.3.10.1 วิเคราะห์ค่ากิจกรรมฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase activity) จากเม็ดเลือด ดัดแปลงจาก กิจการ อุษณีย์ และจิราพร โดยเจาะเลือดกุ้งจาก ventral sinus ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เลือดแข็งตัว หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,500 rpm ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกซีรัม หลังจากนั้นใช้ไมโครปิเปตดูดซีรัม 10 ไมโครลิตร ใส่ในถาดหลุม (96 wells plate) ตัวอย่างละ 2 หลุม จากนั้นเติมสารละลาย 0.1% trypsin ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย 0.3% L-DOPA (L-dihydroxyphenylalanine) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

3.3.10.2 วิเคราะห์การผลิตซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (superoxide anion production : O_2) จากเม็ดเลือดดัดแปลงมาจาก Cook, Haybill, Hunchinson, Nowak and Hayball (2001) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ โดยเจาะเลือดกุ้งจากบริเวณ ventral sinus ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ด้วยเข็มฉีดยาเบอร์ 24G ผสมกับสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดปริมาณ 200 ไมโครลิตร (อัตราส่วนเลือดกุ้งต่อสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด 1:2) ผสมให้เข้ากันเบา ๆ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที เพื่อแยกเซลล์เม็ดเลือด จากนั้นนำเซลล์เม็ดเลือดมาผสมกับอาหารเลี้ยงเม็ดเลือด L-15 มี pH 7.4 ที่มีสารป้องกันเลือดแข็งตัวของเลือด L-cyteine 55 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบา ๆ และใช้ไมโครปิเปตดูดเซลล์เม็ดเลือดที่เจือจางแล้ว 25 ไมโครลิตร ใส่ในถาดหลุม (96 wells plate) ตัวอย่างละ 2 หลุม นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 45 นาที หลังจากนั้นดูดส่วนใสทิ้งแล้วล้างเซลล์เม็ดเลือดที่ไม่เกาะในถาดหลุม (96 wells plate) ออก 3 ครั้งด้วย L-15 ครั้งละ 25 ไมโครลิตร ก่อนจะเติม L-15 อย่างละ 2 หลุม ๆ ละ 25 ไมโครลิตร และ NBT-zymosan อย่างละ 2 หลุม ๆ ละ 50 ไมโครลิตร นำไปบ่มในที่มืด 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ดูดสารละลายในแต่ละหลุมทิ้ง จากนั้นฟิก (fix) เซลล์ด้วยการเติม methanol 75 ไมโครลิตร หลังจากนั้นเมื่อครบ 3 นาที ให้ดูดส่วนใสออก แล้วล้างเซลล์ด้วย 70% methanol จำนวน 3 ครั้ง วางทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วละลายตะกอนด้วย 2M potassiumoxide 120 ไมโครลิตร และdimethyl sulfoxide (DMSO) 140 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม วางทิ้งไว้ 10 นาทีจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 620 นาโนเมตร

3.3.10.3 การวิเคราะห์ lysozyme activity เป็นการวิเคราะห์การทำลายแบคทีเรียแกรมบวก *Micrococcus lysodeikiticus* ของ lysozyme ในพลาสมาของกุ้งเทียบกับการทำลายแบคทีเรียแกรมบวก *M. lysodeikiticus* ของ lysozyme จากไข่ขาวของไก่ ที่ความเข้มข้น 0 2.5 5 10 15 และ20 µg/ml โดยทำการใส่ standard lysozyme หลุมละ 10 ไมโครลิตร จำนวน 3 ซ้ำ และใส่พลาสมาหลุมละ 10 ไมโครลิตร จำนวน 3 ซ้ำ ลงในถาดหลุม (96 well plate) หลังจากนั้นใส่สารละลายเชื้อ *M.*

lysodeikiticus ในหลุมที่มี standard lysozyme และพลาสมาหลุมละ 190 ไมโครลิตร แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 15 นาที โดยนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร โดยบันทึกค่าการดูดกลืนแสงทุก ๆ 5 นาที

3.3.11 การวิเคราะห์ปริมาณของเชื้อแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารกุ้งขาว

หลังจากทดลองเป็นระยะเวลา 45 และ 90 วัน จะทำการสุ่มเก็บตัวอย่างลำไส้กุ้งขาว ครั้งละ 3 ตัวต่อตู้ โดยใช้มีดผ่าตัดที่ปลอดเชื้อกรีดเนื้อกุ้งบริเวณหลังจนเห็นทางเดินอาหาร แล้วทำการเลาะเพื่อแยกส่วนที่เป็นลำไส้ออกมาโดยไม่ฉีกขาด นำลำไส้กุ้งมาบดให้ละเอียดในที่บดปลอดเชื้อ แล้วนำมาเจือจางด้วย 0.85% sodium chloride ในอัตราส่วน 1 ต่อ 10 และ 1:100 (ten-floded dilutions) จากนั้นการตรวจนับเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี viable plate count ในอาหารเลี้ยงเชื้อ thiosulphate citrate bile salt sucrose (TCBS) plate count agar (PCA) sabouraud dextrose agar บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง และ lactobacillus agar (MRS) bifidobacterium agar บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เพื่อนับจำนวนโคโลนี

3.3.12 การวิเคราะห์ลักษณะทางจุลกายวิภาคของลำไส้ (morphology)

เก็บตัวอย่างลำไส้กุ้งโดยแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนต้น และส่วนท้าย โดยนำเนื้อเยื่อมาแช่ใน 10% formalin เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเนื้อเยื่อไปแช่ใน 70% ethanol และนำมาผ่านขั้นตอนการฝังติดเนื้อเยื่อในพาราฟิน (paraffin) ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

- ethanol 90%	ครั้งละ	1-24	ชั่วโมง	1 ครั้ง
- ethanol 100%	ครั้งละ	20	นาที	3 ครั้ง
- ethanol : butanol	ครั้งละ	30	นาที	4 ครั้ง
- ethanol 100%	ครั้งละ	30	นาที	2 ครั้ง
- butanol : xylene	ครั้งละ	20	นาที	1 ครั้ง
- xylene	ครั้งละ	20	นาที	3 ครั้ง
- xylene : paraffin	ครั้งละ	20	นาที	1 ครั้ง
- พาราฟินหลอมเหลว	ครั้งละ	30	นาที	2 ครั้ง

เนื้อเยื่อมาฝังในพาราฟิน (embedding) โดยใช้เครื่องหยอดพาราฟิน ทิ้งไว้ให้พาราฟินแข็งตัว นำบล็อกพาราฟินที่มีชิ้นเนื้อเยื่อฝังอยู่มาตัดหน้าบล็อก แล้วนำไปตัดด้วยเครื่องไมโครโตม (microtome) ให้เนื้อเยื่อมีความหนาขนาด 5 ไมโครเมตร หลังจากนั้นนำเนื้อเยื่อที่ตัดแล้ว (section) มาติดกับกระจกสไลด์ โดยนำเนื้อเยื่อที่ตัดแล้วลอยในอ่างลอยเนื้อเยื่อ (tissue floating bath) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แล้ววางกระจกสไลด์พร้อมเนื้อเยื่อที่ตัดแล้วอยู่ให้แห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน หลังจากนั้นนำกระจกสไลด์ที่มีเนื้อเยื่ออยู่ไปย้อมสี โดยสีที่ใช้คือ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ฮีมาทอกซิลิน (hematoxylin) และอีโอซิน (eosin) มีขั้นตอนการย้อมดังนี้

1. การขจัดพาราฟิน (deparaffinization) โดยจุ่มกระจกสไลด์ที่มีอยู่ลงไปใน xylene 2 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที
2. การเอาน้ำเข้าเนื้อเยื่อ (hydration) โดยเริ่มจาก

- ethanol 100% 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที
- ethanol 95% 3 นาที
- ethanol 80% 3 นาที
- ethanol 70% 3 นาที
- ethanol 50% 3 นาที
- deionized water 3 นาที

3. การย้อมสีครั้งแรก (primary stain) ย้อมด้วยฮีมาทอกซิลิน 5% นานประมาณ 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำประปาโดยเปิดให้น้ำไหลผ่านตลอดเวลา 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน (deionized water) 1 ครั้ง แล้วทำการย้อมสีซ้ำ (counterstain) ย้อมด้วย eosin นาน 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน (deionized water) 1 ครั้ง แล้วเข้าสู่ขั้นตอน การขจัดน้ำ (dehydration)

- จุ่มใน ethanol 70% 5 วินาที
- จุ่มใน ethanol 80% 5 วินาที
- จุ่มใน ethanol 90% 5 วินาที
- จุ่มใน ethanol 95% 10 วินาที
- จุ่มใน ethanol 99.5% 10 วินาที
- จุ่มใน ethanol 100% 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที
- จุ่มใน xylene 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

หลังจากนั้นหยด mounting median ลงบนกระจกสไลด์แล้วปิดกระจกปิดสไลด์ นำกระจกสไลด์ที่มีเนื้อเยื่อที่ย้อมสีเสร็จแล้วไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10 เท่า เพื่อวิเคราะห์ความสูงวิลไลในลำไส้ โดยวัดจากปลายของวิลไล ถึงฐานของวิลไล (Hedemann, Mikkelsen, Naughton and Jensen, 2006)

3.3.13 การวิเคราะห์ค่าองค์ประกอบทางเคมีของเนื้อ

เมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ระยะเวลา 45 และ 90 วัน จะทำการสุ่มเก็บตัวอย่างเนื้อกุ้งขาวจากแต่ละทรีตเมนต์ หลังจากนั้นนำไปบดให้ละเอียด เพื่อนำไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมี (proximate analysis) ด้วยวิธี AOAC (2000) ได้แก่ การวิเคราะห์โปรตีน (crude protein) ไขมัน (crude lipid) เถ้า (ash) และความชื้น (moisture)

3.3.14 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลโดยใช้ analysis of variance (ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มโดยใช้ (DMRT) duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ด้วยโปรแกรม สำเร็จรูป SPSS version 16.0

วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกุ้งขาวในสภาวะปกติ และกุ้งขาวที่ถูกทำให้เกิดความเครียดด้วยน้ำที่มีแอมโมเนียสูง วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยใช้ pair sample T-test

บทที่ 4
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของการใช้โปรไบโอติคที่ผ่านการทำแคปซูลเปรียบเทียบกับการใช้เซลล์โปรไบโอติคในรูปเซลล์อิสระเสริมในอาหารกุ้งขาว

4.1.1 ผลต่อประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้

ผลของการเปรียบเทียบการเสริมโปรไบโอติค *B. subtilis* (BF) และ *P. acidilactici* (PF) ในรูปเซลล์อิสระและการเสริมโปรไบโอติค *B. subtilis* (BE) และ *P. acidilactici* (PE) ในรูปแคปซูลในอาหารกุ้งขาวต่อประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ แสดงดังตารางที่ 4.1 พบว่า กุ้งในกลุ่ม BE และ PE จะมีจำนวนแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติค (lactic acid bacteria) แบคทีเรียกลุ่ม *Bifidobacterium* spp. และแบคทีเรียรวม (total aerobic bacteria) ในลำไส้กุ้งขาวสูงกว่ากลุ่มทดลอง BF PF และกลุ่มควบคุม (control) นอกจากนี้พบว่า กุ้งในกลุ่มทดลองที่มีการเสริมเชื้อโปรไบโอติค *B. subtilis* และ *P. acidilactici* ในรูปอิสระและรูปแคปซูลจะมีจำนวนเชื้อ *Vibrio* และจำนวนยีสต์และเชื้อรา (yeast and fungi) ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม

4.1.2 ผลต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต

ผลของการเปรียบเทียบกุ้งในกลุ่มทดลองที่เสริมโปรไบโอติค 2 ชนิด คือ *B. subtilis* (BF) และ *P. acidilactici* (PF) ในรูปเซลล์อิสระและการเสริมโปรไบโอติคทั้ง 2 ชนิด (BE และ PE) ในรูปแคปซูลในอาหารต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตของกุ้งขาว (ตารางที่ 4.2) พบว่า กุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมโปรไบโอติค *B. subtilis* และ *P. acidilactici* ที่ผ่านการทำแคปซูล และกลุ่มทดลองที่เลี้ยงด้วยโปรไบโอติคในรูปอิสระทั้ง 2 ชนิด มีค่าน้ำหนักตัวสุดท้าย (final weight) น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (weight gain : WG) และอัตราการเจริญเติบโตต่อตัวต่อวัน (daily gain : DG) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) และกุ้งขาวทั้ง 4 กลุ่มทดลองมีค่าความยาวลำตัว (total length) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) นอกจากนี้พบว่า ค่าอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนักตัว (feed conversion ratio : FCR) และปริมาณอาหารที่กิน (feed intake : FI) ของทุกกลุ่มทดลองไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

4.1.3 ผลต่อองค์ประกอบทางเคมีในเนื้อ

ผลของการเปรียบเทียบการเสริมโปรไบโอติค *B. subtilis* (BF) และ *P. acidilactici* (PF) ในรูปเซลล์อิสระและการเสริมโปรไบโอติค *B. subtilis* (BE) และ *P. acidilactici* (PE) ในรูปแคปซูลในอาหารกุ้งขาวต่อค่าองค์ประกอบทางเคมีในเนื้อกุ้งขาว ที่ระยะเวลาการทดลอง 45 วัน (ตารางที่

4.3) พบว่า กุ้งขาวในกลุ่มทดลอง BF PF BE และ BF มีปริมาณความชื้น เถ้า ไขมัน และโปรตีนในเนื้อ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) แต่กุ้งขาวในกลุ่มทดลองที่ได้รับโปรไบโอติค PE จะมีปริมาณไขมันในในเนื้อสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

ตารางที่ 4.1 ผลของการเสริมโปรไบโอติคในรูปอิสระเปรียบเทียบกับเซลล์โปรไบโอติคในรูปแคปซูลในอาหารที่ใช้เลี้ยงกุ้งขาวต่อประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ (Log CFU/ลำไส้)

ชนิดแบคทีเรีย	BF	BE	PF	PE	Control
Total aerobic acteria	6.15±0.20^{ab}	6.08±0.20^{ab}	6.1±0.23^{ab}	6.24±0.10^{a}	5.57±0.17^{b}
Bifidobacterium	6.59±0.22^{ab}	6.84±0.18^{a}	5.95±0.45^{c}	6.16±0.24^{bc}	5.90±0.10^{c}
Lactic acid bacteria	4.23±0.19^{ab}	4.52±0.26^{ab}	4.92±0.22^{ab}	5.19±0.21^{a}	4.11±0.09^{b}
Yeast and fungi	4.24±0.21^{b}	4.72±0.26^{b}	4.36±0.20^{b}	4.49±0.20^{b}	5.70±0.30^{a}
Vibrio spp.	6.30±0.19^{ab}	6.15±0.15^{ab}	5.81±0.04^{bc}	5.58±0.16^{c}	6.49±0.32^{a}

หมายเหตุ : a b และ c ตัวอักษรที่แตกต่างกันภายในแถวเดียวกันแสดงความแตกต่างทางสถิติ (P<0.05)

กลุ่มทดลอง BF คือ *B. subtilis* ในรูปเซลล์อิสระ

กลุ่มทดลอง BE คือ *B. subtilis* ในรูปแคปซูล

กลุ่มทดลอง PF คือ *P. acidilactici* ในรูปเซลล์อิสระ

กลุ่มทดลอง PE คือ *P. acidilactici* ในรูปแคปซูล

ตารางที่ 4.2 ผลของการเสริมโปรไบโอติคในรูปเซลล์อิสระเปรียบเทียบกับเซลล์โปรไบโอติคในรูปแคปซูลในอาหารที่ใช้เลี้ยงกุ้งขาวเป็นระยะเวลา 45 วัน ต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต

สมรรถนะการเจริญเติบโต	BF	BE	PF	PE	control
Initial Weight (g)	1.80±0.28	2.0±0.40	1.93±0.29	1.94±0.17	2.0±0.38
Final Weight (g)	4.26±0.56	4.92±0.61	4.1±0.22	4.36±0.49	5.18±1.02
DG (g day^{-1})	0.055±0.01	0.065±0.01	0.048±0.01	0.054±0.01	0.062±0.01
WG (g)	2.46±0.53	2.92±0.44	2.17±0.41	2.42±0.42	2.80±0.63
Length (cm.)	8.59±0.38	8.99±0.43	8.13±0.13	8.73±0.07	8.79±0.53
FCR	1.23±0.10	1.57±0.17	1.60±0.13	1.33±0.01	1.09±0.18
FI (g)	3.94±0.01	4.02±0.03	3.91±0.05	3.91±0.06	3.69±0.10
Survival (%)	64±4.0	58±4.90	76±4.00	66±9.80	72±8.00

หมายเหตุ : daily gain (DG), น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นต่อตัวต่อวัน; weight gain (WG), น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น; feed conversion ratio (FCR), อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ และfeed Intake

(FI), ปริมาณอาหารที่กิน

กลุ่มทดลอง BF คือ *B. subtilis* ในรูปเซลล์อิสระ

กลุ่มทดลอง BE คือ *B. subtilis* ในรูปแคปซูล

กลุ่มทดลอง PF คือ *P. acidilactici* ในรูปเซลล์อิสระ

กลุ่มทดลอง PE คือ *P. acidilactici* ในรูปแคปซูล

ตารางที่ 4.3 ผลของการเสริมโปรไบโอติคในรูปอิสระเปรียบเทียบกับเซลล์โปรไบโอติคในรูปแคปซูลในอาหารที่ใช้เลี้ยงกุ้งขาวต่อค่าองค์ประกอบทางเคมีในเนื้อ

องค์ประกอบทางเคมีในเนื้อ	BF	BE	PF	PE	Control
ความชื้น (%)	24.90±0.17^{ab}	24.94±0.34^{ab}	24.46±0.22^{b}	24.79±0.10^{ab}	25.30±0.10^{a}
เถ้า (%)	3.22±0.09	3.10±0.07	3.24±0.09	3.12±0.04	3.35±0.12
ไขมัน (%)	0.64±0.06^{ab}	0.66±0.09^{ab}	0.70±0.03^{ab}	0.75±0.06^{a}	0.53±0.08^{b}
โปรตีน (%)	13.44±0.48	14.53±0.58	13.74±0.30	13.51±0.22	13.90±0.48

หมายเหตุ : a และ b ตัวอักษรที่แตกต่างกันภายในแถวเดียวกันแสดงความแตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$)

กลุ่มทดลอง BF คือ *B. subtilis* ในรูปเซลล์อิสระ

กลุ่มทดลอง BE คือ *B. subtilis* ในรูปแคปซูล

กลุ่มทดลอง PE คือ *P. acidilactici* ในรูปเซลล์อิสระ

กลุ่มทดลอง PE คือ *P. acidilactici* ในรูปแคปซูล

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4.2 การทดลองที่ 2 ผลของการเสริมโปรไบโอติคที่ผ่านการทำแคปซูลร่วมกับสารเสริมนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) และเบต้ากลูแคน (ß-glucan) ในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมด์

4.2.1 ผลต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต

ผลการศึกษาการเสริมโปรไบโอติค *B. subtilis* และ *P. acidilactici* ร่วมกับสารเสริมเบต้ากลูแคน (ß-glucan) และนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ที่ระยะเวลา 90 วันต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต พบว่า ที่ระยะเวลาการทดลอง 45 วัน ค่าพารามิเตอร์ทางสมรรถนะการเจริญเติบโตได้แก่ น้ำหนักตัวเฉลี่ย (body weight) น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (weight gain : WG) ความยาวลำตัว (total length) ความยาวลำตัวที่เพิ่มขึ้น (length gain) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate : SGR) และอัตราการเจริญเติบโตต่อตัวต่อวัน (daily gain : DG) ของกลุ่มการทดลองไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ต่อมาที่ระยะเวลา 45-90 วัน พบว่า น้ำหนักตัวเฉลี่ย (body weight) น้ำหนักที่

เพิ่มขึ้น (weight gain : WG) อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนักตัว (feed conversion ratio : FCR) และความยาวลำตัว (total length) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) แต่ค่าปริมาณอาหารที่กิน (feed intake : FI) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate : SGR) และอัตราการเจริญเติบโตต่อตัวต่อวัน (daily gain : DG) ของกลุ่มทดลองกุ้งทั้ง 9 กลุ่ม ได้แก่ Bb Bn Bbn Pb Pn Pbn b n และ bn ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) แต่ค่าดังกล่าวของกลุ่มการทดลองทั้ง 9 กลุ่มนี้ มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุม (P<0.05) และเมื่อวิเคราะห์ผลการเลี้ยงตลอด 90 วัน พบว่า อัตราการเจริญเติบโตต่อตัวต่อวัน (daily gain : DG) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate : SGR) และอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนักตัว (feed conversion ratio : FCR) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) แต่ค่าน้ำหนักตัวเฉลี่ย (body weight) ของกลุ่มทดลองกุ้งทั้ง 9 กลุ่ม ได้แก่ Bb Bn Bbn Pb Pn Pbn b n และ bn ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) แต่ค่าดังกล่าวของกลุ่มการทดลองทั้ง 9 กลุ่มนี้มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ค่าน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (weight gain : WG) ของกลุ่มทดลองกุ้งทั้ง 9 กลุ่ม ได้แก่ Bb Bn Bbn Pb Pn Pbn b n และ bn ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) แต่ค่าน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (weight gain : WG) ในกลุ่มทดลอง Pb ค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) และพบว่า กลุ่มทดลองกุ้งทั้ง 7 กลุ่ม ได้แก่ Bb Pb Pn Pbn b n และ bn มีค่าความยาวลำตัว (total length) และความยาวลำตัวที่เพิ่มขึ้น (length gain : LG) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) แต่ค่าดังกล่าวของกลุ่มทดลองทั้ง 7 กลุ่มนี้มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ในขณะที่กุ้งกลุ่มทดลอง Bn และ Bbn มีค่าไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

4.2.2 ผลต่อประชากรจุลินทรีย์

ผลการศึกษาการเสริมโปรไบโอติก *B subtilis* และ *P. acidilactici* ร่วมกับสารเสริมเบต้ากลูแคน (ß-glucan) และนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ที่ระยะเวลา 90 วันต่อประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ แสดงดังตารางที่ 4.6 พบว่า ที่ระยะเวลาการทดลอง 45 วัน กุ้งขาวทั้ง 10 กลุ่มทดลอง มีจำนวนแบคทีเรียรวม (total aerobic bacteria) และจำนวนแบคทีเรียกลุ่ม *Bifidobacterium* ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) เมื่อวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติค (lactic acid bacteria) ในลำไส้ พบว่า กลุ่มทดลอง Bb Bn Bbn และ Pb มีจำนวนแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติค (lactic acid bacteria) ในลำไส้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) แต่กลุ่มทดลองทั้ง 4 กลุ่มนี้ Bb Bn Bbn และ Pb มีจำนวนแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติค (lactic acid bacteria) สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ในขณะที่กลุ่มทดลอง Pn Pbn b n และ bn มีจำนวนแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติค (lactic acid bacteria) ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) เมื่อวิเคราะห์จำนวนยีสต์และรา (yeast and fungi) ในลำไส้ พบว่า กลุ่มทดลอง Bb Bn Bbn n และ bn มีจำนวนยีสต์และรา (yeast and fungi) ในลำไส้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทาง

สถิติ (P>0.05) แต่กลุ่มทดลองกุ้งทั้ง 5 กลุ่มนี้ Bb Bn Bbn n และ bn มีจำนวนยีสต์และรา (yeast and fungi) ในลำไส้สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ในขณะที่กลุ่มทดลอง Pb Pn Pbn และ b มีจำนวนยีสต์และรา (yeast and fungi) ในลำไส้ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) เมื่อวิเคราะห์จำนวน *Vibrio* spp. ในลำไส้ พบว่า กลุ่มทดลองกุ้งทั้ง 9 กลุ่ม ได้แก่ Bb Bn Bbn Pb Pn Pbn b n และ bn มีจำนวน *Vibrio* spp. ในลำไส้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) และกลุ่มทดลอง Bn และ Pb มีจำนวนเชื้อ *Vibrio* spp. ในลำไส้ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) และที่ระยะเวลาการทดลอง 90 วัน แสดงดังตารางที่ 4.7 พบว่า กลุ่มทดลองกุ้งทั้ง 10 กลุ่ม มีจำนวนแบคทีเรียรวม (total aerobic bacteria) จำนวนแบคทีเรียกลุ่ม *Bifidobacterium* และจำนวนยีสต์และรา (yeast and fungi) ในลำไส้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) และเมื่อวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติค (lactic acid bacteria) ในลำไส้ พบว่า กลุ่มทดลองกุ้งทั้ง 9 กลุ่ม ได้แก่ Bb Bn Bbn Pb Pn Pbn b n และ bn มีจำนวนแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติค (lactic acid bacteria) ในลำไส้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) แต่พบว่ากลุ่มทดลอง Bb มีจำนวนแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติค (lactic acid bacteria) ในลำไส้สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) และเมื่อวิเคราะห์จำนวน *Vibrio* spp. ในลำไส้ พบว่า กลุ่มทดลองกุ้งทั้ง 7 กลุ่ม ได้แก่ Bbn Pb Pn Pbn b n และ bn มีจำนวน *Vibrio* spp. ในลำไส้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) แต่กลุ่มทดลอง Bb และ Bn มีจำนวน *Vibrio* spp. ในลำไส้ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

4.2.3 ผลต่อองค์ประกอบทางเคมีในเนื้อ

ผลการศึกษาการเสริมโปรไบโอติค *B. subtilis* และ *P. acidilactici* ร่วมกับสารเสริมเบต้ากลูแคน (ß-glucan) และนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ที่ระยะเวลา 90 วัน ต่อองค์ประกอบทางเคมีในเนื้อกุ้งขาว พบว่า ที่ระยะเวลาการทดลอง 45 วัน กลุ่มทดลองกุ้งทั้ง 8 กลุ่ม ได้แก่ Bb Bn Bbn Pb Pn Pbn n และ bn มีปริมาณความชื้นในเนื้อไม่แตกต่างกันจากกลุ่มควบคุม (P>0.05) แต่กลุ่มทดลอง b มีปริมาณความชื้นในเนื้อสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) เมื่อวิเคราะห์ปริมาณเถ้าในเนื้อ พบว่า กลุ่มทดลอง Bb Bbn Pb Pn และ Pbn มีปริมาณเถ้าในเนื้อไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) ในขณะที่กลุ่มทดลอง b และ n มีปริมาณเถ้าในเนื้อสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) เมื่อวิเคราะห์ปริมาณไขมันในเนื้อ พบว่า กลุ่มทดลองกุ้งทั้ง 8 กลุ่ม ได้แก่ Bb Bn Bbn Pb Pn Pbn b และ n มีปริมาณไขมันในเนื้อไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) แต่กลุ่มทดลองทั้ง 8 กลุ่มนี้ มีปริมาณไขมันในเนื้อสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ในขณะที่กลุ่มทดลอง bn มีปริมาณไขมันในเนื้อไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) เมื่อวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในเนื้อ พบว่า กลุ่มทดลองกุ้งทั้ง 6 กลุ่ม ได้แก่ Bb Pn Pbn b n และ bn มีปริมาณโปรตีนในเนื้อไม่แตกต่าง

กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) และพบว่ากลุ่มทดลอง Bn Bbn และ Pb มีปริมาณโปรตีนในเนื้อต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) (ดังตารางที่ 4.8) และที่ระยะเวลาการทดลอง 90 วัน พบว่า กลุ่มทดลองกุ้งทั้ง 9 กลุ่ม ได้แก่ Bb Bn Bbn Pb Pn Pbn b n และ bn มีปริมาณความชื้นในเนื้อไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) แต่กลุ่มทดลองทั้ง 9 กลุ่มนี้มีปริมาณความชื้นในเนื้อสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) เมื่อวิเคราะห์ปริมาณเถ้าในเนื้อ พบว่า กลุ่มทดลองกุ้งทั้ง 4 กลุ่ม ได้แก่ Bb Bn Bbn และ b มีปริมาณเถ้าในเนื้อไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) แต่กลุ่มทดลองทั้ง 4 กลุ่มนี้ มีปริมาณเถ้าในเนื้อสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ในขณะที่กลุ่มทดลอง Pb Pn Pbn n และ bn มีปริมาณเถ้าในเนื้อไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) เมื่อวิเคราะห์ปริมาณไขมันในเนื้อ พบว่า กลุ่มทดลองกุ้งทั้ง 5 กลุ่ม ได้แก่ Bb Bn Bbn Pb และ Pn มีปริมาณไขมันในเนื้อไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) แต่กลุ่มทดลองทั้ง 5 กลุ่มนี้ มีปริมาณไขมันในเนื้อสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ในขณะที่กลุ่มทดลอง Pbn b n และ bn มีปริมาณไขมันในเนื้อไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) เมื่อวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในเนื้อ พบว่า กลุ่มทดลองกุ้งทั้ง 9 กลุ่ม ได้แก่ Bb Bn Bbn Pb Pn Pbn b n และ bnมีปริมาณโปรตีนในเนื้อไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) แต่กลุ่มทดลองทั้ง 9 กลุ่มนี้ มีปริมาณโปรตีนในเนื้อสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) (ดังตารางที่ 4.9)

4.2.4 ผลต่อค่าความสูงของวิลไล

ผลการศึกษาการเสริมโปรไบโอติค *B. subtilis* และ *P. acidilactici* ร่วมกับสารเสริมเบต้ากลูแคน (ß-glucan) และนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ที่ระยะเวลา 90 วันต่อค่าความสูงของวิลไลในลำไส้ พบว่า ที่บริเวณลำไส้ส่วนต้นของกุ้งขาวที่ระยะเวลาการทดลอง 45 วัน กลุ่มทดลองกุ้งทั้ง 8 กลุ่ม ได้แก่ Bb Bn Bbn Pb Pn Pbn b และ bn มีค่าความสูงของวิลไลในลำไส้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) แต่กลุ่มทดลองทั้ง 8 กลุ่มนี้มีค่าความสูงของวิลไลสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ในขณะที่กลุ่มทดลอง n มีค่าความสูงของวิลไลในลำไส้ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) และที่ระยะเวลาการทดลอง 90 วัน พบว่า กลุ่มทดลองกุ้งทั้ง 8 กลุ่ม ได้แก่ Bb Bn Bbn Pb Pn Pbn n และ bn มีค่าความสูงของวิลไลในลำไส้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) แต่กลุ่มทดลองทั้ง 8 กลุ่มนี้มีค่าความสูงของวิลไลสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ในขณะที่กลุ่มทดลอง b มีค่าความสูงของวิลไลในลำไส้ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) เมื่อวิเคราะห์ค่าความสูงของวิลไลที่บริเวณลำไส้ส่วนท้ายของกุ้งขาวที่ระยะเวลาการทดลอง 45 วัน พบว่า กลุ่มทดลองกุ้งทั้ง 9 กลุ่ม ได้แก่ Bb Bn Bbn Pb Pn Pbn b n และ bn มีค่าความสูงของวิลไลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) แต่กลุ่มทดลองทั้ง 9 กลุ่มนี้มีค่าความสูงของวิลไลสูงกว่ากลุ่ม

ควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) และที่ระยะเวลาการทดลอง 90 วัน พบว่า กลุ่มทั้ง 8 กลุ่ม ได้แก่ Bn Bbn Pb Pn Pbn b n และ bn มีค่าความสูงของวิลไลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) แต่กลุ่มทดลองทั้ง 8 กลุ่มนี้มีค่าความสูงของวิลไลสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ในขณะที่กลุ่มทดลอง Bb มีค่าความสูงของวิลไลในลำไส้ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) (ดังตารางที่ 4.10)

4.2.5 ค่าโลหิตวิทยา

ผลการศึกษาการเสริมโปรไบโอติค *B. subtilis* และ *P. acidilactici* ร่วมกับสารเสริมเบต้ากลูแคน (ß-glucan) และนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ที่ระยะเวลา 90 วันต่อค่าโลหิตวิทยา พบว่า กุ้งขาวทั้ง 10 กลุ่มทดลองมีค่าโปรตีนรวมในพลาสมา (plasma total protein) และค่าไนโตรเจนยูเรียในพลาสมา (plasma urea nitrogen) ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) เมื่อวิเคราะห์ค่ากลูโคสในพลาสมา (plasma glucose) พบว่า กลุ่มทดลองกุ้งทั้ง 8 กลุ่ม ได้แก่ Bb Bn Pb Pn Pbn n b และ bn มีค่ากลูโคสในพลาสมา (plasma glucose) ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (P>0.05) ในขณะที่กลุ่มทดลอง b มีค่ากลูโคสในพลาสมา (plasma glucose) สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) เมื่อวิเคราะห์ค่าคลอเลสเตอรอลในพลาสมา (plasma cholesterol) พบว่า กลุ่มทดลองกุ้งทั้ง 8 กลุ่ม ได้แก่ Bb Bn Pb Pn Pbn n b และ bn มีค่าคลอเลสเตอรอลในพลาสมา (plasma cholesterol) ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (P>0.05) ในขณะที่กลุ่มทดลอง Bbn มีค่าคลอเลสเตอรอลในพลาสมา (plasma cholesterol) ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) เมื่อวิเคราะห์ค่าไตรกลีเซอไรด์ในพลาสมา (plasma triglycerides) พบว่า กลุ่มทดลองกุ้งทั้ง 9 กลุ่ม ได้แก่ Bb Bn Bbn Pb Pn Pbn n b และ bn มีค่าไตรกลีเซอไรด์ในพลาสมา (plasma triglycerides) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) แต่ค่าไตรกลีเซอไรด์ในพลาสมา (plasma triglycerides) ของกลุ่มทดลองทั้ง 9 กลุ่มนี้มีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) เมื่อวิเคราะห์ค่าคลอไรด์ในพลาสมา (plasma chloride) พบว่า กลุ่มทดลองกุ้งทั้ง 8 กลุ่ม ได้แก่ Bb Bn Pb Pn Pbn n b และ bn มีค่าคลอไรด์ในพลาสมา (plasma chloride) ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (P>0.05) ในขณะที่กลุ่มทดลอง Bbn มีค่าคลอไรด์ในพลาสมา (plasma chloride) ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) เมื่อวิเคราะห์ค่า osmolality ในพลาสมา (plasma osmolality) พบว่า กลุ่มทดลองกุ้งทั้ง 8 กลุ่ม ได้แก่ Bb Bn Pb Pn Pbn n b และ bn มีค่า osmolality ในพลาสมา (plasma osmolality) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) แต่ค่า osmolality ของกลุ่มทดลองทั้ง 8 กลุ่มนี้ มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ในขณะที่กลุ่มทดลอง Bbn มีค่า osmolality ไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม (P>0.05)

เมื่อกุ้งขาวได้รับความเครียดจากสภาวะที่มีแอมโมเนียในน้ำเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าค่ากลูโคสในพลาสมา (glucose plasma) มีค่าไม่แตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งขาวในสภาวะ

ปกติโดยพบว่า กลุ่มทดลองกุ้งทั้ง 9 กลุ่ม ได้แก่ Bb Bn Bbn Pb Pn Pbn n b และ bn มีค่ากลูโคสในพลาสมา (glucose plasma) ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (P<0.05) เมื่อวิเคราะห์ค่าคลอเลสเตอรอลในพลาสมา (plasma cholesterol) พบว่า ค่าคลอเลสเตอรอลในพลาสมา (plasma cholesterol) มีค่าเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งขาวในสภาวะปกติ และพบว่า กลุ่มทดลองกุ้งทั้ง 7 กลุ่ม ได้แก่ Bb Bn Bbn Pb Pbn b และ n มีค่าคลอเลสเตอรอลในพลาสมา (plasma cholesterol) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) แต่กลุ่มทดลองทั้ง 7 กลุ่มนี้มีค่าคลอเลสเตอรอลในพลาสมา (plasma cholesterol) สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ในขณะที่กลุ่มทดลอง Pn และ bn มีค่าคลอเลสเตอรอลในพลาสมา (plasma cholesterol) ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) เมื่อวิเคราะห์ค่าไตรกลีเซอไรด์ในพลาสมา (plasma triglycerides) พบว่า ค่าไตรกลีเซอไรด์ในพลาสมา (plasma triglycerides) มีค่าเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งขาวในสภาวะปกติ และพบว่ากลุ่มทดลองกุ้งทั้ง 5 กลุ่ม ได้แก่ Bn Bbn Pb Pn และ bn มีค่าไตรกลีเซอไรด์ในพลาสมา (plasma triglycerides) ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ในขณะที่กลุ่มทดลอง Bb Pbn b และ n มีค่าไตรกลีเซอไรด์ในพลาสมา (plasma triglycerides) ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) เมื่อวิเคราะห์ค่าโปรตีนรวมในพลาสมา (plasma total protein) พบว่า ค่าโปรตีนรวมในพลาสมา (plasma total protein) มีค่าลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งขาวในสภาวะปกติ และพบว่า กลุ่มทดลองกุ้งทั้ง 7 กลุ่ม ได้แก่ Bb Bn Pn Pbn b n และ bn มีค่าโปรตีนรวมในพลาสมา (plasma total protein) ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (P>0.05) ในขณะที่กลุ่มทดลอง Bbn และ Pb มีค่าโปรตีนรวมในพลาสมา (plasma total protein) สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) เมื่อวิเคราะห์ค่าไนโตรเจนยูเรียในพลาสมา (plasma urea nitrogen) พบว่า ค่าไนโตรเจนยูเรียในพลาสมา (plasma urea nitrogen) มีค่าไม่แตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งขาวในสภาวะปกติ และพบว่า กลุ่มทดลองกุ้งทั้ง 7 กลุ่มได้แก่ Bb Bn Bbn Pb b n และ bn มีค่าไนโตรเจนยูเรียในพลาสมา (plasma urea nitrogen) ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (P>0.05) ในขณะที่กลุ่มทดลอง Pn และ Pbn มีค่าไนโตรเจนจากสารยูเรียในพลาสมา (plasma urea nitrogen) สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) เมื่อวิเคราะห์ค่าคลอไรด์ในพลาสมา (plasma chloride) พบว่า ค่าคลอไรด์ในพลาสมา (plasma chloride) มีค่าเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งขาวในสภาวะปกติ และพบว่า กลุ่มทดลองทั้ง 6 กลุ่ม ได้แก่ Bb Bn Pbn b n และ bn มีค่าคลอไรด์ในพลาสมา (plasma chloride) ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (P>0.05) ในขณะที่กลุ่มทดลอง Bbn, Pb และ Pn มีค่าคลอไรด์ในพลาสมา (plasma chloride) ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) และเมื่อวิเคราะห์ค่า osmolality ในพลาสมา (plasma osmolality) พบว่า ค่า osmolality ในพลาสมา (plasma osmolality) มีค่าไม่แตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งขาวในสภาวะปกติ และพบว่ากลุ่มทดลองทั้ง 10 กลุ่ม มีค่า osmolality ในพลาสมา (plasma osmolality) ไม่แตกต่างกันอย่างมี

นัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) (ดังตารางที่ 4.12 และ 4.13)

4.2.6 ผลต่อค่าภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ

ผลการศึกษาการเสริมโปรไบโอติค *B. subtilis* และ *P. acidilactici* ร่วมกับสารเสริมเบต้ากลูแคน (ß-glucan) และนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ที่ระยะเวลา 90 วันต่อค่าภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ พบว่า ปริมาณเม็ดเลือดรวม (total hemocyte count) และค่ากิจกรรมไลโซไซม์ (lysozyme activity) ของกุ้งทุกกลุ่มการทดลองไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทางสถิติ (P>0.05) เมื่อวิเคราะห์ค่าซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (superoxide anion production) พบว่า กลุ่มทดลองกุ้งทั้ง 9 กลุ่ม ได้แก่ Bb Bn Bbn Pb Pn Pbn n b และ bn มีค่าซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (superoxide anion production) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) แต่ค่าซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (superoxide anion production) ของกลุ่มทดลองทั้ง 9 กลุ่มนี้มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) เมื่อวิเคราะห์ค่ากิจกรรมฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase activity) พบว่า กลุ่มทดลองกุ้งทั้ง 6 กลุ่ม ได้แก่ Bb Bn Bbn n b และ bn มีค่ากิจกรรมฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase activity) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) แต่ค่าดังกล่าวของกลุ่มทดลองทั้ง 6 กลุ่มนี้มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิต (P<0.05) ในขณะที่ค่ากิจกรรมฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase activity) ของกลุ่มทดลอง Pn Pbn และ b มีค่ากิจกรรมฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase activity) ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (P>0.05) (ดังตารางที่ 4.14)

เมื่อกุ้งขาวได้รับความเครียดจากสภาวะที่มีแอมโมเนียในน้ำเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า ปริมาณเม็ดเลือดรวม (total hemocyte count) กลุ่มทดลองทั้ง 10 กลุ่ม ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทางสถิติ (P>0.05) เมื่อวิเคราะห์ค่าซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (superoxide anion production) พบว่า ค่าซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (superoxide anion production) มีค่าลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งขาวในสภาวะปกติ และพบว่า กลุ่มทดลองกุ้งทั้ง 5 กลุ่ม ได้แก่ Bb Bbn Pb Pbn และ b มีค่าการผลิตซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (superoxide anion production) สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ในขณะที่กลุ่มทดลอง Bn Pn n และ bn มีค่าซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (superoxide anion production) ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทางสถิติ (P>0.05) เมื่อวิเคราะห์ค่ากิจกรรมฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase activity) พบว่า ค่ากิจกรรมฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase activity) มีค่าลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งขาวในสภาวะปกติ และพบว่า กลุ่มทดลองทั้ง 8 กลุ่ม ได้แก่ Bn Bbn Pb Pn Pbn n b และ bn มีค่ากิจกรรมฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase activity) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) แต่ค่ากิจกรรมฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase activity) ของกลุ่มทดลองทั้ง 8 กลุ่มนี้ มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) และเมื่อวิเคราะห์ค่ากิจกรรมไลโซไซม์ (lysozyme activity) พบว่า มีค่าไม่แตกต่างจากกุ้งขาวในสภาวะปกติ (ดังตารางที่ 4.15)

ตารางที่ 4.4 ผลของการเสริมโปรไบโอติคร่วมกับสารเสริมต่อการเจริญเติบโตในกุ้งขาวแวนนาไมด์หลังจากทำการทดลองเป็นระยะเวลา 45 และ 90 วัน

กลุ่มทดลอง	Body Weight (g)			Weight gain (g)			Total length (cm)		Length gain (cm.)	FCR
	0 Day	45 Day	90 Day	0-45 Day	45-90 Day	0-90 Day	45 Day	90 Day		0-45 Day
Bb	0.16±0.02	1.08±0.83	4.04±0.56^{ab}	0.91±0.08	2.97±0.61	3.88±0.42^{ab}	5.23±0.8	8.35±0.48^{abc}	3.122±0.48^{abc}	1.45±0.14
Bn	0.15±0.01	1.01±0.11	3.28±0.28^{ab}	0.86±0.24	2.27±0.29	3.13±0.29^{ab}	5.21±0.21	7.83±0.19^{c}	2.662±0.31^{c}	1.56±0.18
Bbn	0.15±0.02	0.84±0.12	3.49±0.46^{ab}	0.68±0.30	2.65±0.49	3.33±0.46^{ab}	4.78±0.28	7.83±0.43^{c}	3.05±0.45^{c}	1.71±0.20
Pb	0.16±0.02	0.88±0.21	4.94±0.40^{a}	0.73±0.43	4.05±0.38	4.78±0.39^{a}	4.97±0.31	9.28±0.08^{a}	4.32±0.37^{a}	2.20±0.41
Pn	0.15±0.02	0.82±0.1	4.60±0.85^{ab}	0.68±0.23	3.77±0.78	4.45±0.85^{ab}	4.78±0.13	8.73±0.48^{abc}	3.95±0.46^{abc}	2.08±0.33
Pbn	0.15±0.01	0.84±0.09	3.86±0.36^{ab}	0.70±0.09	3.02±0.38	3.71±0.36^{ab}	4.88±0.21	8.44±0.25^{abc}	3.56±0.33^{abc}	1.89±0.17
b	0.15±0.02	0.96±0.13	4.84±0.73^{ab}	0.81±0.13	3.87±0.78	4.69±0.74^{ab}	5.49±0.38	9.14±0.25^{ab}	3.64±0.29^{ab}	1.86±0.41
n	0.15±0.02	0.80±0.08	4.37±0.63^{ab}	0.65±0.09	3.58±0.59	4.22±0.63^{ab}	5.04±0.24	8.95±0.38^{ab}	3.90±0.33^{ab}	2.30±0.35
bn	0.16±0.02	0.74±0.05	3.55±0.39^{ab}	0.59±0.07	2.80±0.38	3.39±0.41^{ab}	4.86±0.26	8.13±0.35^{bc}	2.27±0.56^{bc}	2.31±0.22
C	0.15±0.02	0.79±0.05	3.14±0.42^{b}	0.64±0.15	2.35±0.45	2.99±0.41^{b}	4.9±0.18	7.66±0.26^{c}	2.76±0.19^{c}	2.15±0.21

หมายเหตุ : a b และ c ตัวอักษรที่แตกต่างกันภายในคอลัมน์เดียวกันแสดงความแตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$)

Bb คือ เสริมโปรไบโอติค *B. subtilis* ร่วมกับ ß-glucan

Bn คือ เสริมโปรไบโอติค *B. subtilis* ร่วมกับ nucleotide

Bbn คือ เสริมโปรไบโอติค *B. subtilis* ร่วมกับ ß-glucan และ nucleotide

Pbn คือ เสริมโปรไบโอติค *P. acidilactici* ร่วมกับ ß-glucan และ nucleotide

Pn คือ เสริมโปรไบโอติค *P. acidilactici* ร่วมกับ nucleotide

b คือ เสริมสารเสริม ß-glucan

n คือ เสริมสารเสริม nucleotide

bn คือ เสริมสารเสริม ß-glucan ร่วมกับ nucleotide

C คือ สูตรอาหารพื้นฐาน (control)

Pb คือ เสริมโปรไบโอติค *P. acidilactici* ร่วมกับ ß-glucan

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.5 ผลของการเสริมโปรไบโอติคร่วมกับสารเสริมต่อการเจริญเติบโตในกุ้งขาวแวนนาไมด์ หลังจากทำการทดลองเป็นระยะเวลา 45 และ 90 วัน

กลุ่มทดลอง	FCR		FI (g)			SGR (%)			DG (g/day^{-1})		
	45-90 Day	0-90 Day	0-45 Day	45-90 Day	0-90 Day	0-45 Day	45-90 Day	0-90 Day	0-45 Day	45-90 Day	0-90 Day
Bb	2.52±0.27^{ab}	2.29±0.21	1.27±0.02	8.50±0.13^{ab}	9.78±0.13^{ab}	3.34±0.86	2.88±0.46^{ab}	3.54±0.31	0.02±0.002	0.066±0.01^{ab}	0.04±0.01
Bn	3.46±0.36^{a}	2.87±0.13	1.27±0.09	8.44±0.13^{ab}	9.70±0.14^{abc}	4.21±0.24	2.62±0.29^{ab}	3.42±0.20	0.02±0.002	0.05±0.006^{b}	0.04±0.01
Bbn	3.28±0.52^{ab}	2.90±0.25	1.35±0.05	8.63±0.31^{ab}	9.98±0.36^{ab}	3.71±0.60	2.69±0.32^{ab}	3.46±0.18	0.02±0.003	0.059±0.012^{ab}	0.04±0.01
Pb	2.24±0.22^{ab}	2.18±0.23	1.31±0.05	8.76±0.19^{a}	10.07±0.22^{a}	3.74±0.34	3.45±0.19^{a}	3.86±0.15	0.02±0.004	0.09±0.008^{a}	0.05±0.01
Pn	2.09±0.29^{b}	2.09±0.31	1.27±0.04	8.31±0.21^{abc}	9.58±0.24^{abc}	3.83±0.37	3.17±0.40^{ab}	3.79±0.25	0.02±0.02	0.084±0.017^{ab}	0.05±0.01
Pbn	2.84±0.39^{ab}	2.60±0.28	1.26±0.03	8.01±0.24^{bcd}	9.26±0.27^{bcd}	3.88±0.24	2.87±0.22^{ab}	3.64±0.17	0.02±0.002	0.067±0.008^{ab}	0.04±0.02
b	2.07±0.33^{b}	1.97±0.25	1.31±0.05	8.15±0.27^{abc}	9.46±0.28^{abc}	4.05±0.46	3.32±0.35^{ab}	3.82±0.29	0.02±0.003	0.086±0.017^{ab}	0.05±0.01
n	2.24±0.43^{ab}	2.20±0.43	1.37±0.03	8.02±0.14^{bcd}	9.38±0.16^{abcd}	3.77±0.48	3.09±0.37^{ab}	3.75±0.28	0.01±0.002	0.079±0.013^{ab}	0.05±0.01
bn	2.63±0.32^{ab}	2.53±0.32	1.30±0.05	7.41±0.15^{d}	8.71±0.15^{d}	3.56±0.46	2.65±0.28^{ab}	3.49±0.28	0.01±0.002	0.06±0.008^{ab}	0.04±0.02
C	3.14±0.49^{ab}	2.80±0.32	1.33±0.05	7.68±0.22^{cd}	9.01±0.22^{cd}	3.70±0.36	2.34±0.33^{b}	3.34±0.16	0.01±0.001	0.052±0.01^{ab}	0.04±0.01

หมายเหตุ : a b c และ d ตัวอักษรที่แตกต่างกันภายในคอลัมน์เดียวกันแสดงความแตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$)

Bb คือ เสริมโปรไบโอติค *B. subtilis* ร่วมกับ ß-glucan

Bn คือ เสริมโปรไบโอติค *B. subtilis* ร่วมกับ nucleotide

Bbn คือ เสริมโปรไบโอติค *B. subtilis* ร่วมกับ ß-glucan และ nucleotide

Pbn คือ เสริมโปรไบโอติค *P. acidilactici* ร่วมกับ ß-glucan และ nucleotide

Pn คือ เสริมโปรไบโอติค *P. acidilactici* ร่วมกับ nucleotide

b คือ เสริมสารเสริม ß-glucan

n คือ เสริมสารเสริม nucleotide

bn คือ เสริมสารเสริม ß-glucan ร่วมกับ nucleotide

C คือ สูตรอาหารพื้นฐาน (control)

Pb คือ เสริมโปรไบโอติค *P. acidilactici* ร่วมกับ ß-glucan

ตารางที่ 4.6 ผลของการเสริมโปรไบโอติคร่วมกับสารเสริมต่อประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้กุ้งขาวแวนนาไมด์หลังจากทำการทดลองเป็นระยะเวลา 45 วัน (Log CFU/g)

กลุ่มทดลอง	Total aerobic bacteria	*Bifidobacterium*	Lactic acid bacteria	Yeast and fungi	*Vibrio* spp.
Bb	6.52±0.28	6.53±0.28	6.46±0.36^{a}	6.19±0.56^{ab}	5.15±0.20^{bc}
Bn	6.23±0.27	6.3±0.21	5.57±0.24^{abc}	6.42±0.43^{ab}	5.09±0.18^{b}
Bbn	6.49±0.39	6.06±0.45	5.98±0.21^{ab}	6.10±0.29^{ab}	5.75±0.16^{abc}
Pb	6.23±0.18	6.43±0.46	5.85±0.48^{abc}	5.40±0.53^{b}	5.07±0.35^{c}
Pn	6.09±0.40	6.3±0.26	5.44±0.18^{bc}	5.06±0.46^{b}	5.90±0.52^{abc}
Pbn	6.3±0.21	6.68±0.24	4.96±0.17^{b}	5.13±0.77^{b}	6.21±0.17^{a}
b	5.89±0.55	6.18±0.41	5.44±0.24^{bc}	5.49±0.42^{b}	6.11±0.23^{ab}
n	6.46±0.45	5.84±0.30	5.40±0.12^{bc}	7.06±0.25^{a}	6.08±0.50^{ab}
bn	5.89±0.40	5.91±0.40	4.95±0.45^{b}	5.83±0.34^{ab}	5.96±0.12^{abc}
C	6.61±0.86	5.66±0.26	5.20±0.33^{bc}	5.55±0.32^{b}	6.27±0.29^{a}

หมายเหตุ : a b และ c ตัวอักษรที่แตกต่างกันภายในคอลัมน์เดียวกันแสดงความแตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$)

Bb คือ เสริมโปรไบโอติค *B. subtilis* ร่วมกับ ß-glucan

Bn คือ เสริมโปรไบโอติค *B. subtilis* ร่วมกับ nucleotide

Bbn คือ เสริมโปรไบโอติค *B. subtilis* ร่วมกับ ß-glucan และ nucleotide

Pb คือ เสริมโปรไบโอติค *P. acidilactici* ร่วมกับ ß-glucan

Pn คือ เสริมโปรไบโอติค *P. acidilactici* ร่วมกับ nucleotide

Pbn คือ เสริมโปรไบโอติค *P. acidilactici* ร่วมกับ ß-glucan และ nucleotide

b คือ เสริมสารเสริม ß-glucan

n คือ เสริมสารเสริม nucleotide

bn คือ เสริมสารเสริม ß-glucan ร่วมกับ nucleotide

C คือ สูตรอาหารพื้นฐาน (control)

ตารางที่ 4.7 ผลของการเสริมโปรไบโอติคร่วมกับสารเสริมต่อประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้กุ้งขาวแวนนาไมด์หลังจากทำการทดลองเป็นระยะเวลา 90 วัน (Log CFU/g)

กลุ่มทดลอง	Total aerobic bacteria	*Bifidobacterium*	Lactic acid bacteria	Yeast and fungi	*Vibrio* spp.
Bb	6.65±0.35	6.34±0.32	6.09±0.43[a]	5.58±0.46	4.54±0.16[b]
Bn	6.07±0.33	5.8±0.40	5.60±0.42[ab]	5.17±0.47	4.55±0.12[b]
Bbn	5.95±0.31	5.68±0.34	5.49±0.42[ab]	4.98±0.49	5.13±0.55[ab]
Pb	5.89±0.19	5.55±0.26	5.37±0.21[ab]	4.98±0.28	5.50±0.30[a]
Pn	5.89±0.22	6.09±0.32	5.14±0.12[ab]	5.07±0.28	5.36±0.31[ab]
Pbn	6.43±0.16	6.07±0.14	5.50±0.61[ab]	5.62±0.28	5.82±0.32[a]
b	6.00±0.23	5.39±0.33	4.88±0.22[b]	4.93±0.47	5.36±0.23[ab]
n	6.24±0.32	5.31±0.19	4.96±0.09[ab]	4.96±0.24	5.77±0.15[a]
bn	5.88±0.26	5.48±0.39	4.65±0.37[b]	5.56±0.22	5.60±0.30[a]
C	6.17±0.36	5.55±0.46	4.80±0.35[b]	5.56±0.22	6.09±0.30[a]

หมายเหตุ : a และ b ตัวอักษรที่แตกต่างกันภายในคอลัมน์เดียวกันแสดงความแตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$)

Bb คือ เสริมโปรไบโอติค *B. subtilis* ร่วมกับ ß-glucan

Bn คือ เสริมโปรไบโอติค *B. subtilis* ร่วมกับ nucleotide

Bbn คือ เสริมโปรไบโอติค *B. subtilis* ร่วมกับ ß-glucan และ nucleotide

Pb คือ เสริมโปรไบโอติค *P. acidilactici* ร่วมกับ ß-glucan

Pn คือ เสริมโปรไบโอติค *P. acidilactici* ร่วมกับ nucleotide

Pbn คือ เสริมโปรไบโอติค *P. acidilactici* ร่วมกับ ß-glucan และ nucleotide

b คือ เสริมสารเสริม ß-glucan

n คือ เสริมสารเสริม nucleotide

bn คือ เสริมสารเสริม ß-glucan ร่วมกับ nucleotide

C คือ สูตรอาหารพื้นฐาน (control)

ตารางที่ 4.8 ผลของการเสริมโปรไบโอติคร่วมกับสารเสริมในกุ้งขาวแวนนาไมด์หลังจากทำการทดลองเป็นระยะเวลา 45 วันต่อองค์ประกอบทางเคมีในเนื้อ

กลุ่มทดลอง	ความชื้น (%)	เถ้า (%)	ไขมัน (%)	โปรตีน (%)
Bb	25.21±0.27^{bc}	3.71±0.06^{def}	0.68±0.009^{abc}	12.22±0.46^{abc}
Bn	25.94±0.22^{b}	3.29±0.04^{f}	0.86±0.03^{ab}	11.93±0.22^{bc}
Bbn	25.21±0.11^{bc}	4.34±0.12^{cd}	0.82±0.03^{ab}	11.57±0.12^{c}
Pb	25.65±0.59^{bc}	4.05±0.22^{cde}	0.65±0.003^{abc}	11.53±0.29^{c}
Pn	25.60±0.35^{bc}	4.38±0.002^{cd}	0.79±0.08^{ab}	12.22±0.26^{abc}
Pbn	25.30±0.29^{bc}	4.62±0.04^{bc}	0.59±0.02^{bcd}	12.94±0.66^{a}
b	28.65±0.09^{a}	5.36±0.31^{a}	0.79±0.01^{ab}	12.74±0.13^{ab}
n	25.42±0.40^{bc}	5.07±0.53^{ab}	0.91±0.25^{a}	12.49±0.18^{ab}
bn	24.34±0.89^{c}	3.48±0.08^{ef}	0.37±0.006^{d}	12.86±0.23^{a}
C	25.17±0.06^{bc}	4.35±0.20^{cd}	0.50±0.005^{cd}	12.70±0.04^{ab}

หมายเหตุ : a b c d e และ f ตัวอักษรที่แตกต่างกันภายในคอลัมน์เดียวกันแสดงความแตกต่างทางสถิติ (P<0.05)

Bb คือ เสริมโปรไบโอติค *B. subtilis* ร่วมกับ ß-glucan

Bn คือ เสริมโปรไบโอติค *B. subtilis* ร่วมกับ nucleotide

Bbn คือ เสริมโปรไบโอติค *B. subtilis* ร่วมกับ ß-glucan และ nucleotide

Pb คือ เสริมโปรไบโอติค *P. acidilactici* ร่วมกับ ß-glucan

Pn คือ เสริมโปรไบโอติค *P. acidilactici* ร่วมกับ nucleotide

Pbn คือ เสริมโปรไบโอติค *P. acidilactici* ร่วมกับ ß-glucan และ nucleotide

b คือ เสริมสารเสริม ß-glucan

n คือ เสริมสารเสริม nucleotide

bn คือ เสริมสารเสริม ß-glucan ร่วมกับ nucleotide

C คือ สูตรอาหารพื้นฐาน (control)

ตารางที่ 4.9 ผลของการเสริมโปรไบโอติคร่วมกับสารเสริมในกุ้งขาวแวนนาไมด์หลังจากทำการทดลองเป็นระยะเวลา 90 วันต่อองค์ประกอบทางเคมีในเนื้อ

กลุ่มทดลอง	ความชื้น (%)	เถ้า (%)	ไขมัน (%)	โปรตีน (%)
Bb	22.39±0.37^{b}	3.56±0.51^{a}	0.65±0.04^{ab}	12.23±0.34^{a}
Bn	23.81±0.51^{a}	3.46±0.10^{ab}	0.73±0.06^{a}	12.92±0.20^{a}
Bbn	23.42±0.56^{ab}	3.26±0.09^{abc}	0.63±0.03^{ab}	12.61±0.37^{a}
Pb	23.74±0.28^{a}	2.94±0.12^{cd}	0.63±0.013^{ab}	13.05±0.33^{a}
Pn	24.20±0.71^{a}	3.11±0.05^{bcd}	0.64±0.05^{ab}	12.23±0.30^{a}
Pbn	22.99±0.26^{ab}	2.90±0.08^{cd}	0.42±0.06^{cd}	12.80±0.47^{a}
b	23.44±0.20^{ab}	3.15±0.19^{bc}	0.54±0.05^{bc}	13.01±0.25^{a}
n	24.28±0.55^{a}	2.99±0.22^{cd}	0.37±0.03^{d}	12.45±0.16^{a}
bn	22.90±0.15^{ab}	2.75±0.07^{d}	0.44±0.04^{cd}	12.14±0.06^{a}
C	20.11±0.17^{c}	2.76±0.09^{d}	0.49±0.05^{cd}	11.14±0.12^{b}

หมายเหตุ : a b c และ d ตัวอักษรที่แตกต่างกันภายในคอลัมน์เดียวกันแสดงความแตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$)

Bb	คือ เสริมโปรไบโอติค	*B. subtilis*	ร่วมกับ ß-glucan
Bn	คือ เสริมโปรไบโอติค	*B. subtilis*	ร่วมกับ nucleotide
Bbn	คือ เสริมโปรไบโอติค	*B. subtilis*	ร่วมกับ ß-glucan และ nucleotide
Pb	คือ เสริมโปรไบโอติค	*P. acidilactici*	ร่วมกับ ß-glucan
Pn	คือ เสริมโปรไบโอติค	*P. acidilactici*	ร่วมกับ nucleotide
Pbn	คือ เสริมโปรไบโอติค	*P. acidilactici*	ร่วมกับ ß-glucan และ nucleotide
b	คือ เสริมสารเสริม	ß-glucan	
n	คือ เสริมสารเสริม	nucleotide	
bn	คือ เสริมสารเสริม	ß-glucan ร่วมกับ nucleotide	
C	คือ สูตรอาหารพื้นฐาน	(control)	

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.10 ผลของการเสริมโปรไบโอติคร่วมกับสารเสริมในกุ้งขาวแวนนาไมด์หลังจากทำการทดลองเป็นระยะเวลา 45 และ 90 วันต่อค่าความสูงของวิลไล (villi height)

กลุ่มทดลอง	ลำไส้ส่วนต้น		ลำไส้ส่วนท้าย	
	45 วัน	**90 วัน**	**45 วัน**	**90 วัน**
Bb	37.65±2.34^{ab}	44.31±0.65^{abc}	39.65±2.92^{ab}	39.38±1.56^{b}
Bn	38.38±3.24^{ab}	41.73±1.85^{abcd}	44.37±2.46^{a}	43.85±1.19^{ab}
Bbn	40.33±0.82^{a}	43.56±1.04^{abcd}	39.14±3.00^{ab}	45.25±1.63^{a}
Pb	38.64±1.82^{a}	47.67±0.95^{a}	44.26±3.51^{a}	44.96±1.86^{a}
Pn	36.06±1.02^{abcd}	46.66±2.54^{ab}	41.15±2.82^{a}	44.06±1.78^{ab}
Pbn	35.67±1.68^{abc}	47.91±1.82^{a}	39.38±3.08^{ab}	41.91±1.15^{ab}
b	32.17±2.75^{bcd}	37.40±2.75^{d}	37.11±2.51^{ab}	42.05±1.69^{ab}
n	30.12±2.03^{d}	40.35±4.13^{bcd}	37.30±3.48^{ab}	43.04±1.55^{ab}
bn	36.95±1.41^{abc}	46.04±2.05^{abc}	38.20±1.31^{ab}	43.84±1.06^{ab}
C	31.02±0.75^{cd}	39.56±0.43^{cd}	31.54±1.57^{b}	39.46±1.56^{b}

หมายเหตุ : a b c และ d ตัวอักษรที่แตกต่างกันภายในคอลัมน์เดียวกันแสดงความแตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$)

Bb คือ เสริมโปรไบโอติค *B. subtilis* ร่วมกับ ß-glucan

Bn คือ เสริมโปรไบโอติค *B. subtilis* ร่วมกับ nucleotide

Bbn คือ เสริมโปรไบโอติค *B. subtilis* ร่วมกับ ß-glucan และ nucleotide

Pb คือ เสริมโปรไบโอติค *P. acidilactici* ร่วมกับ ß-glucan

Pn คือ เสริมโปรไบโอติค *P. acidilactici* ร่วมกับ nucleotide

Pbn คือ เสริมโปรไบโอติค *P. acidilactici* ร่วมกับ ß-glucan และ nucleotide

b คือ เสริมสารเสริม ß-glucan

n คือ เสริมสารเสริม nucleotide

bn คือ เสริมสารเสริม ß-glucan ร่วมกับ nucleotide

C คือ สูตรอาหารพื้นฐาน (control)

ตารางที่ 4.11 ผลของการเสริมโปรไบโอติคร่วมกับสารเสริมต่อค่าเคมีในเลือดของกุ้งขาวแวนนาไมด์หลังจากทำการทดลองเป็นระยะเวลา 90 วัน

กลุ่มทดลอง	Glucose (mg/dl)	Cholesterol (mg/dl)	Triglycerides (mg/dl)	Total protein (mg/dl)	Urea Nitrogen (mg/dl)	Chloride (mg/dl)	Osmolality (mOsm.kg^{-1})
Bb	18.08±1.09^{b}	20.60±0.78^{ab}	8.99±1.65^{ab}	18.42±0.90	6.38±0.25	93.18±1.26^{a}	3,880.12±39.41^{ab}
Bn	16.62±1.60^{b}	14.38±2.31^{cd}	7.78±0.96^{ab}	18.24±1.36	6.37±0.19	92.39±2.13^{a}	4,008.75±134.91^{a}
Bbn	20.05±0.92^{ab}	9.38±0.81^{d}	6.99±0.48^{b}	18.52±2.13	6.27±0.13	82.93±5.24^{b}	3,766.88±128.64^{ab}
Pb	18.45±2.30^{ab}	19.38±1.65^{abc}	8.49±0.33^{ab}	20.66±0.55	7.00±0.34	92.03±2.63^{a}	3,853.50±21.33^{ab}
Pn	20.42±1.86^{ab}	21.56±1.39^{ab}	8.03±0.45^{ab}	18.52±2.13	6.58±0.55	91.36±2.57^{a}	3,984.00±123.60^{a}
Pbn	20.60±2.78^{ab}	24.06±1.29^{a}	7.47±0.78^{ab}	19.67±1.55	6.57±0.36	92.23±0.53^{a}	3,980.62±89.83^{a}
b	23.23±0.71^{a}	20.00±2.22^{abc}	7.99±0.72^{ab}	20.66±2.89	6.52±0.23	92.29±2.34^{a}	4,023.38±90.91^{a}
n	18.64±0.54^{ab}	15.94±2.41^{bc}	9.08±1.21^{ab}	22.75±1.40	6.33±0.13	90.53±2.72^{ab}	3,823.12±12.39^{ab}
bn	18.45±0.51^{ab}	17.81±1.87^{bc}	9.73±1.03^{ab}	19.71±0.96^{ab}	6.60±0.13	95.50±3.10^{a}	3,877.88±98.95^{ab}
C	21.26±0.56^{ab}	18.44±2.13^{abc}	11.05±2.12^{a}	20.14±1.40^{ab}	6.15±0.64	93.25±2.41^{a}	3,610.88±174.89^{b}

หมายเหตุ : a b และ c ตัวอักษรที่แตกต่างกันภายในคอลัมน์เดียวกันแสดงความแตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$)

Bb คือ เสริมโปรไบโอติค *B. subtilis* ร่วมกับ ß-glucan

Bn คือ เสริมโปรไบโอติค *B. subtilis* ร่วมกับ nucleotide

Bbn คือ เสริมโปรไบโอติค *B. subtilis* ร่วมกับ ß-glucan และ nucleotide

Pbn คือ เสริมโปรไบโอติค *P. acidilactici* ร่วมกับ ß-glucan และ nucleotide

Pn คือ เสริมโปรไบโอติค *P. acidilactici* ร่วมกับ nucleotide

b คือ เสริมสารเสริม ß-glucan

n คือ เสริมสารเสริม nucleotide

bn คือ เสริมสารเสริม ß-glucan ร่วมกับ nucleotide

C คือ สูตรอาหารพื้นฐาน (control)

Pb คือ เสริมโปรไบโอติค *P. acidilactici* ร่วมกับ ß-glucan

ตารางที่ 4.12 ผลของการเสริมโปรไบโอติคร่วมกับสารเสริมต่อค่าเคมีในเลือดของกุ้งขาวหลังจากทำการทดลองเป็นระยะเวลา 90 วันในสภาวะความเครียดเนื่องจากน้ำที่มีแอมโมเนียสูงที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง

กลุ่มทดลอง	Glucose (mg/dl)		Cholesterol (mg/dl)		Triglycerides (mg/dl)		Urea Nitrogen (mg/dl)		Chloride (mg/dl)	
	Normal	Stressed	Normal	Stressed	Normal	Stressed	Normal	Stressed	Normal	Stressed
Bb	18.08±1.09^{b}	20.89±2.78^{ab}	20.60±0.78^{ab}	25.87±3.13^{ab}	8.99±1.65^{ab}	12.64±1.01^{b}	6.38±0.25	6.20±0.09^{c}	93.18±1.26^{a}	102.23±3.67^{b}
Bn	16.62±1.60^{b}	23.61±3.56^{ab}	14.38±2.31^{cd}	24.72±3.06^{ab}	7.78±0.96^{ab}	11.89±0.69^{bc}	6.37±0.19	6.90±0.56^{abc}	92.39±2.13^{a}	104.93±4.37^{ab}
Bbn	20.05±0.92^{ab}	23.61±3.05^{ab}	9.38±0.81^{d}	32.82±4.90^{a}*	6.99±0.48^{b}	13.13±0.87^{b}*	6.27±0.13	7.76±0.26^{ab}	82.93±5.24^{b}	100.40±3.25^{b}
Pb	18.45±2.30^{ab}	29.33±2.75^{a}*	19.38±1.65^{abc}	32.98±2.60^{a}*	8.49±0.33^{ab}	13.89±0.25^{b}*	7.00±0.34	7.05±0.66^{abc}	92.03±2.63^{a}	100.76±2.75^{b}
Pn	20.42±1.86^{ab}	23.24±2.45^{ab}	21.56±1.39^{ab}	21.44±1.43^{b}	8.03±0.45^{ab}	11.99±1.08^{bc}*	6.58±0.55	7.87±0.54^{a}	91.36±2.57^{a}	100.82±2.14^{b}
Pbn	20.60±2.78^{ab}	17.70±2.74^{b}	24.06±1.29^{a}	26.12±3.26^{ab}	7.47±0.78^{ab}	19.54±1.22^{a}*	6.57±0.36	7.99±0.72^{a}	92.23±0.53^{a}	105.04±2.91^{ab}
b	23.23±0.71^{a}	25.11±4.79^{ab}	20.00±2.22^{abc}	27.49±3.25^{ab}	7.99±0.72^{ab}	18.34±1.50^{a}*	6.52±0.23	6.43±0.20^{ac}	92.29±2.34^{a}	104.58±2.34^{ab}*
n	18.64±0.54^{ab}	21.17±4.42^{ab}	15.94±2.41^{bc}	23.85±2.52^{ab}	9.08±1.21^{ab}	18.40±1.13^{a}*	6.33±0.13	6.76±0.26^{abc}	90.53±2.72^{ab}	108.33±2.72^{ab}*
bn	18.45±0.51^{ab}	18.73±1.01^{ab}	17.81±1.87^{bc}	19.88±1.40^{b}	9.73±1.03^{ab}	8.96±0.89^{c}	6.60±0.13	6.23±0.14^{c}	95.50±3.10^{a}	109.99±3.10^{ab}
C	21.26±0.56^{ab}	16.67±3.54^{b}	18.44±2.13^{abc}	19.80±2.70^{b}	11.05±2.12^{a}	17.06±1.15^{a}	6.15±0.64	6.48±0.19^{bc}	93.25±2.41^{a}	114.02±2.41^{a}*

หมายเหตุ : a b และ c ตัวอักษรที่แตกต่างกันภายในคอลัมน์เดียวกันแสดงความแตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$)

* แสดงความแตกต่างระหว่างกุ้งในสภาวะปกติ และกุ้งในสภาวะที่ได้รับความเครียด ($P<0.05$)

Bb คือ เสริมโปรไบโอติค *B. subtilis* ร่วมกับ ß-glucan

Bn คือ เสริมโปรไบโอติค *B. subtilis* ร่วมกับ nucleotide

Bbn คือ เสริมโปรไบโอติค *B. subtilis* ร่วมกับ ß-glucan และ nucleotide

Pbn คือ เสริมโปรไบโอติค *P. acidilactici* ร่วมกับ ß-glucan และ nucleotide

Pn คือ เสริมโปรไบโอติค *P. acidilactici* ร่วมกับ nucleotide

b คือ เสริมสารเสริม ß-glucan

n คือ เสริมสารเสริม nucleotide

bn คือ เสริมสารเสริม ß-glucan ร่วมกับ nucleotide

C คือ สูตรอาหารพื้นฐาน (control)

Pb คือ เสริมโปรไบโอติค *P. acidilactici* ร่วมกับ ß-glucan

ตารางที่ 4.13 ผลของการเสริมโปรไบโอติคร่วมกับสารเสริมต่อค่าเคมีในเลือดของกุ้งขาวแวนนาไมด์หลังจากทำการทดลองเป็นระยะเวลา 90 วันในสภาวะความเครียดเนื่องจากน้ำที่มีแอมโมเนียสูงที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง

กลุ่มทดลอง	Osmolality (mOsm.kg^{-1})		Total protein (mg/dl)	
	Normal	Stressed	Normal	Stressed
Bb	3,880.12±39.41^{ab}	3,589.50±72.44^{ab}*	18.42±0.90	15.94±1.57^{ab}
Bn	4,008.75±134.91^{a}	3,722.25±204.36^{ab}	18.24±1.36	14.04±2.20^{ab}
Bbn	3,766.88±128.64^{ab}	3,742.88±84.71^{ab}	18.52±2.13	17.13±1.40^{a}
Pb	3,853.50±21.33^{ab}	3,471.75±100.01^{ab}*	20.66±0.55	17.11±1.33^{a}*
Pn	3,984.00±123.60^{a}	3,439.50±122.64^{b}	18.52±2.13	13.38±1.70^{ab}
Pbn	3,980.62±89.83^{a}	3,728.25±102.72^{ab}	19.67±1.55	12.84±1.49^{ab}
b	4,023.38±90.91^{a}	3,713.25±79.14^{ab}*	20.66±2.89	12.43±1.98^{ab}
n	3,823.12±12.39^{ab}	3,835.88±71.46^{a}	22.75±1.40	12.61±1.43^{ab}*
bn	3,877.88±98.95^{ab}	3,810.38±74.01^{a}	19.71±0.96	11.85±1.41^{ab}*
C	3,610.88±174.89^{b}	3,711.00±123.32^{ab}	20.14±1.40	10.69±1.31^{b}*

หมายเหตุ : a b และ c ตัวอักษรที่แตกต่างกันภายในคอลัมน์เดียวกันแสดงความแตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$)

* แสดงความแตกต่างระหว่างกุ้งในสภาวะปกติและกุ้งในสภาวะที่ได้รับความเครียด ($P<0.05$)

Bb คือ เสริมโปรไบโอติค *B. subtilis* ร่วมกับ ß-glucan

Bn คือ เสริมโปรไบโอติค *B. subtilis* ร่วมกับ nucleotide

Bbn คือ เสริมโปรไบโอติค *B. subtilis* ร่วมกับ ß-glucan และ nucleotide

Pb คือ เสริมโปรไบโอติค *P. acidilactici* ร่วมกับ ß-glucan

Pn คือ เสริมโปรไบโอติค *P. acidilactici* ร่วมกับ nucleotide

Pbn คือ เสริมโปรไบโอติค *P. acidilactici* ร่วมกับ ß-glucan และ nucleotide

b คือ เสริมสารเสริม ß-glucan

n คือ เสริมสารเสริม nucleotide

bn คือ เสริมสารเสริม ß-glucan ร่วมกับ nucleotide

C คือ สูตรอาหารพื้นฐาน (control)

ตารางที่ 4.14 ผลของการเสริมโปรไบโอติคร่วมกับสารเสริมในกุ้งขาวแวนนาไมด์หลังจากทำการทดลองเป็นระยะเวลา 90 วันต่อค่าภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ

สูตรอาหารทดลอง	THC (10^6cells/ml)	SOD (O.D. 620 nm)	proPO (O.D. 490 nm)	Lysozyme activity (µg/ml)
Bb	4.41	0.032±0.07^{ab}	0.359±0.05^{cde}	3.38±0.13
Bn	4.49	0.044±0.06^{ab}	0.510±0.04^{abc}	3.42±0.18
Bbn	6.6	0.060±0.01^{a}	0.634±0.003^{a}	3.61±0.19
Pb	4.26	0.053±0.01^{a}	0.449±0.05^{bcd}	3.53±0.21
Pn	3.74	0.037±0.01^{ab}	0.292±0.09^{de}	3.61±0.19
Pbn	5.8	0.035±0.01^{ab}	0.261±0.07^{e}	3.33±0.14
b	4.57	0.057±0.01^{a}	0.280±0.03^{e}	3.33±0.08
n	6.05	0.030±0.01^{ab}	0.544±0.05^{ab}	3.37±0.16
bn	6.23	0.043±0.01^{ab}	0.454±0.03^{bcd}	3.48±0.25
C	6.49	0.018±0.03^{b}	0.232±0.57^{e}	3.28±0.16

หมายเหตุ : a b c d และ e ตัวอักษรที่แตกต่างกันภายในคอลัมน์เดียวกันแสดงความแตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$)

THC คือ total hemocyte count, SOD คือ Superoxide anion production และ proPO คือ phenoloxidase activity

Bb คือ เสริมโปรไบโอติค *B. subtilis* ร่วมกับ ß-glucan

Bn คือ เสริมโปรไบโอติค *B. subtilis* ร่วมกับ nucleotide

Bbn คือ เสริมโปรไบโอติค *B. subtilis* ร่วมกับ ß-glucan และ nucleotide

Pb คือ เสริมโปรไบโอติค *P. acidilactici* ร่วมกับ ß-glucan

Pn คือ เสริมโปรไบโอติค *P. acidilactici* ร่วมกับ nucleotide

Pbn คือ เสริมโปรไบโอติค *P. acidilactici* ร่วมกับ ß-glucan และ nucleotide

b คือ เสริมสารเสริม ß-glucan

n คือ เสริมสารเสริม nucleotide

bn คือ เสริมสารเสริม ß-glucan ร่วมกับ nucleotide

C คือ สูตรอาหารพื้นฐาน (control)

ตารางที่ 4.15 ผลของการเสริมโปรไบโอติคร่วมกับสารเสริมต่อค่าภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของกุ้งขาวแวนนาไมด์หลังจากทำการทดลองเป็นระยะเวลา 90 วัน ในสภาวะปกติเปรียบเทียบกับสภาวะความเครียดเนื่องจากแอมโมเนียในน้ำเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

กลุ่มทดลอง	THC (10^6cells/ml)		SOD (O.D. 620 nm)		proPO (O.D. 490 nm)		Lysozyme activity (µg/ml)	
	Normal	Stressed	Normal	Stressed	Normal	Stressed	Normal	Stressed
Bb	4.41	6.37^{ab}	0.032 ± 0.07^{ab}	0.012 ± 0.002^{ab}	0.359 ± 0.05^{cde}	0.215 ± 0.05^{bc}	3.38±0.13	4.28±0.33
Bn	4.94	5.87^{ab}	0.044 ± 0.06^{ab}	0.009 ± 0.002^{bc}*	0.510 ± 0.04^{abc}	0.271 ± 0.11^{bc}	3.42±0.18	4.21±0.35
Bbn	6.60	7.54^{ab}	0.060 ± 0.01^{a}	0.011 ± 0.001^{ab}*	0.634 ± 0.003^{a}	0.304 ± 0.078^{abc}*	3.61±0.19	4.26±0.24
Pb	4.26	8.86^{ab}*	0.053 ± 0.01^{a}	0.011 ± 0.002^{ab}*	0.449 ± 0.05^{bcd}	0.451 ± 0.07^{ab}	3.53±0.21	4.25±0.28
Pn	3.74	10.56^{ab}	0.037 ± 0.01^{ab}	0.008 ± 0.001^{bc}*	0.292 ± 0.09^{de}	0.410 ± 0.02^{ab}	3.61±0.19	4.12±0.27
Pbn	5.80	14.44^{a}*	0.035 ± 0.01^{ab}	0.014 ± 0.002^{a}	0.261 ± 0.07^{e}	0.483 ± 0.09^{a}	3.33±0.14	4.24±0.32
b	4.58	13.31^{ab}*	0.057 ± 0.01^{a}	0.014 ± 0.001^{a}*	0.280 ± 0.03^{e}	0.368 ± 0.13^{abc}	3.33±0.08	4.15±0.34
n	6.05	5.53^{ab}	0.030 ± 0.01^{ab}	0.008 ± 0.001^{bc}*	0.544 ± 0.05^{ab}	0.350 ± 0.03^{abc}*	3.37±0.16	4.23±0.31
bn	6.22	10.08^{ab}*	0.043 ± 0.01^{ab}	0.008 ± 0.002^{bc}	0.454 ± 0.03^{bcd}	0.520 ± 0.12^{a}	3.48±0.25	4.23±021
C	6.49	10.99^{ab}	0.018 ± 0.03^{b}	0.006 ± 0.004^{c}	0.232 ± 0.57^{e}	0.139 ± 0.03^{c}	3.28±0.16	4.24±0.21

หมายเหตุ : a b c d และ e ตัวอักษรที่แตกต่างกันภายในคอลัมน์เดียวกันแสดงความแตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$)

* แสดงความแตกต่างระหว่างกุ้งในสภาวะปกติและกุ้งในสภาวะที่ได้รับความเครียด ($P<0.05$)

Bb คือ เสริมโปรไบโอติค *B. subtilis* ร่วมกับ ß-glucan

Bn คือ เสริมโปรไบโอติค *B. subtilis* ร่วมกับ nucleotide

Bbn คือ เสริมโปรไบโอติค *B. subtilis* ร่วมกับ ß-glucan และ nucleotide

Pbn คือ เสริมโปรไบโอติค *P. acidilactici* ร่วมกับ ß-glucan และ nucleotide

Pn คือ เสริมโปรไบโอติค *P. acidilactici* ร่วมกับ nucleotide

b คือ เสริมสารเสริม ß-glucan

n คือ เสริมสารเสริม nucleotide

bn คือ เสริมสารเสริม ß-glucan ร่วมกับ nucleotide

C คือ สูตรอาหารพื้นฐาน (control)

Pb คือ เสริมโปรไบโอติค *P. acidilactici* ร่วมกับ ß-glucan

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4.3 การอภิปรายผล

4.3.1 การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของการใช้โปรไบโอติคที่ผ่านการทำแคปซูลเปรียบเทียบกับการใช้เซลล์โปรไบโอติคในรูปเซลล์อิสระเสริมในอาหารกุ้งขาว

4.3.1.1 ผลต่อประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้

ผลของการเปรียบเทียบการเสริมโปรไบโอติค *B. subtilis* (BF) และ *P. acidilactici* (PF) ในรูปเซลล์อิสระและการเสริมโปรไบโอติค *B. subtilis* (BE) และ *P. acidilactici* (PE) ในรูปแคปซูลในอาหารกุ้งขาวต่อประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ พบว่า กุ้งที่ได้รับโปรไบโอติคในรูปแคปซูลมีจำนวนแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติค (lactic acid bacteria) แบคทีเรียกลุ่ม *Bifidobacterium* spp. และแบคทีเรียรวม (total aerobic bacteria) ในลำไส้สูงกว่ากลุ่มควบคุม (control) ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจาก วิธีการห่อหุ้มเซลล์ (encapsulation) สามารถป้องกันแบคทีเรียโปรไบโอติคที่อยู่ภายในสัมผัสกับสภาวะที่เป็นกรดในกระเพาะอาหาร เซลล์โปรไบโอติคที่อยู่ภายในจึงมีอัตราการรอดชีวิตมากขึ้นเมื่อเทียบกับเซลล์โปรไบโอติคในรูปอิสระ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาการทำเอ็นแคปซูเลชั่น (encapsulation) ในเซลล์จุลินทรีย์ *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* สามารถเพิ่มอัตรารอดของเซลล์จุลินทรีย์ได้สูงกว่าเมื่อเทียบกับเซลล์จุลินทรีย์ที่ไม่ได้ทำเอ็นแคปซูเลชั่น (encapsulation) ภายใต้สภาวะการจำลองระบบย่อยอาหาร (สุรีย์ และคณะ, 2550; Chandramouli et al., 2004; Picot and Lacroix, 2004; Kima et al., 2008; Thomas, Petra and Ulrich, 2009; Sirilux and Wanpen, 2012) นอกจากนี้พบว่า กุ้งในกลุ่มทดลองที่มีการเสริมโปรไบโอติคในรูปอิสระ และรูปแคปซูลจะมีจำนวนเชื้อ *Vibrio* และจำนวนยีสต์และเชื้อรา (yeast and fungi) ในลำไส้ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม ซึ่งการลดลงของจำนวนเชื้อ *Vibrio* สามารถอธิบายได้ว่า กรดแลคติค (lactic acid) ที่โปรไบโอติคสร้างขึ้นบริเวณลำไส้ ส่งผลทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในระบบทางเดินอาหารลดต่ำลง ส่งผลทำให้เกิดสภาวะไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค และนอกจากนี้ยังมีการรายงานว่า แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติค (lactic acid bacteria) บางชนิดมีคุณสมบัติในการผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น เช่น *P. acidilactic* สร้าง pediocin และ *Bacillus* spp. สร้าง polypeptides (bacitracin, gramicidin, polymyxin และtytothricin) (Masaaki, Mikito and Tadayuki, 1992; Perez, Suarez and Castro, 1993; Drablos, Nicholson and Ronning, 1999) ในการยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวก (gram positive) และกลุ่มแกรมลบ (gram negative) ได้หลายชนิด รวมถึงกลุ่มที่ก่อโรค *Vibrio* spp. (O'Sullivan, Ross and Hill, 2002) จึงอาจส่งทำให้จำนวนปริมาณเชื้อ *Vibrio* ลดลง จากการทดลองในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า การตรึงเซลล์แบบไมโครเอ็นแคปซูเลชั่น (microencapsulation) นั้น น่าจะทำให้จำนวนแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติค (lactic acid bacteria) ที่เสริมลงไปในอาหารกุ้ง มีความสามารถในการรอดชีวิตเพิ่มสูงขึ้นเมื่อผ่านระบบทางเดินอาหาร จึงส่งผลต่อการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติค (lactic acid bacteria) และลดจำนวนเชื้อ *Vibrio*

4.3.1.2 ผลต่อองค์ประกอบทางเคมีในเนื้อ

ผลของการเปรียบเทียบการเสริมโปรไบโอติค *B. subtilis* (BF) และ *P. acidilactici* (PF) ในรูปเซลล์อิสระและการเสริมโปรไบโอติค *B. subtilis* (BE) และ *P. acidilactici* (PE) ในรูปแคปซูลในอาหารกุ้งขาวต่อองค์ประกอบทางเคมีในเนื้อกุ้งขาว พบว่า การเสริมโปรไบโอติคในรูปแคปซูล และการเสริมโปรไบโอติคในรูปอิสระนั้น ไม่ส่งผลต่อปริมาณเถ้า ความชื้นและโปรตีน ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานการศึกษาการเสริม *B. subtilis* และ *P. acidilactici* ในปลาเรนโบว์เทราห์ (*O. mykiss*) (Merrifield et al., 2011) และปลา (Ghosh, Sinha and Sahu, 2008) ซึ่งพบว่า ไม่ส่งผลต่อองค์ประกอบทางเคมีในเนื้อ แต่อย่างไรก็ตามมีบางรายงานที่พบว่า การโปรไบโอติคในปลาเรนโบว์เทราห์ (*O. mykiss)* (Bagheri et al, 2008) และกุ้งขาว (*L. vannamei*) (Yanbo, Linglin and Junda, 2012) สามารถเพิ่มปริมาณโปรตีนสูงขึ้นและลดปริมาณไขมันในเนื้อลงได้ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และนอกจากนี้กุ้งขาวในกลุ่มทดลองที่ได้รับโปรไบโอติคในรูปแคปซูลจะมีปริมาณไขมันในในเนื้อสูงกว่ากลุ่มควบคุม ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจาก โปรไบโอติคที่เสริมในอาหารกุ้งขาวในการทดลองครั้งนี้ได้ผ่านการทำแคปซูล โดยการเติมนมหมักผสมกับเชื้อโปรไบโอติคลงในน้ำมันพืชในรูปอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (water in oil emulsion) จนเกิดเป็นรูปแคปซูล ดังนั้นจึงอาจส่งผลต่อการเพิ่มปริมาณการสะสมไขมันในเนื้อกุ้งที่ได้รับอาหารเสริมโปรไบโอติคที่ผ่านการทำแคปซูล ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในเนื้อในปลาและในสัตว์กลุ่ม crustacean พบว่า ไขมันในเนื้อจะเพิ่มสูงขึ้น เมื่อเพิ่มระดับไขมันในสูตรอาหาร (Serrano, Nematipour and Gatlin, 1992; Catacutan and Coloso, 1995; Erfanullah and Jafri, 1998; Keembiyehetty and Wilson, 1998; Catacutan, 2002; Gonzalez-Felix, Gatlin, Lawrence and Perez-Velazquez, 2002; Qinghui, Kangsen, Huitao, Chunxiao, Lu, Qingyuan, Beiping, Wei, Hongming, Wenbing and Zhigou, 2004; Peng and Gatlin, 2005) จากการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า การตรึงเซลล์ (immobilize cell) แบบไมโครเอ็นแคปซูเลชั่น (microencapsulation) ในรูปอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (water in oil emulsion) นั้น มีผลต่อการเพิ่มปริมาณไขมันในเนื้อ แต่ไม่ส่งผลต่อปริมาณเถ้า ความชื้น และโปรตีนในเนื้อกุ้ง

4.3.1.3 ผลต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต

ผลของการเปรียบเทียบการเสริมโปรไบโอติค *B. subtilis* (BF) และ*P. acidilactici* (PF) ในรูปเซลล์อิสระ และการเสริมโปรไบโอติค *B. subtilis* (BE) และ *P. acidilactici* (PE) ในรูปแคปซูลในอาหารกุ้งขาวต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตของกุ้งขาว พบว่า การเสริมโปรไบโอติคในรูปแคปซูล และการเสริมโปรไบโอติคในรูปอิสระนั้น ไม่ส่งผลต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตของกุ้งขาว ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานการศึกษาการเสริม *B. subtilis* และ *P. acidilactic* ในปลาเรนโบว์เทราห์ (Merrifield et al., 2010) ปลานิล (Ferguson et al., 2010) และ

ในกุ้งสายพันธุ์ต่าง ๆ (Mariel, Fabiano and Jenny, 2004; Wang, 2007; Liu et al., 2009; Liu, Chiu, Shiu, Cheng and Liu, 2010) แต่อย่างไรก็ตามมีบางรายงานที่พบว่า การเสริมโปรไบโอติค *B. subtilis* และ *P. acidilactici* ในอาหารสามารถเพิ่มสมรรถนะการเจริญเติบโตของปลาและกุ้ง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Ziaei-Nejad et al., 2006; Castex et al., 2008; Far et al., 2009; Boonthai, Vuthiphandchai and Nimrat, 2011)

จากการศึกษาในข้างต้นที่พบว่า การเสริมโปรไบโอติคในรูปแคปซูลส่งผลทำให้จำนวนแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติค (lactic acid bacteria) ในลำไส้สูงกว่ากลุ่มควบคุมนั้น แต่อย่างไรก็ตามพบว่า การเสริมโปรไบโอติคในรูปแคปซูลกลับไม่ส่งผลต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตของกุ้งขาว ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก ระยะเวลาการทดลองที่สั้นเกินไปจึงไม่อาจส่งผลทำให้สมรรถนะการเจริญเติบโตของกุ้งขาวมีความแตกต่างกัน และกิจกรรมการทำงานของจุลินทรีย์ ก็อาจจะทำงานได้ไม่มากพอที่จะส่งเสริมการเจริญเติบโตของกุ้งได้ ดังนั้นน่าจะมีการเสริมสารอื่นร่วมด้วยเพื่อที่จะส่งผลทำให้จุลินทรีย์มีกิจกรรมการทำงานได้ดีขึ้น และส่งผลในการเพิ่มสมรรถนะการเจริญเติบโตของกุ้งขาวมากขึ้น

4.3.2 การทดลองที่ 2 ผลของการเสริมโปรไบโอติคที่ผ่านการทำแคปซูลร่วมกับสารเสริมเบต้ากลูแคน (ß-glucan) และนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมด์

4.3.2.1 ผลต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต

ผลการศึกษาการเสริมโปรไบโอติค (*B. subtilis* และ *P. acidilactici*) ที่ผ่านการทำแคปซูล ร่วมกับสารเสริมเบต้ากลูแคน (ß-glucan) และนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตของกุ้งขาว ซึ่งพบว่าสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาที่ระยะเวลาการทดลอง 45 วัน การเสริมโปรไบโอติคร่วมกับสารเสริม และการเสริมสารเสริมไม่ส่งผลกระทบต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตของกุ้งขาว สอดคล้องกับการศึกษาการเสริมโปรไบโอติคในปลาเรนโบว์เทราท์ (Merrifield et al., 2010) ปลานิล (Ferguson et al., 2010) และในกุ้งสายพันธ์ต่าง ๆ (Mariel, Fabiano and Jenny, 2004; Wang, 2007; Liu et al., 2009; Liu et al., 2010) ซึ่งพบว่าการเสริมโปรไบโอติคไม่ส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโต แต่อย่างไรก็ตามมีบางรายงานที่พบว่า การเสริมโปรไบโอติค *B. subtilis* และ *P. acidilactici* ในอาหารสามารถเพิ่มสมรรถนะการเจริญเติบโตของปลาและกุ้งให้สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Ziaei-Nejad et al., 2006; Castex et al., 2008; Far et al., 2009; Boonthai, Vuthiphandchai and Nimrat, 2011) แต่หลังจากทดลองเป็นระยะเวลา 90 วัน พบว่า กุ้งขาวที่ได้รับการเสริม *P. acidilactici* ที่ผ่านการทำแคปซูล ร่วมกับ ß-glucan จะมีค่าน้ำหนักตัวเฉลี่ย (body weight) ความยาวลำตัว (total length) และความยาวลำตัวที่เพิ่มขึ้น (length gain) สูงกว่ากลุ่มควบคุม ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาการเสริม *P. acidilactici* ในอาหารสัตว์น้ำ พบว่า การเสริม

P. acidilactici สามารถปรับปรุงอัตราการเจริญเติบโตของปลานิล (Xuxia et al., 2009) ปลา pollock (Gatesoupe, 2002) ปลาดุกอเมริกัน (Shelby, Chhorn, Yildirim-Aksoy and Klesius, 2007) และปลาเรนโบว์เทราท์ (Merrifield et al., 2010) ทั้งนี้เนื่องจาก โปรไบโอติคสามารถเพิ่มการสังเคราะห์สารอาหารที่มีความจำเป็น (วิตามิน และกรดไขมันสายสั้น) และเอนไซม์ (amylase และprotease) นำไปสู่การเพิ่มการย่อยและการดูดซึมสารอาหาร (Ghosh, Sinha and Sahu, 2008) ซึ่งอาจส่งผลทำให้การเจริญเติบโตเพิ่มสูงขึ้น ดังนั้นจากการศึกษาในครั้งนี้ และจากการรายงานที่ผ่านมา พบว่า การเสริมโปรไบโอติคในสัตว์น้ำต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตนั้น อาจมีผลที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับ ชนิดของโปรไบโอติค ระยะเวลาที่สัตว์น้ำได้รับโปรไบโอติค รูปแบบของโปรไบโอติค สภาพแวดล้อมในการเลี้ยง และสายพันธุ์ของสัตว์ที่แตกต่างกัน จึงส่งผลทำให้ผลของการเสริมโปรไบโอติคในสัตว์น้ำต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตแตกต่างกัน และจากการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า การเสริมโปรไบโอติคร่วมกับสารเสริม และการเสริมสารเสริม มีผลต่อการเพิ่มสมรรถนะการเจริญเติบโตในกุ้งขาว โดยกลุ่มที่ได้รับการเสริมโปรไบโอติคร่วมกับสารเสริมสามารถเพิ่มสมรรถนะการเจริญเติบโตของกุ้งขาวได้ดีที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองความสูงของวิลไลในลำไส้ และมีการรายงานการศึกษาพบว่า ความสูงของวิลไลที่เพิ่มสูงขึ้นมีผลต่อการเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตในสัตว์ ได้แก่ ลูกสุกรหย่านม (Di Giancamillo et al., 2008) และปลาเรนโบว์เทราท์ (Merrifield et al., 2010)

4.3.2.2 ผลต่อประชากรจุลินทรีย์

ผลการศึกษาการเสริมโปรไบโอติค (*B. subtilis* และ*P. acidilactici*) ที่ผ่านการทำแคปซูล ร่วมกับสารเสริมเบต้ากลูแคน (ß-glucan) และนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ต่อประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ โดยชนิดของแบคทีเรียที่ตรวจพบในระบบทางเดินอาหารกุ้งนั้น มีอิทธิพลมาจากสิ่งแวดล้อมหรือน้ำในบ่อที่กุ้งอาศัยอยู่ การศึกษาครั้งนี้พบว่า กุ้งขาวที่ได้รับการเสริมโปรไบโอติคร่วมกับสารเสริม และการเสริมสารเสริม ไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรียรวม (total aerobic bacteria) แบคทีเรียกลุ่ม *Bifidobacterium* และจำนวนยีสต์และรา (yeast and fungi) ในลำไส้ และนอกจากนี้การเสริมโปรไบโอติคร่วมกับสารเสริม สามารถเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติค (lactic acid bacteria) ได้สูงกว่ากลุ่มควบคุม สอดคล้องกับการศึกษาการเสริมโปรไบโอติค *Bacillus* และ*P. acidilactici* ในอาหาร ซึ่งพบว่า การเสริมโปรไบโอติคสามารถเพิ่มแบคทีเรียผลิตแลคติค (lactic acid bacteria) ได้สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Ziaei-Nejad et al., 2006; Ferguson et al., 2010; Boonthai, Vuthiphandchai and Nimrat, 2011; Sirilux and Wanpen, 2012) เนื่องจาก โปรไบโอติคจะช่วยปรับสมดุลของจุลินทรีย์ภายในระบบทางเดินอาหาร โดยจะเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ และลดจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค โดยการผลิตกรดแลคติค (lactic

acid)ในบริเวณลำไส้ ส่งผลทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ลดต่ำลง ทำให้เกิดสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค และทั้งนี้เนื่องจาก วิธีการห่อหุ้มเซลล์ (encapsulation) นั้นสามารถปรับปรุงอัตราการรอดชีวิตของโปรไบโอติคได้สูงกว่าเมื่อเทียบกับเซลล์อิสระในสภาวะที่มีการจำลองระบบทางเดินอาหาร โดยสามารถป้องกันแบคทีเรียโปรไบโอติคที่อยู่ภายในสัมผัสกับสภาวะที่เป็นกรดในกระเพาะอาหาร เซลล์ที่อยู่ภายในจึงมีการรอดชีวิตมากขึ้นเมื่อเทียบกับเซลล์ในรูปอิสระ และการเสริมโปรไบโอติคร่วมกับสารเสริมยังสามารถลดจำนวน *Vibrio* spp. ในลำไส้ได้สูงกว่าเมื่อเทียบกับการเสริมสารเสริม และกลุ่มควบคุม ซึ่งเชื้อ *Vibrio* spp. ถือว่าเป็นเชื้อที่ก่อโรคที่สำคัญในกุ้งขาว โดยพบว่า แบคทีเรียเหล่านี้จัดอยู่ในกลุ่มผู้ฉวยโอกาสก่อโรค (opportunistic pathogens) ซึ่งเมื่อกุ้งอยู่ในภาวะเครียด และอ่อนแอเชื้อ *Vibrio* spp. ก็จะเริ่มทำหน้าที่เป็นตัวก่อโรคในตัวกุ้งได้ (ลิลา เรืองแป้น, วารินทร์ ธนาสมหวัง และ กุลวรา แสงรุ่งเรือง, 2540) และการลดลงของเชื้อ *Vibrio* เป็นผลมาจากกลไกลการทำลายแบคทีเรียก่อโรคของโปรไบโอติค โดยการแข่งขันแย่งสารอาหารและหลั่งเอนไซม์ที่สามารถย่อยเมือกที่ล้อมรอบเซลล์แบคทีเรียแกรมลบ (gram negative) ที่ก่อโรค ทำให้แบคทีริโอซิน (bacteriocins) ที่โปรไบโอติคสร้างขึ้นสามารถเข้าทำลายองค์ประกอบของเซลล์ ส่งผลทำให้แบคทีเรียก่อโรคหยุดการเจริญและถูกทำลาย (Moriarty, 1998) เมื่อแบคทีเรียก่อโรคลดจำนวนลง จึงอาจส่งผลทำให้จำนวนแบคทีเรียกลุ่มที่มีประโยชน์ เช่น *Bacillus* spp. และ *Bifidobacteria* ยึดเกาะบริเวณเยื่อบุทางเดินอาหารแทนที่แบคทีเรียก่อโรค และเพิ่มจำนวนมากขึ้น ดังนั้นจากการทดลองในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า การตรึงเซลล์ (immobilize cell) แบบไมโครเอ็นแคปซูเลชั่น (microencapsulation) ร่วมกับสารเสริมนั้นน่าจะทำให้จำนวนแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติค (lactic acid bacteria) ที่เสริมลงไปในอาหารกุ้ง มีความสามารถในการรอดชีวิตเพิ่มสูงขึ้นเมื่อผ่านระบบทางเดินอาหาร จึงส่งผลต่อการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติค (lactic acid bacteria) และลดจำนวนเชื้อ *Vibrio* spp. ในลำไส้

4.3.2.3 ผลต่อองค์ประกอบทางเคมีในเนื้อ

ผลการศึกษาการเสริมโปรไบโอติค (*B. subtilis* และ*P. acidilactici*) ที่ผ่านการทำแคปซูลร่วมกับสารเสริมเบต้ากลูแคน (ß-glucan) และนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ต่อองค์ประกอบทางเคมีในเนื้อ พบว่า ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาในการทดลองที่ 1 การเสริมโปรไบโอติคที่ผ่านการทำแคปซูลร่วมกับสารเสริม และการเสริมสารเสริม สามารถเพิ่มปริมาณไขมันในเนื้อได้สูงกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ทั้งนี้เนื่องจาก โปรไบโอติคที่เสริมในอาหารในการทดลองครั้งนี้ได้ผ่านการห่อหุ้มเซลล์ (encapsulation) โดยการเติมนมหมักผสมกับเชื้อโปรไบโอติคลงในน้ำมันพืชในรูป water in oil emulsion จนเกิดเป็นรูปแคปซูล ดังนั้นจึงอาจส่งผลต่อการเพิ่มปริมาณไขมันในเนื้อกุ้งขาวที่ได้รับอาหารเสริมโปรไบโอติคที่ผ่านการทำแคปซูลร่วมกับสารเสริม และสอดคล้องกับการศึกษาในสัตว์น้ำที่ได้รับอาหารเสริมไขมันในระดับที่สูงขึ้น มีผลทำให้ปริมาณไขมันในกุ้ง

ไขมันในเนื้อปลาเพิ่มสูงขึ้น สอดคล้องกับการทดลองในปลาชนิดอื่น ๆ ด้วย ซึ่งพบว่าระดับของไขมันในตัวปลา และเนื้อเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับอาหารที่มีไขมันสูงขึ้น (Lee and Putnam, 1973; Garling and Wilson, 1977; Reinitz and Hitzel, 1980; Zeitler, Kirchgessner and Schwarz, 1984; Ellis and Reigh, 1991; Serrano, Nematipour and Gatlin, 1992) และนอกจากนี้การเสริมโปรไบโอติคที่ผ่านการทำแคปซูลร่วมกับสารเสริมและการเสริมสารเสริมนั้น สามารถเพิ่มปริมาณโปรตีนในเนื้อได้สูงกว่ากลุ่มควบคุม ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจาก กุ้งขาวที่ได้รับการเสริม *B. subtilis* และ*P. acidlacticis* สามารถเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ protease ในการย่อยโปรตีนในอาหาร จึงอาจส่งผลทำให้เพิ่มการใช้ประโยชน์ของโปรตีนในอาหารและเพิ่มการสะสมโปรตีนในเนื้อได้สูงกว่ากลุ่มควบคุม สอดคล้องกับการศึกษาการเสริม *Bacillus* ในอาหารปลา (Haroun, Goda and Chowdhury, 2006; Immanuel, Menenthira, Beena and Palavesam, 2003) และในกุ้งขาว (*L. vannamei*) (Yu, Li, Lin, Wen and Ma, 2009) ซึ่งพบว่า การเสริม *Bacillus* ในอาหารส่งผลต่อการเพิ่มปริมาณโปรตีนในเนื้อได้สูงกว่ากลุ่มควบคุม ดังนั้นจากการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า การตรึงเซลล์ (immobilize cell) แบบไมโครเอ็นแคปซูเลชั่น (microencapsulation) ในรูปอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (water in oil emulsion) ร่วมกับสารเสริม และการเสริมสารเสริม มีผลต่อการเพิ่มปริมาณไขมันและโปรตีนในเนื้อ แต่ไม่ส่งผลต่อปริมาณเถ้า และความชื้นในเนื้อกุ้งขาว

4.3.2.4 ผลต่อความสูงของวิลไล (villi)

จากผลการวิเคราะห์ลักษณะทางจุลกายวิภาคของลำไส้ ซึ่งเป็นอวัยวะที่สำคัญในการแสดงถึงความสามารถในการย่อยอาหารและการดูดซึมโภชนะ โดยการวิเคราะห์จุลกายวิภาคของวิลไล (villi) ที่เกี่ยวข้องกับระบบการย่อยและดูดซึมโภชนะ จากการทดลองในครั้งนี้ พบว่า การเสริมโปรไบโอติค (*B. subtilis* และ*P acidlacticis*) ที่ผ่านการทำแคปซูลร่วมกับสารเสริมเบต้ากลูแคน (ß-glucan) และนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) และการเสริมสารเสริม มีผลต่อการเพิ่มความสูงของวิลไลที่บริเวณลำไส้ส่วนต้นและส่วนท้าย พบว่า กุ้งขาวที่ได้รับการเสริมสารเสริมเบต้ากลูแคน (ß-glucan) และนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) มีความสูงของวิลไลสูงกว่ากลุ่มควบคุม ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาการเสริมเบต้ากลูแคน (ß-glucan) และนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ในอาหาร ส่งผลทำให้วิลไลในลำไส้เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมในหนู (Uauy et al., 1990) และปลา (Cheng, Buentello and Gatlin, 2011; Peng et al., 2013; Kuhlwein et al., 2013) และนอกจากนี้กุ้งขาวที่ได้รับการเสริมโปรไบโอติคร่วมกับสารเสริม สามารถเพิ่มความสูงของวิลไลได้สูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาการเสริม *P. acidilactici* ในอาหาร พบว่า สามารถเพิ่มความสูงของวิลไลในลูกหมูหย่านม (Di Giancamillo et al., 2008) และปลาเรนโบว์เทราท์ (Merrifield et al., 2010) ได้สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่อย่างไรก็ตามมีบางรายงานที่พบว่า การเสริมโปรไบโอติค ไม่ส่งผลกระทบต่อความสูงของวิลไลในลำไส้ปลาเรดซีบีม (Ferguson

et al., 2010) ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจาก *Bacillus* และ*P. acidlacticis* สามารถเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหาร ได้แก่ lipase protease และamylase ได้ โดยการผลิตเอนไซม์ออกมาภายนอกเซลล์ ทำให้เพิ่มประสิทธิภาพการย่อยและการดูดซึมอาหาร จึงอาจส่งผลทำให้เพิ่มความสูงของวิลไลในลำไส้ได้ (Ziaei-Nejad et al., 2006; Xu-xia, Yan-bo and Wei-fen, 2009) และนอกจากนี้โปรไบโอติคมีการสร้างกรดอินทรีย์ ส่วนใหญ่เป็นสารจำพวกกรดแลกติก (lactic acid) ทำให้กระเพาะอาหารมีสภาพเป็นกรดมากขึ้น จึงเกิดสภาวะไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค ทำให้จุลินทรีย์ก่อโรคจึงมีจำนวนลดลง จึงส่งผลทำให้ลดการเกิดการอักเสบของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ได้ และนำไปสู่การปรับปรุงพื้นที่ผิวในการดูดซึมสารอาหาร (Ringo, Myklebust, Mayhew and Olsen, 2007; Salinas, Myklebust, Esteban, Olsen, Meseguer and Ringo, 2008; Ringo, Lovmo, Kristiansen, Salinas, Myklebust, Olsen and Mayhew, 2010) จึงอาจส่งผลทำให้เพิ่มความสูงของวิลไลในลำไส้ได้ ดังนั้นจากการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า การเสริมโปรไบโอติคร่วมกับสารเสริมและการเสริมสารเสริม มีผลต่อการเพิ่มความสูงของวิลไลในลำไส้กุ้งขาว โดยกลุ่มที่ได้รับการเสริมโปรไบโอติคร่วมกับสารเสริมนั้น สามารถเพิ่มความสูงของวิลไลในลำไส้กุ้งขาวได้สูงที่สุด อาจเนื่องมาจาก การเสริมโปรไบโอติคในรูปแคปซูลน่าจะทำให้จำนวนแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติค (lactic acid bacteria) ที่เสริมลงไปในอาหารกุ้งขาว มีความสามารถในการรอดชีวิตเพิ่มสูงขึ้นเมื่อผ่านระบบทางเดินอาหาร จึงส่งผลต่อการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติค (lactic acid bacteria) ในลำไส้ ทำให้เพิ่มประสิทธิภาพการย่อยและการดูดซึมอาหาร จึงอาจส่งผลทำให้เพิ่มความสูงของวิลไลในลำไส้ได้

4.3.2.5 ผลต่อค่าโลหิตวิทยา

ค่าทางเคมีในเลือดสามารถบ่งบอกความผิดปกติทางสรีรวิทยา (Helene and Gerard, 1996) และความผิดปกติทางโภชนาการของสัตว์น้ำได้ ดังนั้นจึงสามารถนำมาใช้ในการประเมินสุขภาพกุ้งขาว (Biaxhall and Daisley, 1973) และความผิดปกติที่เกิดขึ้นได้ จากการทดลองในครั้งนี้ พบว่า การเสริมโปรไบโอติค (*B. subtilis* และ*P. acidlacticis*) ที่ผ่านการทำแคปซูลร่วมกับสารเสริมเบต้ากลูแคน (ß-glucan) และนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) และการเสริมสารเสริมไม่ส่งผลต่อค่ากลูโคส (glucose) ค่าโปรตีนรวม (total protein) และค่าไนโตรเจนยูเรีย (urea nitrogen) ในพลาสมา (plasma) แต่อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาพบว่า การเสริม *B. subtilis* ที่ผ่านการทำแคปซูลร่วมกับ ß-glucan และnucleotide (Bbn) สามารถลดปริมาณคอเลสเตอรอล (cholesterol) และไตรกลีเซอไรด์ในพลาสมา (plasma triglyceride) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเบต้ากลูแคน (ß-glucan) เป็นสารอาหารที่ไม่ถูกย่อยและไม่ดูดซึมในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก ทำให้เกิดลักษณะเหนียวหนืดของเส้นใยเคลือบผนังลำไส้ ส่งผลทำให้ความสามารถในการดูดซึมคอเลสเตอรอล (cholesterol) ลดลง และนอกจากนี้กระบวนการหมักสารพรีไบโอติคในลำไส้ใหญ่

จะเกิดผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นกรดไขมันสายสั้น พบว่า โพรพิโอเนท (propionate) สามารถไปลดการสังเคราะห์คอเลสเตอรอล (cholesterol) ในเซลล์ตับได้ (Conway, 2001) จึงส่งผลทำให้ค่าคอเลสเตอรอล (cholesterol) และไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) ในพลาสมาลดลง

สัตว์น้ำมีกลไกลในการตอบสนองต่อสภาวะความเครียด โดยในขั้นตอนแรกสัตว์น้ำจะมีการตอบสนองต่อความเครียดที่เกิดขึ้นผ่านการควบคุมผ่านทางระบบประสาทต่อมไร้ท่อ (complex neuro endocrine) ซึ่งจะมีการหลั่งฮอร์โมนคอร์ติซอล (cortisol) ส่งผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกระบวนการเมทาบอลิซึม และการควบคุมสมดุลภายในร่างกาย (osmoregulation) เช่น การเพิ่มปริมาณกลูโคสในพลาสมา โดยการกระตุ้นให้เซลล์ตับเปลี่ยนกรดอะมิโน (free amino acid) และกรดไขมันเป็นไกลโคเจนสะสมไว้ในร่างกาย แล้วเปลี่ยนเป็นกลูโคส เพื่อสร้างพลังงานไปใช้ในการปรับสมดุลการทำงานของร่างกายให้อยู่ในสภาวะปกติ และได้มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับสภาวะความเครียดในกุ้ง เมื่อกุ้งได้รับความเครียดจากสภาวะที่มีแอมโมเนียในน้ำสูง จะส่งผลทำให้ค่ากลูโคสในพลาสมา (glucose plasma) เพิ่มสูงขึ้น (Laurence, Elena, Campa-Cordova, Tovar-Ramirez, Hernández-Herrera and Racotta 2006; Meiling, Liqiao, Xinjin, Shunzhang, Lu and Yong, 2007) และค่าโปรตีนรวมในพลาสมา (plasma total protein) ลดลง (Ferraris, Parado-Estepa, de Jesus and Ladja, 1986; Chen, Chen and Cheng, 1994; Racotta and Palacios, 1998; Ariadna, Cristina, Adolfo, Vargas-Alboresb, Moullacc and Carlos, 2001; Perazzolo, Rogerio, Paulo and Barraco, 2002; Racotta and Mendez, 2002) ดังนั้นปริมาณกลูโคสในพลาสมา (glucose plasma) จึงสามารถใช้เป็นค่าที่บ่งบอกถึงภาวะความเครียดได้ค่าหนึ่ง และนอกจากนี้ความเครียดเนื่องจากแอมโมเนียยังส่งผลทำให้เกิดการระคายเคืองที่บริเวณเหงือก ทำให้กุ้งไม่สามารถแลกเปลี่ยนก๊าซ (gas exchange) และแลกเปลี่ยนไอออน (ion exchange) ได้เต็มที่ ส่งผลทำให้เกิดการสูญเสียไอออนได้ (McCormick, 2001) ดังนั้นปริมาณคลอไรด์ในพลาสมา จึงสามารถใช้เป็นค่าบ่งบอกภาวะความเครียดได้ค่าหนึ่ง (Masson, Guerold and Dangles, 2002; Urbinati, de Abreu, da Silva Camargo and Parra, 2004)

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า การเสริมโปรไบโอติคร่วมกับสารเสริม และการเสริมสารเสริมในอาหารกุ้งขาว ไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่ากลูโคสในพลาสมา (glucose plasma) ค่าไนโตรเจนจากสารยูเรียในพลาสมา (plasma urea nitrogen) และค่า osmolality ในพลาสมา (plasma osmolality) เมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งขาวในสภาวะปกติ แต่อย่างไรก็ตาม การเสริมโปรไบโอติคร่วมกับสารเสริม และการเสริมสารเสริม ส่งผลทำให้ค่าโปรตีนรวม (plasma total protein) และค่าคอเลสเตอรอลในพลาสมา (plasma triglycerides) เพิ่มสูงขึ้นจากกลุ่มควบคุม การเพิ่มขึ้นของโปรตีนรวม (total protein) และคอเลสเตอรอลในพลาสมา (plasma triglycerides) แสดงให้เห็นว่าการเสริมโปรไบโอติคร่วมกับสารเสริม และการเสริมสารเสริม สามารถช่วยเพิ่มการย่อย และการใช้

ประโยชน์ของโปรตีน และไขมันในตัวกุ้งขาวภายใต้สถานการณ์สภาวะความเครียดจากแอมโมเนียในน้ำได้ และนอกจากนี้การเพิ่มขึ้นของโปรตีนรวมในพลาสมา (plasma total protein) อาจมาจากปริมาณสารน้ำที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน (humoral nonspecific defense) ได้แก่ ปริมาณของเอนไซม์ phenoloxidase และperoxinectin ซึ่งสารโปรตีนในน้ำเลือดเหล่านี้มีบทบาทต่อการทำลายเชื้อโรคในกระแสเลือด และนอกจากนี้การเสริมโปรไบโอติคร่วมกับสารเสริม และการเสริมสารเสริม ยังสามารถลดค่าไตรกลีเซอไรด์ในพลาสมา (plasma triglycerides) และคลอไรด์ในพลาสมา (plasma chloride) ได้ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมในสภาวะที่ได้รับความเครียดจากสภาวะที่มีแอมโมเนียในน้ำสูง ดังนั้นจากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า กุ้งขาวที่ได้รับการเสริมโปรไบโอติคร่วมกับสารเสริม และการเสริมโปรไบโอติคเพียงอย่างเดียว สามารถต้านทานความเครียดอันเนื่องมาจากสภาวะที่มีแอมโมเนียในน้ำสูงได้มากกว่ากลุ่มควบคุม ผลการศึกษาในครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาการเสริมนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ในอาหารปลาแซลมอน (atlantic salmon) (Burrels et al., 2001) และปลาเรนโบว์เทราท์ (Leonardi, Sandino and Klempau, 2003) และการเสริมเบต้ากลูแคน (ß-glucan) ในอาหารกุ้งขาว (Zhao, Cao, Wang, Du, Ye, Huang, Lan, Zhou and Li, 2012) พบว่า การเสริมสารเสริมในอาหารส่งผลทำให้ความสามารถในการต้านทานความเครียดเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม เนื่องมาจาก นิวคลีโอไทด์ (nucleotide) สามารถลดการหลั่งของคอร์ติซอล (cotisal) ได้ จึงอาจส่งผลทำให้ความสามารถในการต้านทานความเครียดเพิ่มสูงขึ้น (Peng and Gatlin, 2006)

4.3.2.6 ผลต่อค่าภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ

ระบบเลือด (circulatory system) เป็นระบบการทำงานที่มีความสำคัญในการลำเลียงสารอาหารและออกซิเจนไปเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย เพื่อให้กุ้งขาวสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ เม็ดเลือด เป็นองค์ประกอบสำคัญในระบบภูมิคุ้มกัน โดยการเพิ่มขึ้นของเม็ดเลือดถือว่าเป็นตัวชี้วัดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน จากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่า การเสริมโปรไบโอติค (*B. subtilis* และ*P. acidlacticis*) ที่ผ่านการทำแคปซูลร่วมกับสารเสริมเบต้ากลูแคน (ß-glucan) และนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) และการเสริมสารเสริม ไม่ส่งผลต่อปริมาณเม็ดเลือดรวม และค่ากิจกรรมไลโซไซม์ (lysozyme activity) แต่อย่างไรก็ตาม พบว่า การเสริมโปรไบโอติคร่วมกับสารเสริม และการเสริมสารเสริม ส่งผลทำให้ค่า superoxide anion production (SOD) และค่า prophenoloxidase (proPO) สูงกว่ากลุ่มควบคุม ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาที่ผ่านมา พบว่า การเสริมเบต้ากลูแคน (ß-glucan) และนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ในอาหาร ส่งผลทำให้ค่า prophenoloxidase (proPO) phagocytosis respiratory burst complement และlysozyme ในกุ้งหลายสายพันธุ์ (Chang, Chen, Su and Liao, 2002; Lopez, Cuzon, Gaxiola, Taboada, Valenzuela, Pascual, Sanchez and Rosas, 2003; Anas et al., 2009; Nan et al., 2010) ปลาเรนโบว์เทราท์ (Burrells et al., 2001) ปลาซีเบส (Bonaldo et al., 2007) ปลาคาร์พ (Misra et al., 2006) และปลาไน

(Sakai et al., 2001; Kim, Feo and Zhang, 2009) เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งพบว่าเบต้ากลูแคน (ß-glucan) สามารถเพิ่มการทำงานของแมคโครฟาจ (macrophage) โดย superoxide anion จะถูกสร้างขึ้นในขั้นตอนการนำออกซิเจนเข้าสู่เซลล์ในกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytosis) หลังจากมีการยื่นไซโทพลาซึม (cytoplasm) เข้าล้อมรอบสิ่งแปลกปลอม (Klein, 1982) ดังนั้นเมื่อกุ้งมีการตอบสนองในกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytosis) ของเม็ดเลือดสูงขึ้น ส่งผลให้เกิดกระบวนการผลิต superoxide anion เพิ่มมากขึ้น โดยเบต้ากลูแคน (ß-glucan) จะทำหน้าที่เป็น pathogen associated molecular pattern (PAMPs) กระตุ้นสารโปรตีนที่ไหลเวียนในกระแสเลือดกุ้ง ที่มีชื่อว่า ß-glucan binding protein ส่งผลให้เกิดเป็นโมเลกุลเชิงซ้อนที่เรียกว่า ß-glucan binding protein complex จะไปกระตุ้นตรงตำแหน่ง membrane receptor ที่จำเพาะเจาะจงของเซลล์เม็ดเลือด ทำให้มีการตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกันทั้งระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์และระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด ส่งผลให้กุ้งสามารถกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ตัวกุ้งได้ (Vargas-Albores, Hinojosa-Baltazar and Magallon-Barajas, 1998; Sritunyalucksana, Cerenius and Soderhall, 1999; Vargas-Albores and Yepiz-Plascencia, 2000) และนอกจากนี้ยังมีการรายงานว่าการเสริมเบต้ากลูแคน (ß-glucan) ในอาหาร สามารถกระตุ้นให้เซลล์เม็ดเลือดเกิดกระบวนการ phenoloxidase activity เพิ่มสูงขึ้น จึงส่งผลทำให้ค่า prophenoloxidase (proPO) เพิ่มสูงขึ้น (Suphantharika, Khunrae, Thanardkit and Verduyn, 2003) ดังนั้นจากการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า การเสริมโปรไบโอติคร่วมกับสารเสริม และการเสริมสารเสริม มีผลต่อการเพิ่มความค่าภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะในกุ้งขาว

การศึกษาการเสริมโปรไบโอติค *B. subtilis* และ*P. acidilactici* ร่วมกับสารเสริมเบต้ากลูแคน (ß-glucan) และนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ต่อค่าภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเมื่อกุ้งขาวได้รับความเครียด ได้แก่ ค่าปริมาณเม็ดเลือดรวม (total hemocyte count) ปริมาณ superoxide anion และค่ากิจกรรมฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase activity) จากเซลล์เม็ดเลือดกุ้งขาว โดยทั่วไปแล้วเมื่อกุ้งขาวได้รับความเครียดจากสภาวะที่มีแอมโมเนียในน้ำสูง จะส่งผลให้กุ้งขาวมีปริมาณเม็ดเลือดรวม (total hemocyte count) ลดลงเมื่อเปรียบเทียบจากกุ้งขาวในสภาวะปกติ สอดคล้องกับการศึกษาในหอยเปาฮื้อ (Chenga, Hsiaob and Chen, 2004) กุ้งสีน้ำเงิน (Mugnier and Justou, 2004) กุ้งลอบสเตอร์ (Verghese, Radhakrishnan and Padhi, 2007) เนื่องจาก ความเครียดจากสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงจะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงการแบ่งเซลล์เนื้อเยื่อฮีมาโทโพอิทิก (haematopoietic tissues) ที่มีความสำคัญต่อสร้างเซลล์เม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ ส่งผลทำให้การสร้างเซลล์เม็ดเลือดลดลงเมื่อสัตว์เกิดความเครียด (Johnson, 1980) อย่างไรก็ตาม กุ้งขาวที่ได้รับการเสริมโปรไบโอติคร่วมกับสารเสริม และการเสริมสารเสริม ส่งผลทำให้ค่าปริมาณเม็ดเลือดรวม (total hemocyte count) เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งขาวในสภาวะปกติ เนื่องจาก ได้มีการรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้

เบต้ากลูแคน (ß-glucan) สามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเม็ดเลือด และกระตุ้นการทำงานของระบบ phenoloxidase activating system (Knaap, 1993) phagocytosis ได้ (Vargas-Albores et al., 1998) จึงอาจส่งผลทำให้ปริมาณเม็ดเลือดเพิ่มสูงขึ้น และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณ superoxide anion และค่ากิจกรรมฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase activity) เมื่อกุ้งขาวที่ได้รับความเครียดจากสภาวะน้ำที่มีแอมโมเนียสูง ปริมาณ superoxide anion และค่ากิจกรรมฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase activity)จากเซลล์เม็ดเลือดจะมีค่าลดต่ำลงเมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งขาวในสภาวะปกติ (Cheng et al., 2002; Liu and Chen, 2004; Verghese, Radhakrishnan and Padhi, 2007) เนื่องจาก แอมโมเนียมีผลต่อยับยั้งการทำงาน superoxide anion และการทำงานเอนไซม์ phenoloxidase และperoxinectin จึงส่งผลทำให้ความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียการทำงาน superoxide anion และปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase ลดลง จากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่า การเสริมโปรไบโอติคร่วมกับสารเสริม และการเสริมสารเสริม ส่งผลให้ปริมาณ superoxide anion และค่ากิจกรรมฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase activity) เพิ่มสูงขึ้นจากกลุ่มควบคุมในสภาวะที่ได้รับความเครียดจากสภาวะน้ำที่มีแอมโมเนียสูง ดังนั้นจากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า กุ้งขาวที่ได้รับการเสริมโปรไบโอติคร่วมกับสารเสริม และการเสริมสารเสริม สามารถเพิ่มค่าภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของกุ้งขาวในสภาวะที่ได้รับความเครียดจากสภาวะน้ำที่มีแอมโมเนียมากกว่ากลุ่มควบคุม

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุป

การศึกษาผลของการเสริมโปรไบโอติค (*B. subtilis* และ *P. acidilactici*) ที่ผ่านการทำแคปซูลร่วมกับสารเสริม (ß-glucan และnucleotide) ในอาหารกุ้งขาว ต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต ประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ องค์ประกอบทางเคมีในเนื้อ ลักษณะกายวิภาคในลำไส้ ค่าโลหิตวิทยา และการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกัน สามารถสรุปได้ว่า

5.1.1 การเสริมโปรไบโอติคที่ผ่านการทำแคปซูล มีผลต่อประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้โดยพบว่า กุ้งขาวที่ได้รับอาหารเสริมโปรไบโอติคที่ผ่านการทำแคปซูลจะมีจำนวนแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติค (lactic acid bacteria) ในลำไส้สูงกว่ากลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตามพบว่า การเสริมโปรไบโอติคที่ผ่านการทำแคปซูลไม่ส่งผลต่อการพัฒนาสมรรถนะการเจริญเติบโตของกุ้งขาวให้ดีขึ้น

5.1.2. ผลการศึกษาเป็นไปตามสมมุติฐาน กุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่เสริมโปรไบโอติค (*B. subtilis* และ *P. acidilactici*) ที่ผ่านการทำแคปซูลร่วมกับสารเสริม (ß-glucan และ nucleotide) จะมีผลทำให้กุ้งขาวมีสมรรถนะการเจริญเติบโตและมีสุขภาพดีขึ้น โดยพบว่า

5.1.2.1 กุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีการเสริมโปรไบโอติคร่วมกับสารเสริมมีสมรรถนะการเจริญเติบโต ได้แก่ น้ำหนักตัว (body weight) น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (weight gain : WG) น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นต่อตัวต่อวัน (daily gain : DG) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate : SGR) ความยาวลำตัวทั้งหมด (total length) และความยาวลำตัวที่เพิ่มขึ้น (length gain) สูงกว่ากลุ่มควบคุม

5.1.2.2 การเสริมโปรไบโอติคร่วมกับสารเสริม มีผลทำให้กุ้งขาวมีจำนวนแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติค (lactic acid bacteria) เพิ่มสูงขึ้น และลดจำนวน *Vibrio* spp. ในลำไส้ได้เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

5.1.2.3 การเสริมโปรไบโอติคร่วมกับสารเสริม และการเสริมสารเสริม มีผลทำให้กุ้งขาวมีปริมาณไขมัน และโปรตีนในเนื้อสูงกว่ากลุ่มควบคุม

5.1.2.4 การเสริมโปรไบโอติคร่วมกับสารเสริม มีผลทำให้กุ้งขาวมีความสูงของวิลไล (villi) ในลำไส้สูงกว่ากลุ่มควบคุม

5.1.2.5 การเสริมโปรไบโอติคร่วมกับสารเสริม และการเสริมสารเสริมไม่ส่งผลกระทบต่อค่าโปรตีนรวม (total protein) และค่าไนโตรเจนยูเรียในพลาสมา (plasma urea nitrogen)

5.1.3 กุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่เสริมโปรไบโอติคร่วมกับสารเสริม เมื่อถูกทำให้เครียดด้วย

สภาวะ น้ำที่มีแอมโมเนียสูง กุ้งขาวจะมีค่ากลูโคส (glucose) ค่าไนโตรเจนยูเรียในพลาสมา (plasma urea nitrogen) ค่า osmolality ในพลาสมา (plasma osmolality) และค่ากิจกรรมไลโซไซม์ (lysozyme activity) ไม่แตกต่างจากกุ้งขาวเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะปกติ อย่างไรก็ตามพบว่า กุ้งขาวที่อยู่ในสภาวะความเครียดจากแอมโมเนียจะมีค่าคลอเลสเตอรอล (cholesterol) ค่าไตรกลีเซอไรด์ (triglycerides) ค่าคลอไรด์ในพลาสมา (plasma chloride) และปริมาณเม็ดเลือดรวม (total hemocyte count) สูงกว่ากุ้งขาวเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะปกติ และกุ้งขาวที่อยู่ในสภาวะความเครียดจากแอมโมเนียจะมีค่าโปรตีนรวม (total protein) ค่าการผลิตซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (superoxide anion production) และค่ากิจกรรมฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase activity) ต่ำกว่ากุ้งขาวเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะปกติ จากผลการศึกษาทั้งหมดสามารถสรุปได้ดังตารางที่ 5.1

ตารางที่ 5.1 สรุปผลของการเสริมโปรไบโอติคร่วมกับสารเสริมต่อความต้านทานความเครียดของกุ้งขาวภายใต้สภาวะน้ำที่มีแอมโมเนียสูง

กลุ่มทดลอง	Bb	Bn	Bbn	Pb	Pn	Pbn	b	n	bn	C
Glucose	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0
Cholesterol	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0
Triglycerides	-	-	-	-	-	0	0	0	-	0
Chloride	0	0	-	-	-	0	0	0	0	+
Osmolality	0	0	0	0	-	0	0	+	+	0
Total protein	0	0	+	+	0	0	0	0	0	-
THC	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0
SOD	+	0	+	+	0	+	+	0	0	0
ProPO	0	0	0	+	+	+	0	0	+	0

หมายเหตุ : 0 หมายถึง ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม

\+ หมายถึง สูงกว่ากลุ่มควบคุม

\- หมายถึง ต่ำว่ากลุ่มควบคุม

THC คือ total hemocyte count

SOD คือ superoxide anion production

proPO คือ phenoloxidase activity

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาในข้างต้น สามารถนำข้อมูลจากการศึกษานี้ไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาวิจัยด้านการพัฒนาการใช้โปรไบโอติคร่วมกับสารเสริมในการเลี้ยงกุ้งได้ ซึ่งจากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่า การตรึงเซลล์ (immobilize cell) แบบไมโครเอ็นแคปซูเลชั่น (microencapsulation) นั้นส่งผลทำให้จำนวนแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติค (lactic acid bacteria) ที่เสริมลงไปในอาหารกุ้ง มีความสามารถในการรอดชีวิตเพิ่มสูงขึ้นเมื่อผ่านระบบทางเดินอาหาร จึงส่งผลต่อการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติค (lactic acid bacteria) และลดจำนวนเชื้อ *Vibrio* spp. ในลำไส้ได้ และนอกจากนี้ยังพบว่า การเสริมโปรโบโอติคร่วมกับสารเสริม สามารถเพิ่มสมรรถนะการเจริญเติบโต จำนวนแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติค (lactic acid bacteria) ความสูงของวิลไลในลำไส้ และค่าภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะในกุ้งขาวได้ ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเพื่อยืนยันว่า ประชากรแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติค (lactic acid bacteria) ที่ตรวจพบในลำไส้นั้นเป็นจุลินทรีย์ที่เสริมเข้าไปในอาหาร และควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงระดับการเสริมโปรไบโอติคในระดับที่เพิ่มสูงขึ้น เพื่อหาแนวทางในการเพิ่มสมรรถนะการเจริญเติบโต และการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันที่เพิ่มสูงขึ้นในกุ้งขาวต่อไป

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

รายการอ้างอิง

กิจการ ศุภมาตย์, อุษณีย์ เอกปณิธานพงศ์ และ จิราพร เกษรจันทร์. (2543). ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ : I เทคนิคในการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันโรคและองค์ประกอบเลือดกุ้งกุลาดำ. **ว. สงขลานครินทร์ วทท.** 22 (ฉบับพิเศษ): 567-580.

กรมการค้าภายใน. (2557). **สถานการณ์การกุ้ง เดือนพฤษภาคม 2557** [ออนไลน์]. ได้มาจาก: http://agri.dit.go.th/web_dit_sec7/home/view_upload.aspx?category_id=60&name=สถานการณ์และมาตรการ

ปิ่นมณี ขวัญเมือง. (2548). ฟังชันนัลฟูดส์: อาหารเพื่อสุขภาพ (Functional Food: Food for Health). **วารสารครุศาสตร์อุตสาหกรรม** 4 (2): 44-50.

มังกร โรจน์ประภากร และ อุไรลักษณ์ พงษ์เกษ. (2551). **การพัฒนาผลิตภัณฑ์โปรไบโอติคสำหรับกุ้งด้วยการหุ้มเซลล์**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาเกษตรศาสตร์.

ยุทธพล คงกระจ่าง และ นงนุช เลาหะวิสุทธิ์. (2549). **การใช้แบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp. เป็นโปรไบโอติคที่มีผลต่ออัตราการอดตายและปริมาณเชื้อวิบริโอในกุ้งขาวแวนนาไม.** วิทยานิพนธ์ ปริญญาโท. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าคุณทหารลาดกระบัง.

ลิลา เรืองแป้น, วารินทร์ ธนาสมหวัง และ กุลวรา แสงรุ่งเรือง. (2540). แบคทีเรียในกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในบ่อระบบพัฒนา. **วารสารสัตว์น้ำ** 8 (91): 141-148.

ศจีนา เลาหวิวัฒนกุล และ มังกร โรจน์ประภากร (2549). **ผลของแลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ผสมต่อการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ *(Penaeus monodon).*** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล. (2551**). การจัดการความรู้ การเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม ตามมาตรฐาน จีเอพี.** [ออนไลน์]. ได้จาก: http://www.fisheries.go.th/shrimp/.

สุรีย์ นานาสมบัติ, พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์, ภารวิณี ยังเจริญยืนยง, ศศวรรณ ศรีบุญทรง และศิริวรรณ แซ่โง้ว. (2549). **การอยู่รอดของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ผ่านกระบวนการปรับตัวต่อกรดและไมโครเอ็นแคปซูเลชั่นในน้ำสลัดระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าคุณทหารลาดกระบัง.

สาโรส ค้าเจริญ. (2547). **อาหารและการให้อาหารสัตว์ไม่เคี้ยวเอื้อง.** โรงพิมพ์คลังนานาวิทยา.

Abdel-Tawwab, M., Azza, M., Abdel-Rahman and Nahla, E. M. I. (2008). Evaluation of commercial live bakers' yeast, *Saccharomyces cerevisiae* as a growth and immunity

Promoter for fry Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* challenged in situ with *Aeromonas hydrophila*. **Journal of Aquaculture.** P. 185-189.

Abdulaziz, A., Douglas, W. L., David, L. W., Stewart, M., Srinivas, S. P., Sajeevan, S. P., Rosamma, P. and Singh, S. B. (2009). Alkali insoluble glucan extracted from *Acremonium diospyri* is a more potent immunostimulant in the Indian White Shrimp, *Fenneropenaeus indicus* than soluble glucan. **Aquaculture Research.** 40: 1320-1327.

Aly, S. M., Abdel-Galil, A. Y., Abdel-Aziz, G. A. and Mohamed, M. F. (2008). Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of Tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. **Fish Shellfish Immun.** 25: 128-136.

Al-Dohail, M. A., Hashim, R. and Aliyu-Paiko, M. (2009). Effects of the probiotic, *Lactobacillus acidophilus*, on the growth performance, haematology parameters and immunoglobulin concentration in African Catfish (*Clarias gariepinus*, Burchell 1822) fingerling. **Aquaculture Research.** 40: 1642-1652.

Anadon, A., Martinez-Larranaga, M. R. and Aranzazu-Martinez, M. (2006). Probiotic for animal nutrition in the European Union. **Regul Toxicol Pharmacol.** 45: 91-95.

AOAC (Association of Official Chemists). (2000). Official methods of analysis (17th ed.). Gaithersburg, MD: **Association of Official Analytical Chemists**.

Ariadna, S., Cristina, P., Adolfo, S., Vargas-Alboresb, F., Moullacc, G. L. and Carlos, R. (2001). Hemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of acclimation. **Aquaculture**. 198: 13–28.

Axelsson, L. (1993). **Lactic acid bacteria : classification and physiology.** New York. P. 1-64.

Balakrishnan, G., Peyail, S., Ramachandran, K., Theivasigamani, A., Savji, K. A., Chokkaiah, M. and Nataraj, P. (2011). Growth of cultured white leg shrimp *Litopenaeus Vannamei* (Boone 1931) in different stocking density. **Advances in Applied Science Research.** 2: 107-113.

Balcazara, J. L., Blasa, I. D., Ruiz-Zarzuelaa, I., Cunninghamb, D., Vendrella, D. and Muzquiza, J. L. (2006). The role of probiotics in aquaculture review. **Veterinary Microbiology.** 114: 173–186.

Biaxhall P. C. and Daisley K. W. (1973). Routine hematological method for use with fish blood. **Journal of Fish Biology.** 5: 771-781.

Bonaldo, A., Thompson, K. D., Manfrin, A., Adams, A., Murano, E., Mordenti, A. L. and Gatta, P. P. (2007). The influence of dietary beta-glucans on the adaptive and innate immune responses of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) vaccinated against vibriosis. **Italian Journal of Animal Science.** 6: 151-164.

Boonthai, T., Vuthiphandchai, V. and Nimrat, S. (2011). Probiotic bacteria effects on growth and bacterial composition of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Journal of Aquaclture Nutrition.** 17: 634-644.

Burrells, C., William, P. D., Southage, P. J. and Wadsworth, S. L. (2001). Dietary nucleotides: A novel supplement in fish feeds 2. Effects on vaccination, salt water transfer, growth rate and physiology of Atlantic salmon. **Aquaculture.** 199: 171-184.

Castex, M., Chim, L., Pham, D., Lemaire, P., Wabete, N., Jean-Louis, N., Schmidely, P. and Mariojouls, C. (2008). Probiotic *P. acidilactici* application in shrimp *Litopenaeus stylirostris* culture subject to vibriosis in New Caledonia. **Aquaculture.** 275: 182-193.

Catacutan, M. R. and Coloso, R. M. (1995). Effect of dietary protein to energy ratios on growth, survival and body composition of juvenile Asian seabass (*Lates calarifer*). **Aquaculture.** 131: 125-133.

Catacutan, M. R. (2002). Growth and body composition of juvenile mud crab, *Scylla serrata*, fed different dietary protein and lipid levels and protein to energy ratios. **Aquaculture**. 208: 113-123.

Chaijamrus, S. and Wanpen, S. (2012). Microencapsulation of lactic acid bacteria in water in oil emulsion. The 13th FAOBMB congress proceeding. Bangkok, Thailand. P-I-11. P. 121-125.

Chandramouli, V., Kailasapathy, K., Peiris, P. and Jones, M. (2004). An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions. **Journal of Microbiological Methods.** 56: 27–35.

Chang, C. F., Chen, H. Y., Su, M. S. and Liao, I. (2002). Immunomodulation by dietary b-1,3-glucan in the brooders of the black tiger shrimp *P. monodon*. **Fish Shellfish Immun.** 10: 505-514.

Chen, J. C., Chen, C. T. and Cheng, S. Y. (1994). Nitrogen excretion and changes of hemocyanin, protein and free amino acid levels in the hemolymph of *Penaeus monodon* exposed to different concentrations of ambient ammonia-N at different salinity levels. **The Marine**

Ecology Progress Series. 110: 85-94.

Cheng, Z., Buentello, A. and Gatlin, D. M. (2011). Dietary nucleotides influence immune responses and intestinal morphology of red drum *Sciaenops ocellatus*. **Fish Shellfish Immun.** 30: 143-147.

Chenga, W., Hsiaob, I. S. and Chen J. C. (2004). Effect of ammonia on the immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor* supertexta and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. **Fish Shellfish Immun.** 17: 193-202.

Chiu, C. H., Guu, Y. K., Liu, C. H., Pan, T. M. and Cheng, W. (2007). Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*. **Fish Shellfish Immun.** 23: 364-377.

Chotikachinda, R., Lapjatupon, W., Chaisilapasung, S., Sangsuel, D. and Tantikitti, C. (2008). Effect of inactive yeast cell wall on growth performance, survival rate and immune parameters in Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Journal of Science and Technology.** 30: 687-692.

Conway, P. L. (2001). Prebiotic and human health: the state of the art and the future perspectives. **Journal of Nutrition.** 45: 13-21.

Cook, M. T., Haybill, P. J., Hunchinson, W., Nowak, B. F. and Hayball, J. D. (2001). The efficacy of a commercial ß-glucan preparation, eco active on stimulating respiratory burst activity of head kidney macrophages from pink snapper (*Paagrus auratus*), Sparidae. **Fish Shellfish Immun.** 11: 661-672.

Dellaglio, F., Dicks L. M. T. and Torriani, S. (1995). **The genus Leuconatoc.** P. 235-278. Quoted in B. J. B. and Holzapfel, W. H. (eds.). **The genera of lactic acid bacteria.** Chapman and Hall, Glasgow.

Delzenne, N. M. and Roberfroid, M. R. (1994). Physiological effects of non-digestible oligosaccharides. **LWT-Food Science and Technology.** 27: 1-6.

Di Giancamillo, A., Vitari, F., Savoini, G., Bontempo, V., Bersani, C., Dell'Orto, V. and Domeneghini, C. (2008). Effects of orally administered probiotic *Pediococcus acidilactici* on the small and large intestine of weaning piglets. **Histol Histopathol.** 23: 651-664.

Drablos, F., Nicholson, D. and Ronning, M. (1999). EXAFS study of zinc coordination in bacitracin A. **Biochimica et Biophysica Acta.** 1431: 433-442.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

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

El-Haroun, E. R., Goda, A. S. and Chowdhury, K. (2006). Effect of dietary probiotic Biogen supplementation as a growth promoter on growth performance and feed utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). **Aquaculture Research.** 37: 1473-1480.

Eldred, B. and Hutton, R. F. (1960). On the grading and identification of domestic commercial Shrimps (Family Penaeidae) with a tentative world list of commercial Penaeids. **Journal of the Florida Academy of Sciences.** 23: 89-118.

Ellis, S. C. and Reigh, R. C. (1991). Effects of dietary lipid and carbohydrate levels on growth and body composition of juvenile red drum, *Sciaenops ocellatus*. **Aquaculture.** 97: 383-394.

Erfanullah and Jafri, A. K. (1998). Effect of dietary carbohydrate-tolipid ratio on growth and body composition of walking catfish (*Clarias batrachus*). **Aquaculture.** 161: 159-168.

FAO (Food and Agriculture Organization) globefish. (2009). **Shrimp Asia march 2012.** [On line] Available: http://www.globefish.org/shrimp-eu-march-2012.html.

FAO (Food and Agriculture Organization) globefish. (2010). **Shrimp EU march 2012.** [On line] Available: http://www.globefish.org/shrimp-asia-march-2012.html.

Far, H. Z., Saad, C. R. B., Daud, H. D., Harmin, S. A. and Shakibazadeh, S. (2009). Effect of *Bacillus subtilis* on the growth and survival rate of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **African Journal of Biotechnology.** 8: 3369-3376.

Farfante, P. and Kensley, B. (1997). Penaeoid and sergestoid shrimps and prawns of the world. keys and diagnoses for the families and genera. **Annals of Clinical Biochemistry.** 10: 79-84.

Ferguson, R. M. W., Merrifield, D. L., Harper, G. M., Rawling, M. D., Mustafa, S., Picchietti, S., Balcazar, J. L. and Davies, S. J. (2010). The effect of *Pediococcus acidilactici* on the gut microbiota and immune status of on growing red tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Journal of Applied Bacteriol.** 109: 851-862.

Ferraris, R. P., Parado-Estepa, F. D., de Jesus, E.G. and Ladja, J. M. (1986). **Osmoregulation in *Penaeus monodon*: effects of molting and external salinity.** Quoted in J. L., Maclean, L. B., Dizon, L.V. Hosillos, (Eds.). **The First Asian Fisheries Forum.** Asian Fisheries Society, Manila, Philippines. P. 637-640.

Food and agriculture organization. (2011). *Penaeus vannamei* (Boone, 1931) Cultured. **Aquatic**

Species Information Programme.

Food and agriculture organization of The United Nations. (2011). Fishery and aquaculture statistics yearbook 2009.

Fuller, R. (1989). Probiotic in man and animals : A review. **Journal of Applied Bacteriol.** 66: 365-378.

Fuller, R. (1993). Probiotic food current use and future developmented. **IFI NR.** 3: 23-26

Garling, J. D. L. and Wilson, R. P. (1977). Effect of dietary carbohydrate-to-lipid ratios on growth and body composition of fingerling channel catfish. **Progressive Fish-Culturist.** 39: 43-47.

Gatesoupe, F. J. (1999). The use of probiotics in aquaculture. **Journal of Aquaculture.** 180: 147-165.

Gatesoupe, F. J. (2002). Probiotic and formaldehyde treatments of Artemia nauplii as food for larval pollack, *Pollachius pollachius*. **Journal of Aquaculture.** 212: 347-360.

Ghosh, S., Sinha, A. and Sahu, C. (2008). Dietary probiotic supplementation in growth and health of live-bearing ornamental fishes. **Aquaculture Nutrition.** 14: 289-299.

Gibson, G. R. and Roberfoid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introduction of prebiotics. **Journal of nutrition.** 125: 401-1402.

Gilliland, S.E. (1985). **Role of starter culture bacteria in food preservation.** Quoted in S.E. Gilliland, (ed.), **In bacteria starter culture for food.** USA: CRC Press, Boca Raton, FL. P. 175.

Gonzalez-Felix, M. L., Gatlin, D. M., Lawrence, A. L. and Perez-Velazquez, M. (2002). Effect of various dietary lipid levels on quantitative essential fatty acid requirements of juvenile pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Journal of the World Aquaculture Society.** 33: 330-340.

Hedemann, M. S., Mikkelsen, L. L., Naughton, P. G. and Jensen, B. B. (2006). Effect of feed particle size and feed processing on morphological characteristics in the small and large intestine of pigs and on adhesion of Salmonella enterica serovar Typhimurium DT12 in the ileum in vitro. **Journal of Animal Science.** 83: 1554-1562.

Helene, R. and Gerard, B. (1996). Fish blood parameters as a potential tool for identification of stress caused by environmental factors and chemical intoxication. **Marine Environmental Research.** 41: 27-43.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

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

Hrubec, T. C., Cardinale, J. L. and Smith, S. A. (2000). Hematology and Plasma Chemistry Reference Intervals for Cultured Tilapia (*Oreochromis Hybrid*). **Veterinary Clinical Pathology.** 29: 7-12.

Huua, H. D., Simon, T., Klaus, H., Peter, K., Lucasa, J. S. and Barnes, A. C. (2012). Dietary nucleotides are semi essential nutrients for optimal growth of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Aquaculture.** 366: 115-121.

Immanuel, G., Menenthira, V., Beena, S. and Palavesam, A. (2003). Effect of probiotics on the growth, food utilization and biochemical changes in pearl spot *Etroplus suratensis* (Bloch). **The Indian Journal of Fisheries.** 50: 273-278.

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

Jacobs, N. J. and Van Dnmark, P. J. (1960). Arch. **Biochem. Biophys**. 88: 250-255.

Johnson, P. T. (1980). Histology of the Blue Crab, *Callinectes sapidus*. **A Model for the Decapoda. Praeger.** P. 440.

Jorge, O., Leonel, O., Paniagua-Michel, J. and Rosalia, C. (2011). Functional feed assessment on *Litopenaeus vannamei* using 100% fish meal replacement by soybean meal, high levels of complex carbohydrates and *Bacillus* probiotic strains. **Marine Drugs.** 9: 1119-1132.

Kailasapathy, K. (2006). Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. **LWT-Food Science and Technology.** 39: 1221-1227.

Keembiyehetty, C. N. and Wilson, R. P. (1998). Effect of water temperature on growth and nutrient utilization of sunshine bass (*Morone chrysops*× *Morone saxatilis*) fed diets containing different energy to protein ratios. **Aquaculture**. 166: 151-162.

Kima, S. J., Chob, S. Y., Kimc, S. H., Songd, O. K., Shind, S., Chaa, D. S. and Parke, H. J. (2008). Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus*

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

acidophilus ATCC 43121. **Sciencdirect.** P. 493-500.

Kim, Y. S., Feo, K. and Zhang, Q. Y. (2009). Effect of ß-glucan on activity of antioxidant enzymes and Mix gene expression in virus infected grass carp. **Fish Shellfish Immunol**. 27: 336-340.

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

Knaap, W. V. D. (1993). **Defense in invertebrate in Biotol (Biotechnology by open learning). Butterworth-Heinemanm Ltd.** Linaese House, Jordan Hill, Oxford.

Kodischeck, L. K. and Umbreit, W. W. J. (1969). Bacteriol. 98: 1063-1068.

Kontula, P., Jaskali, J., Nollet, L., Smet, I. D., Wright, A. V., Poutanan, K. and Sandholm, T. M. (1998). The colonization of a simulator of the human intestinal microbial ecosystem by a probiotic strain fed on fermented oat bran product effect on gastrointestinal microbiota. **Applied of Microbiology and Biotechnology.** 50: 246-252.

Kolida, S., Tuohy, K. and Gibson, G. R. (2002). Prebiotic effects of inulin and oligofructose. **British Journal of Nutrition.** 87: 193-193.

Kuhlwein, H., Emery, M. J., Rawling, M. D., Harper, G. M., Merrifield, D. L. and Davies, S. J. (2013). Effects of a dietary ß-(1,3)(1,6)-D-glucan supplementation on intestinal microbial communities and intestinal ultrastructure of mirror carp (*Cyprinus carpio* L.). **International Dairy Journal.** P. 1364-5072.

Kumar, R., Mukherjee, S. C., Ranjan, R. and Nayak, S. K. (2008). Enhanced innate immune parameters in Labeo rohita (Ham.) following oral administration of *Bacillus subtilis*. **Fish Shellfish Immun.** 24: 168-72.

Laurence, M., Elena, P., Campa-Cordova, A. I., Tovar-Ramirez, D., Hernández-Herrera, R. and Racotta, I. S. (2006). Metabolic and immune responses in Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to a repeated handling stress. **Aquaculture**. 258: 633-640.

Lee, D. J. and Putnam, G. B. (1973). The response of rainbow trout to varying protein/energy ratios in a test diet. **Journal of nutrition.** 103: 916-922.

Leonardi, M., Sandino, A. M. and Klempau, A. (2003). Effect of a nucleotide-enriched diet on the immune system, plasma cortisol levels and resistance to infectious pancreatic necrosis (IPN) in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Bulletin-European Association of Fish Pathologists.** 23: 52-59.

Liu, C. H. and Chen, J. C. (2004). Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *V. alginolyticus*. **Fish Shellfish Immun.** 16: 321-334.

Liu, C. H., Chiu, C. S., Ho, P. L. and Wang, S. W. (2009). Improvement in the growth performance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by a protease-producing probiotic, *Bacillus subtilis* E20, from natto. **Journal of Applied Microbiology.** 107: 1031-1041.

Liu, K. F., Chiu, C. H., Shiu, Y. L., Cheng, W. and Liu, C. H. (2010). Effects of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, on the survival, development, stress tolerance, and immune status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae. **Fish Shellfish Immunol**. 28: 837-844.

Manning, T. S. and Gibson, G. R. (2004). Prebiotics. **Best Practice and Research Clinical Gasterology.** 18: 287-298.

Maragkoudakis, P. A., Georgia, Z., Christos, M., George, K., Bruno, P. and Effie, T. (2006). Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. **International Dairy Journal.** 16: 189-199.

Mariel, G., Fabiano, T. and Jenny, R. (2004) Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. **Aquaculture.** P. 233: 1-14.

Masaaki, M., Mikito, I. and Tadayuki, I. (1992). Isolation of a new surfactin producer *Bacillus pumilus* A-1, and cloning and nucleotide sequence of the regulator gene, psf-1. **Journal of Fermentation and Bioengineering.** 74: 255-261.

Masson, N., Guerold, F. and Dangles, O. (2002). Use of blood parameters in fish to assess acidic stress and chloride pollution in French running water. **Chemosphere.** 47: 467-473.

McCormick, S. D. (2001). Endocrine control of osmoregulation in teleost fish. **American Zoologist.** 41: 781-794.

Meiling, H., Liqiao, C., Xinjin, S., Shunzhang, G., Lu, Z. and Yong, C. (2007). Metabolic and immune responses in Chinese mitten-handed crab (*Eriocheir sinensis*) juveniles exposed to elevated ambient ammonia. **Comparative Biochemistry and Physiology.** 145: 363-369.

Merrifield, D. L., Bradley, G., Baker, R. T. M. and Davies, S. J. (2010). Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) II. Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria post antibiotic treatment. **Aquaculture Nutrition.** 16: 496-503.

Merrifield, D. L., Bradley, G., Harper, G. M., Baker, R. T. M., Munn, C. B. and Davies, S. J. (2011). Assessment of the effects of vegetative and lyophilised *Pediococcus acidilactici* on growth, feed utilisation, intestinal colonisation and health parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss Walbaum*). **Aquaculture Nutrition.** 17: 73-79.

Misra, C. K., Das, B. K., Mukherjee, S. C. and Pattnaik, P. (2006). Effect of long term administration of dietary b-glucan on immunity, growth and survival of Labeo rohita fingerlings. **Aquaculture.** 225: 82-94.

Mo, P., Wei, X., Qinghui, A., Kangsen, M., Zhiguo, L. and Kaikai, Z. (2013). Effects of nucleotide supplementation on growth, immune responses and intestinal morphology in juvenile turbot fed diets with graded levels of soybean meal (*Scophthalmus maximus L.*). **Aquaculture.** 51: 392-395.

Moriarty, D. J. W. (1997). Probiotics and bioremediation in aquaculture. **Asian Shrimp News.** 26: 3-9.

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

Mugnier, C. and Justou, C. (2004). Combined effect of external ammonia and molt stage on the blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* physiological response. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.** 309: 35-46.

Munoz, M., Vandenbuleke, F., Gueguen, Y. and Bachere, E. (2003). Expression of penaeidin antimicrobial peptides in early larval stages of the shrimp *Penaeus vannamei*. **Developmental and Comparative Immunology.** 27: 283-289.

Nan, B., Wenbing, Z., Kangsen, M., Xiaojie, W., Wei, X. and Hongming, M. (2010). Effects of discontinuous administration of ß-glucan and glycyrrhizin on the growth and immunity of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture.** 306: 218-224.

Nayak, S. K., Swain, P. and Mukherjee, S. C. (2007). Effect of dietary supplementation of probiotic and vitamin C on the immune response of Indian major carp, Labeo rohita (Ham). **Fish Shellfish Immun.** 23: 892-896.

Nelda, L., Gerard, C., Gabriela, G., Gabriel, T., Manuel, V., Cristina, P., Ariadna, S. and Carlos, R. (2003). Physiological nutritional and immunological role of dietary ß-1,3-glucan and ascorbic acid 2-monophosphate in *Litopenaeus vannamei* juveniles. **Aquaculture.** 176: 271-283.

Newaj-Fyzul, A., Adesiyun, A. A., Mutani, A., Ramsubhag, A., Brunt, J. and Austin, B. (2007). *Bacillus subtilis* AB1 controls *Aeromonas* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). **Journal of Applied Bacteriol.** 103: 1699-1706.

Nikl, L., Albright, L. J. and Evelyn, T. P. (1991). Influence of seven immunostimulants on the immune response of coho salmon to *Aeromonas salmonicida*. **Diseases of Aquatic Organisms.** 12: 7-12.

Nimrat, S. (2007). Characteristics and nutrient removal of six candidate probiotic bacteria in batch and simulated shrimp ponds. **The 7th TRF congress proceeding**. Chonburi, Thailand.

Oinghui, A., Kangsen, M., Huitao, L., Chunxiao, Z., Lu, Z., Qingyuan, D., Beiping, T., Wei, X., Hongming, M., Wenbing, Z. and Zhigou, L. (2004). Effects of dietary protein to energy ratios on growth and body composition of juvenile Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus*. **Aquaculture.** 230: 507-516.

Oliva-Teles, A. and Paula, G. (2001). Partial replacement of fishmeal by brewer's yeast (*Saccaromyces cerevisae*) in diets for sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. **Aquaculture.** 202: 269-78.

Oliva-Teles, A., Guedes, M., Vachot, C. and Kaushik, S. (2006). The effect of nucleic acids on growth, urea genesis and nitrogen excretion of gilthead sea bream *Sparus aurata* juveniles. **Aquaculture.** 253: 608-617.

O'Sullivan, L., Ross, R. P. and Hill, C. (2002). Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. **Biochimie.** 84: 593-604.

Panigrahi, A., Kiron, V., Kobayashi, T., Puangkaew, J., Satoh, S. and Sugita, H. (2004). Immune responses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* induced by a potential probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136. **Vet Immunol Immunopathol.** 102: 379-388.

Panigrahi, A., Kiron, V., Puangkaew, J., Kobayashi, T., Satoh, S. and Sugita, H. (2005). The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Aquaculture.** 243: 241-254.

Parker, R. B. (1974). Probiotics, the other half of the antibiotics story. **Animal Nutrition and Health.** 29: 4-8.

Paulsen, S. M., Engstad, R. E. and Robertsen, B. (2001). Enhanced lysozyme production in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages treated with yeast ß-glucan and bacterial lipopolysaccharide. **Fish Shellfish Immun.** 11: 23-37.

Peng, L. and Gatlin, D. M. (2003). Evaluation of brewer's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a feed supplement for hybrid striped bass (*Morone chrysops×M. saxatilis*). **Aquaculture.** 219: 681-692.

Peng, L. and Gatlin, D. M. (2005). Evaluation of the prebiotic GroBiotic-A and brewer's yeast as dietary supplements for sub-adult hybrid striped bass (*Morone chrysops×M. saxatilis)* challenged in situ with *Mycobacterium marinum*. **Journal of nutrition.** 248: 197-205.

Peng, S. M., Chen, L. Q. and YE, J. Y. (2005). Effects of dietary protein to energy ratios on growth and body composition of juvenile black seabream, *Sparus macrocephalus*. **Journal of fish science.** 12: 465-470.

Peng, L. and Gatlin, D. M. (2006). Nucleotide nutrition in fish: Current knowledge and future applications. **Aquaculture.** 251: 141-152.

Peng, L., Gatlin, D. M. and Neill, W. H. (2007). Dietary supplementation of a purified nucleotide mixture transiently enhanced growth and feed utilization of juvenile red drum, *Sciaenops ocellatus.* **Journal of the World Aquaculture Society.** 38: 281-286.

Perez, C., Suarez, C. and Castro, G. R. (1993). Antimicrobial activity determined in strains of *Bacillus circulans* cluster. **Folia Microbiologica.** 38: 25-28.

Perazzolo, L. M., Rogerio, G., Paulo, O., and Barraco, M. A. A. (2002). Evaluation of some hemato-immunological parameters in the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* submitted to environmental and physiological stress. **Aquaculture.** 214: 19-33.

Picot, A. and Lacroix, C. (2004). Encapsulation of *Bifidobacteria* in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. **International Dairy Journal.** 14: 505-515.

Racotta, I. S. and Palacios, E. (1998). Hemolymph metabolic variables in response to experimental manipulation stress and serotonin injection in *Penaeus vannamei*. **Journal of the World Aquaculture Society.** 29: 351-356.

Racotta, I. S., Palacios, E. and Mendez, L. (2002). Metabolic responses to short and long-term exposure to hypoxia in white shrimp (*Penaeus vannamei*). **Marine and Freshwater Behaviour and Physiology.** 35: 269-275.

Ratcliffe, N. A., Rowley, A. F., Fitzgerald, S. W. and Rhodes, C. P. (1985). Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances. **International Review of Cytology.** 97: 183-350.

Reinitz, G. and Hitzel, F. (1980). Formulation of practical diets for rainbow trout based on disired Performance and body composition. **Aquaculture.** 19: 243-252.

Rengpipat, S., Phianphak, W., Piyatiratitivorakul, S. and Menasaveta, P. (1998). Effects of a probiotic bacterium in black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. **Journal of Aquaculture.** 167: 301-313.

Rengpipat, S., Tunyanun, A., Fast, A. W., Piyatiratitivorakul, S. and Menasveta, P. (2003). Enhanced growth and resistance to *Vibrio* challenge in pond-reared black tiger shrimp *Penaeus monodon* fed a *Bacillus* probiotic. **Diseases of Aquatic Organisms.** 55: 169-173.

Richmond, N. (1973). Clin. **Chemistry.** 19: 1350.

Ringo, E., Myklebust, R., Mayhew, T. M. and Olsen, R. E. (2007). Bacterial translocation and pathogenesis in the digestive tract of larvae and fry. **Aquaculture.** 268: 251-264.

Ringo, E., Lovmo, L., Kristiansen, M., Salinas, I., Myklebust, R., Olsen, R. E. and Mayhew, T. M. (2010). Lactic acid bacteria vs pathogens in the gastrointestinal tract of fish: a review. **Aquaculture Research.** 41: 451-467.

Rosenthal HL., Cenditt HT. (1956). Clin. **Chem.** P. 2894.

Sakai, M., Taniguchi, K., Mamoto, K., Ogawa, H. and Tabata, M. (2001). Immunostimulant effects of nucleotide isolated from yeast RNA on *carp, Cyprinus carpio*. **Journal of Fish Diseases.** 24: 433-438.

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

Salinas, I., Myklebust, R., Esteban, M. A., Olsen, R.E., Meseguer, J. and Ringo, E. (2008). In vitro studies of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. lactis in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) foregut: tissue responses and evidence of protection against *Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida* epithelial damage. **Veterinary Microbiology.** 128: 167-77.

Sanders, M. E., Morelli, L. and Tompkins, T. A. (2003). Spore formers as human probiotics: *Bacillus*, *Sporolactobacillus*, and *Brevibacillus*. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.** 2: 101-110.

Schelttler, G. and Nussel, E. (1975). Arb. Med Soz. **Med. Prav. Med**. 10-25

Scholz-Ahrens, K. E., Schaafsma, G., van der Heuvel, E. G. and Schrezenmerir, J. (2001).

Scholz-Ahrens, K. E., Schaafsma, G., van der Heuvel, E. G. and Schrezenmerir, J. (2001). Effects of prebiotic on mineral metabolism. **American Journal of Clinical nutrition.** 73: 459-464.

Sealey, W. M., Barrows, F. T., Hang, A., Johansen, K. A., Overturf , K., LaPatra, S. E. and Hardy, R. W. (2008). Evaluation of the ability of barley genotypes containing different amounts of ß-glucan to alter growth and disease resistance of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss.* **Animal Feed Science and Technology.** 141: 115-128.

Searcy, R. l., Rearcy, R. l., Reardon, J. E., Foremwn, T.A. (1967). **The American journal of medical technology.** 33: 15-20.

Serrano, J. A., Nematipour, G. R. and Gatlin, D. M. (1992). Dietary protein requirement of the red drum (*Sciaenops ocellatus*) and relative use of dietary carbohydrate and lipid. **Aquaculture.** 101: 283-291.

Shelby, R. A., Chhorn, L., Yildirim-Aksoy, M. and Klesius, P. H. (2007). Effects of probiotic bacteria as dietary supplements on growth and disease resistance in young channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). **Journal of Apply Aquaculture.** 19: 81-91.

Simpson, P. J., Fitzgerald, G. F., Stanton, C. and Ross, R. P. (2004). The evaluation of a mupirocin-based selective medium for the enumeration of *Bifidobacteria* from probioticanimal feed. **Journal of Microbiological.** 57: 9-16.

Sritunyalucksana, K., Cerenius, L. and Soderhall, K. (1999). Molecular cloning and characterization of prophenoloxidase in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. **Developmental and Comparative Immunology.** 23: 179-186.

Stiles, M. E. and Holzapfel, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **International Journal of Food Science & Technology.** 36: 1-29.

Suphantharika, M., Khunrae, P., Thanardkit, P. and Verduyn, C. (2003). Preparation of spent brewer's yeast glucan with a potential application as an immunostimulant for the black tiger shrimp. **Bioresource Techno.** 88: 55-60.

Swain, J. S. (1956). Clin. **Chemistry and industry.** 20: 418.

Tahere, B., Hedayati, S. A., Vahid, Y., Morteza, A. and Ali, F. (2008). Growth, survival and gut microbial load of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) fry given diet supplemented with probiotic during the two months of first feeding. Turk. **Journal of Fisheries and Aquatic Sciences.** 8: 43-48.

Tahmasebi-Kohyani, A., Saeed, K., Amin, N., Nemat, M. and Pasha-Zanoosi, H. (2012). Effects of dietary nucleotides supplementation on rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss*) performance and acute stress response. **Fish Physiol Biochem.** 38: 431-440.

Thomas, L., Labor and Diagnose. (1992). Clin. **Biochem.** 9: 34-37.

Thomas, H., Petra, F. and Ulrich, K. (2009). Microencapsulation of probiotic cells by means of rennet gelation of milk proteins. **ScienceDirect.** P. 1670-1677.

Timmermans, L. P. (1987). Early development and differentiation in fish. Sarsia 72: 331-339. **Aquaculture.** 252: 516-524.

Trinder, P. (1969). Clin. **Biochem.** 6: 24-27.

Trickett, J. (1978). The prevention of food poisoning. **Cheltenham Stanley Thornes (Publishers).** P. 25-44.

Uauy, R., Stringel, G., Thomas, R. and Quan, R. (1990). Effect of dietary nucleotides on growth and maturation of the developing gut in the rat. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition.** 10: 497-503.

Urbinati, E. C., de Abreu, J. S., da Silva Camargo, A. C. and Parra, M. A. L. (2004). Loading and transport stress of juvenile matinxa (Brycon cephalus, Characidae) at various densities. **Aquaculture.** 229: 389-400.

Vadstein, O. (1997). The use of immunostimulation in marine larvi culture: possibilities and challenges. **Aquaculture.** 155: 401-417.

Valerie, C., Micheline, G. and Vernoux, J. P. (2004). Numbers and strains of *Lactobacillus* in some probiotic products. **International Journal of Food Microbiology.** 97: 147-156.

Vargas-Albores, F., Hinojosa-Baltazar, P., Portillo-Clark, G. and Magallon-Barajas, F. (1998). Influence of temperature and salinity on the yellow leg shrimp. *Penaeus californisis Holmes*, phenoloxidase system. **Aquaculture.** 29: 549-553.

Vargas-Albores, F. and Yepiz-Plascencia, G. (2000). Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response. **Aquaculture.** 191: 13-21.

Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P. and Verstraete, W. (2000). Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. **Microbiology and Molecular Biology Reviews.** 64: 655-671.

Verghese, B., Radhakrishnan, E. V. and Padhi, A. (2007). Effect of environmental parameters on immune response of the Indian spiny lobster, *Panulirus homarus* (Linnaeus, 1758). **Fish**

Shellfish Immun. 23: 928-936.

Wang, Y. B. (2007). Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*. **Aquaculture.** 269: 259–264.

Weichselbaum, T. E. (1964). **Journal of Clinical Pathology.** 16: 40-49.

Whittington, R., Lim, C. and Klesius, P. H. (2005). Effect of dietary ß-glucan levels on the growth response and efficacy of *Streptococcus iniae* vaccine in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture.** 248: 217-225.

Wunwisa, K., Bhesh, B. and Hilton, D. (2003). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. **International Dairy Journal.** 13: 3-13.

Xuxia, Z., Ziqiang, T., Yanbo, W. and Weifen, L. (2009). Effect of treatment with probiotics as water additives on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. **Fish Physiol Biochem.** P. 920-1742.

Xu-xia, Z., Yan-bo, W. and Wei-fen, L. (2009). Effect of probiotic on larvae shrimp (*Penaeus vannamei*) based on water quality, survival rate and digestive enzyme activities. **Aquaculture.** 287: 349-353.

Yanbo, W., Linglin, F. and Junda, L. (2012). Probiotic (*Bacillus coagulans*) cells in the diet benefit the White shrimp. **Journal of Shellfish Research.** 31: 855-860.

Yu, M. C., Li, Z. J., Lin, H. Z., Wen, G. L. and Ma, S. (2008). Effects of dietary *Bacillus* and medicinal herbson the growth, digestive enzyme activity and serum biochemical parametersof the shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture International.** 16: 471-480.

Yu, M. C., Li, Z. J., Lin, H. Z., Wen, G. L. and Ma, S. (2009). Effects of dietary medicinal herbs and *Bacillus* on survival, growth, body composition, and digestive enzyme activity of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture International.** 17: 377-384.

Zeitler, M. H., Kirchgessner, M. and Schwarz, F. J. (1984). Effects of different protein and energy supplies on carcass composition of carp (*Cyprinus carpio* L.). **Aquaculture.** 36: 37-48.

Zhao, H. Z., Cao, J. M., Wang, A. L., Du, Z. Y., Ye, C. X., Huang, Y. H., Lan, H. B., Zhou, T. T. and Li, G. L. (2012). Effect of long-term administration of dietary ß-1,3-glucan on growth, physiological, and immune responses in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). **Aquaculture International.** 20: 145-158.

Ziaei-Nejad, S., Rezaei, M. H., Takami, G. A., Lovett, D. L., Mirvaghefi, A. and Shakouri, M. (2006). The effect of *Bacillus spp*. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. **Aquaculture.** 252: 516-524.

ภาคผนวก ก

ส่วนประกอบของสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. MRS Broth (100 ml)

ประกอบด้วย	MRS	5.22	g
	NaCl	3	g
	deionized water	100	ml

ใส่น้ำ DI 100 ml หลังจากนั้นทำการผสมสารละลายให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มจนสารละลายใส เสร็จแล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เก็บไว้ในตู้ เย็นจนกว่าจะนำมาใช้งานเลี้ยงเชื้อ

2. peptone water (1,000 ml)

ประกอบด้วย	peptone	15	g
	$NaCl_2$	5	g
	deionized water	1,000	ml

ใส่น้ำ DI 1,000 ml หลังจากนั้นทำการผสมสารละลายให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มจนสารละลายใส เสร็จแล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เก็บไว้ในตู้ เย็นจนกว่าจะนำมาใช้งานเลี้ยงเชื้อ

การเตรียมสารละลายและบัฟเฟอร์

1. cacodylate buffer (CAC) (1,000 ml)

ประกอบด้วย	NaCl	26.30	g
	sodium cacodylate	2.14	g
	calcium chloride	1.47	g
	magnesium chloride	5.29	g

ใส่น้ำ DI (ที่ผ่านการ autoclave ฆ่าเชื้อแล้ว) 800 ml ทำการผสมสารละลายให้เข้ากัน และปรับ pH ให้เท่ากับ 7.3 หลังจากนั้นทำการปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1,000 ml ด้วยน้ำ DI (ที่ผ่านการ autoclave ฆ่าเชื้อแล้ว) เก็บไว้ในชวดสีชาที่ 4 องศาเซลเซียส

2. 0.1 % trypsin (100 ml)

ประกอบด้วย	trypsin	0.1	g
	cacodylate buffer (CAC)	100	ml

ละลาย Trypsin ด้วย cacodylate buffer 100 ml ทำการผสมสารละลายให้เข้ากันเก็บไว้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ในตู้เย็นจนกว่าจะนำมาใช้

3. 0.3 % L-dihydroxyphenyl-alanine (L-DOPA)

ประกอบด้วย	L-DOPA	0.3	g
	cacodylate buffer (CAC)	100	ml

ละลาย L-DOPA ด้วย cacodylate buffer 100 ml ทำการผสมสารละลายให้เข้ากัน เก็บไว้ในตู้เย็นจนกว่าจะนำมาใช้

4. nitrotetrazolium blue (NBT) (1 ml)

ประกอบด้วย	NBT	0.02	g
	L-15	1	ml

ผสมสารละลายให้เข้ากัน แล้วเก็บไว้ในขวดสีชาในตู้เย็นจนกว่าจะนำมาใช้

5. zymosan (1 ml)

ประกอบด้วย	zymosan	0.01	g
	dimethyl sulfoxide (DMSO)	1	ml

ผสมสารละลายให้เข้ากัน แล้วเก็บไว้ในขวดสีชาในตู้เย็นจนกว่าจะนำมาใช้

6. NBT-zymosan (1,000 ml)

ประกอบด้วย	NBT	(จากข้อ 4)	100	ul
	zymosan	(จากข้อ 5)	100	ul
	L-15		800	ul

ผสมสารละลายให้เข้ากัน แล้วเก็บไว้ในขวดสีชาในตู้เย็นจนกว่าจะนำมาใช้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัติผู้เขียน

นางสาวอุมาพร วงศาสัก เกิดเมื่อวันที่ 12 มกราคม พ.ศ. 2532 เริ่มศึกษาชั้นประถมศึกษาปีที่ 1-6 ที่โรงเรียนวัดลานนาบุญ จังหวัดนนทบุรี ชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 1-6 ที่โรงเรียนสตรีนนทบุรี จังหวัดนนทบุรี และสำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา และเมื่อเดือนพฤษภาคม-กันยายน พ.ศ. 2554 เริ่มทำงานที่บริษัท บี เอฟ ฟีด จำกัด ตำแหน่ง นักวิชาการอาหารสัตว์ หลังจากนั้นเดือนตุลาคม พ.ศ. 2554 เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี