



ผลของโปรดิจีโอซินจากแบคทีเรีย *Zooshikella ganghwensis* ที่แยกได้จาก
ฟองน้ำทะเลในกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*)

**Effects of Prodigiosin from *Zooshikella ganghwensis* Isolated from Marine
Sponge in Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*)**

ธราพันธ์ คงกะพันซ์

Tharanan Kongkapan

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for the
Degree of Master of Science in Aquatic Science**

Prince of Songkla University

2562

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ ผลของโพรคิจิโอซินจากแบคทีเรีย *Zooshikella ganghwensis* ที่แยกได้จากฟองน้ำทะเลในกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*)

ผู้เขียน นายธรรนันท์ คงกะพันท์

สาขาวิชา วาริชศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นเรศ ช้วนยุค)

(รองศาสตราจารย์ ดร. วุฒิพร พรหมขุนทอง)

.....กรรมการ

(ดร.จำเริญศรี ถาวรสุวรรณ)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุภฎา ศิริรัฐนิคม)

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นเรศ ช้วนยุค)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุภฎา ศิริรัฐนิคม)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์

.....

(ศาสตราจารย์ ดร.ดำรงศักดิ์ ฟ้ารุ่งแสง)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นเรศ ช้วนยุค)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลงชื่อ.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุภฎา ศิริรัฐนิคม)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ลงชื่อ.....

(นายธรรนันท์ คงกะพันธ์)

นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และ
ไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นายธรรานันท์ คงกะพันธ์)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	ผลของโพรคิจิโอสินจากแบคทีเรีย <i>Zooshikella ganghwensis</i> ที่แยกได้จากฟองน้ำทะเลในกุ้งขาว (<i>Litopenaeus vannamei</i>)
ผู้เขียน	นายธรรานันท์ คงกะพันธ์
สาขาวิชา	วาริชศาสตร์
ปีการศึกษา	2561

บทคัดย่อ

การศึกษานี้สามารถแยกแบคทีเรียที่ผลิตสารสีได้จำนวน 8 ไอโซเลต (PSU-KSAAHRC MS1-8) จากฟองน้ำทะเลจำนวน 5 ชนิด โดยแบคทีเรียไอโซเลต PSU-KSAAHRC MS2 ที่แยกได้จากฟองน้ำทะเล *Haliclona* sp. ในจังหวัดสตูล สามารถผลิตสารสีได้สูงสุด คือ $3,140.23 \pm 464.80$ ไมโครกรัมต่อกรัม เมื่อนำสารสีแดงที่แบคทีเรียผลิตมาศึกษาคุณสมบัติและจำแนกชนิด พบว่าเป็นสารโพรคิจิโอสินที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดอยู่ในช่วง 535-539 นาโนเมตร และมีน้ำหนักโมเลกุล 322.19-324.20 ดาลตัน การจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยอาศัยคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และการใช้เทคนิค Phylogenetic analysis สามารถจำแนกชนิดแบคทีเรียไอโซเลต PSU-KSAAHRC MS2 ได้เป็นแบคทีเรีย *Zooshikella ganghwensis* การศึกษาปัจจัยทางกายภาพที่เหมาะสมต่อการผลิตสารสีของแบคทีเรีย พบว่าแบคทีเรีย *Z. ganghwensis* PSU-KSAAHRC MS2 สามารถผลิตสารสีโพรคิจิโอสินได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และความเป็นกรด-ด่าง 8 การศึกษาผลของการเสริมแบคทีเรีย *Z. ganghwensis* PSU-KSAAHRC MS2 ในอาหารกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ที่ระดับ 0 1 3 และ 5 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร พบว่า กุ้งขาวที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* ทุกชุดการทดลองมีการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกัน หลังได้รับอาหารผสมเซลล์แบคทีเรีย *Z. ganghwensis* PSU-KSAAHRC MS2 อย่างไรก็ตาม กุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมเซลล์แบคทีเรีย *Z. ganghwensis* PSU-KSAAHRC MS2 ที่ระดับ 1 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร มีอัตราการรอดสูง 61.67 ± 24.66 เปอร์เซ็นต์ และมีปริมาณเม็ดเลือดรวม ($3.73 \pm 0.70 \times 10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (19.57 ± 1.23 ยูนิตต่อนาทีต่อมิลลิกรัม โปรตีน) ความสามารถในการจับกินสิ่งแปลกปลอม (54.33 ± 0.76 เปอร์เซ็นต์) क्षณิการจับกินสิ่งแปลกปลอม (42.82 ± 0.66) และกิจกรรมของเอนไซม์คาตาเลส (73.40 ± 24.6 ยูนิตต่อมิลลิกรัม โปรตีน) สูงกว่ากุ้งขาวในชุดการทดลองอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของตับและตับอ่อน พบว่าตับและตับอ่อนของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมเซลล์แบคทีเรียที่ระดับ 1 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร มีลักษณะค่อนข้างปกติเมื่อเปรียบเทียบกับตับและตับอ่อนของกุ้งที่ได้รับอาหารในชุดควบคุมและชุดการทดลองอื่นๆ ซึ่งให้เห็นว่าสารโพรคิจิโอสินภายในเซลล์ของแบคทีเรีย *Z. ganghwensis* ช่วยรักษาการติดเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ในกุ้งขาว

Thesis Title	Effects of Prodigiosin from <i>Zooshikella ganghwensis</i> Isolated from Marine Sponge in Pacific White Shrimp (<i>Litopenaeus vannamei</i>)
Author	Mr. Tharanan Kongkapan
Major Program	Aquatic Science
Academic	2018

ABSTRACT

In this study, a total of 8 pigmented bacteria (PSU-KSAAHRC MS1-8) were isolated from five species of marine sponges. Of these 8 isolates, one bacterial isolate PSU-KSAAHRC MS2 from marine sponge *Haliclona* sp. from Satun provinces, produced highest pigment of $3,140.23 \pm 464.80$ $\mu\text{g/g}$. The red pigment found in the bacterial isolate PSU-KSAAHRC MS2 exhibited maximum absorption ranged from 535-539 nm and mass spectrometry revealed molecular weights of 322.19-324.20 Da, which were identified as prodigiosins. Based on morphological and biochemical characteristics as well as phylogenetic analysis, this bacterium was identified as *Zooshikella ganghwensis*. Optimization of prodigiosin production at various conditions showed that *Z. ganghwensis* PSU-KSAAHRC MS2 produced maximum prodigiosin at temperature of 30 °C and pH 8. Investigation of dietary administration of *Z. ganghwensis* PSU-KSAAHRC MS2 at 0, 1, 3 and 5 g/kg diet in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) indicated that dietary supplemented *Z. ganghwensis* PSU-KSAAHRC MS2 had no effect on growth performance of Pacific white shrimp infected with *Vibrio parahaemolyticus*. However the highest survival rate (61.67 ± 24.66 %) was observed in shrimp fed with dietary supplemented *Z. ganghwensis* PSU-KSAAHRC MS2 at 1 g/kg diet. Moreover, the highest total hemocyte count ($3.73 \pm 0.70 \times 10^7$ cell/ml) phenoloxidase activity (19.57 ± 1.23 unit/min/mg protein) phagocytic activity (54.33 ± 0.76 %) phagocytic index (42.82 ± 0.66) and catalase enzyme activity (73.40 ± 24.6 unit/mg protein) were found in shrimp fed with dietary supplemented *Z. ganghwensis* PSU-KSAAHRC MS2 at 1 g/kg diet which was significantly different from other treatments ($p < 0.05$). Histopathological findings revealed normal hepatopancreatic tissue observed in shrimp fed with dietary supplemented *Z. ganghwensis* PSU-KSAAHRC MS2 at 1 g/kg diet when compared to other treatments, indicating that prodigiosin from *Z. ganghwensis* treat the shrimp from *V. parahaemolyticus* infection.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และทุนเรียนดีประจำปีการศึกษา 2558 จากคณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงได้โดยความช่วยเหลือจากบุคคลหลายฝ่ายเหล่านี้ที่ควรแก่การกล่าวถึง ด้วยความรู้ดีที่ขอบขอบคุณ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. วุฒิพร พรหมขุนทอง และดร.จำเริญศรีถาวรสุวรรณ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำและแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ รวมทั้งตรวจทานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นเรศ ชวนยุก อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่เป็นผู้ให้ความรู้ ความช่วยเหลือ และให้กำลังใจในทุกๆเรื่อง คอยดูแลเอาใจใส่ข้าพเจ้าเป็นอย่างดีเสมอมา รวมทั้งให้คำแนะนำ และแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ในการทำวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้นทำให้งานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุกัญฉีร์รัฐนิคม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้การช่วยเหลือ ให้คำปรึกษาในการทำงาน และให้โอกาสแก่ข้าพเจ้าในการเรียนรู้การวิเคราะห์หาชนิดของสารสีจากแบคทีเรีย รวมทั้งแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ในการทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณดร.สุเมตต์ ปุจฉาการ ฝ่ายวิจัยวิทยาศาสตร์ทางทะเล สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการจำแนกชนิดของฟองน้ำทะเล ทำให้งานวิจัยในส่วนนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ ภาควิชาวาริชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ทุกท่านที่คอยอบรมสั่งสอนให้ความรู้แก่ข้าพเจ้ามาโดยตลอดระยะเวลาที่ข้าพเจ้าได้ศึกษา ณ ที่นี้ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาวาริชศาสตร์ เจ้าหน้าที่ประจำศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ กิจการ สุขุมาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในเรื่องต่างๆ ขอขอบคุณความช่วยเหลือทั้งในด้านกำลังใจ และกำลังใจดีๆ ที่คอยมอบให้ข้าพเจ้าตลอดจากคุณอัครวิทย์ อีสสระโร คุณนัทท์ นันทพงษ์ คุณมัชลิน แดงเวชงาม คุณชุตินา คลิ่งขลิบ คุณวิรุฬห์ศักดิ์ ทองสุภา คุณจิตติชญา แสงประดับ คุณสุเมษา พ่วงพี รวมทั้งเพื่อนพี่น้องทุกท่านที่ไม่ได้กล่าวนาม ขอแสดงความขอบคุณด้วยใจจริง

ท้ายที่สุดนี้ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ คุณแม่ของข้าพเจ้า พี่ชาย และญาติพี่น้องทุกท่าน ผู้ซึ่งเป็นที่รักยิ่ง และกำลังใจอันสูงสุด ที่คอยให้ความรัก ความห่วงใย และความช่วยเหลือในทุกๆเรื่อง ในยามที่ข้าพเจ้าพบกับความลำบาก จนทำให้ข้าพเจ้าประสบความสำเร็จในการศึกษาครั้งนี้

ธราพันธ์ คงกะพันธ์

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ	(5)
Abstract	(6)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(10)
รายการภาพประกอบ	(11)
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 บทนำตั้งเรื่อง	1
1.2 การตรวจเอกสาร	2
1.2.1 กุ้งขาว (<i>L. vannamei</i>)	2
1.2.2 ฟองน้ำ	5
1.2.3 สารสีในธรรมชาติ	9
1.2.4 บทบาทของสารสีในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	15
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	17
บทที่ 2 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการศึกษา	18
2.1 วัสดุ	18
2.1.1 กุ้งขาว	18
2.1.2 อาหารสำหรับเลี้ยงกุ้งขาว	18
2.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน	18
2.1.4 สารเคมี	18
2.2 อุปกรณ์	18
2.3 วิธีการ	19
2.3.1 การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตสารสีจากฟองน้ำทะเล	19
2.3.2 การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรีย	19
2.3.3 การคัดเลือกแบคทีเรียชนิดที่ผลิตสารสีปริมาณสูงที่สุด	19
2.3.4 การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย	20

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
2.3.5 การศึกษาปัจจัยทางกายภาพที่เหมาะสมต่อการผลิตสารสีของ แบคทีเรีย	21
2.3.6 การศึกษาผลของแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารสีต่อการเจริญเติบโต ระบบภูมิคุ้มกัน และความต้านทาน โรคกุ้งขาว	22
2.3.7 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	32
บทที่ 3 ผลการศึกษา	33
3.1 การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตสารสีจากฟองน้ำทะเล	33
3.2 การคัดเลือกแบคทีเรียชนิดที่สามารถผลิตสารสีปริมาณสูงที่สุด	36
3.3 การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย	38
3.4 การศึกษาปัจจัยทางกายภาพที่เหมาะสมต่อการผลิตสารสีของแบคทีเรีย	39
3.5 การศึกษาผลของแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารสีต่อการเจริญเติบโต ระบบภูมิคุ้มกัน และความต้านทาน โรคกุ้งขาว	40
3.5.1 การเจริญเติบโตและความต้านทานเชื้อแบคทีเรีย	40
3.5.2 การเปลี่ยนแปลงสีของตัวกุ้ง	42
3.5.3 องค์ประกอบเลือดของกุ้งขาว	43
3.5.4 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์	48
3.5.5 การศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนของกุ้งขาว	52
บทที่ 4 วิจารณ์ผลการทดลอง	55
บทที่ 5 สรุป	63
เอกสารอ้างอิง	65
ภาคผนวก	76
ประวัติผู้เขียน	91

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1. ตัวอย่างชนิดฟองน้ำทะเลที่พบในประเทศไทย	7
2. สูตรอาหารที่ใช้สำหรับเลี้ยงกุ้งขาวในแต่ละชุดการทดลอง	22
3. องค์ประกอบทางเคมีของอาหารที่ใช้เลี้ยงกุ้งขาวในแต่ละชุดการทดลอง	23
4. แสดงเวลาและสถานที่เก็บตัวอย่าง สีของแบคทีเรีย และปริมาณสารสีที่ผลิตโดยแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตที่แยกได้จากฟองน้ำทะเล	35
5. แสดงประสิทธิภาพการใช้อาหารและการเจริญเติบโตของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 4 สูตรเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์	41
6. แสดงค่าสีตัวของกุ้งขาวที่ติดเชื้อแบคทีเรีย <i>V. parahaemolyticus</i> หลังได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์	42

รายการภาพประกอบ

ภาพที่	หน้า
1. แสดงโครงสร้างของแคโรทีนอยด์ชนิดต่างๆ	11
2. แสดงโครงสร้างของโพรดิจิโอะซิน	12
3. แสดงลักษณะ โคลโลนีของเชื้อแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตที่แยกได้จากฟองน้ำทะเล และเพาะเลี้ยงบนอาหาร Marine agar (a) PSU-KSAAHRC MS1 (b) PSU- KSAAHRC MS2 (c) PSU-KSAAHRC MS3 (d) PSU-KSAAHRC MS4 (e) PSU-KSAAHRC MS5 (f) PSU-KSAAHRC MS6 (g) PSU-KSAAHRC MS7 (h)PSU-KSAAHRCMS8	33
4. แสดงลักษณะการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 400-600 นาโนเมตร และผลการวิเคราะห์แมส สเปกโตรเมทรีของสารสีทั้ง 3 แฉบจากแผ่น TLC (a) รูปแบบของการดูดกลืนแสงและผลแมส สเปกโตรเมทรีของสารสีแถบที่ 1 (b) รูปแบบของการดูดกลืนแสงและผลแมส สเปกโตรเมทรีของสารสีแถบที่ 2 (c) รูปแบบของการดูดกลืนแสงและผลแมส สเปกโตรเมทรีของสารสีแถบที่ 3	37
5. แสดงลักษณะแกรมลบ รูปแท่ง ของแบคทีเรีย <i>Z. ganghwensis</i> PSU- KS-AAHRC MS2	38
6. Phylogenetic tree ของแบคทีเรีย <i>Z. ganghwensis</i> PSU-KSAAHRC MS2 ที่ทำการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน <i>16s rDNA</i> กับแบคทีเรีย <i>Z. ganghwensis</i> จากฐานข้อมูลใน GenBank ด้วยวิธี Neighbour Joining	38
7. แสดงผลของอุณหภูมิต่อการผลิตสารสี โพรดิจิโอะซินของแบคทีเรีย <i>Z. ganghwensis</i> PSU-KSAAHRC MS2	39
8. แสดงผลของค่าความเป็นกรด-ด่างต่อการผลิตสารสี โพรดิจิโอะซินของแบคทีเรีย <i>Z. ganghwensis</i> PSU-KSAAHRC MS2	40
9. แสดงอัตราการรอดของกุ้งขาวที่ติดเชื้อแบคทีเรีย <i>V. parahaemolyticus</i> หลังได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์	41
10. แสดงสีของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ หลังผ่านการต้มนาน 3 นาที	43

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
11. แสดงปริมาณเอนไซม์ไลโซไซม์ของกุ้งขาวที่ติดเชื้อแบคทีเรีย <i>V. parahaemolyticus</i> หลังได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์	44
12. แสดงปริมาณน้ำตาลในเลือดของกุ้งขาวที่ติดเชื้อแบคทีเรีย <i>V. parahaemolyticus</i> หลังได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์	45
13. แสดงปริมาณโปรตีนในน้ำเลือดของกุ้งขาวที่ติดเชื้อแบคทีเรีย <i>V. parahaemolyticus</i> หลังได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์	45
14. แสดงปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งขาวที่ติดเชื้อแบคทีเรีย <i>V. parahaemolyticus</i> หลังได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์	46
15. แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในกุ้งขาวที่ติดเชื้อแบคทีเรีย <i>V. parahaemolyticus</i> หลังได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์	46
16. แสดงกิจกรรมการจับกินสิ่งแปลกปลอมของกุ้งขาวที่ติดเชื้อแบคทีเรีย <i>V. parahaemolyticus</i> หลังได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์	47
17. แสดงดัชนีการจับกินสิ่งแปลกปลอมของกุ้งขาวที่ติดเชื้อแบคทีเรีย <i>V. parahaemolyticus</i> หลังได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์	47
18. แสดงค่าเฉลี่ยของเม็ดพลาสติกที่ถูกจับกินต่อเซลล์เม็ดเลือดกุ้งขาวที่ติดเชื้อแบคทีเรีย <i>V. parahaemolyticus</i> หลังได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์	48
19. แสดงกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสของกุ้งขาวที่ติดเชื้อแบคทีเรีย <i>V. parahaemolyticus</i> หลังได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์	49

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
20	แสดงกิจกรรมเอนไซม์ทริปซินของกึ่งขาวที่ติดเชื้อแบคทีเรีย <i>V. parahaemolyticus</i> หลังได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์	49
21.	แสดงกิจกรรมเอนไซม์โคโมทริปซินของกึ่งขาวที่ติดเชื้อแบคทีเรีย <i>V. parahaemolyticus</i> หลังได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์	50
22.	แสดงกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของกึ่งขาวที่ติดเชื้อแบคทีเรีย <i>V. parahaemolyticus</i> หลังได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์	50
23.	แสดงกิจกรรมของเอนไซม์คาตาเลสของกึ่งขาวที่ติดเชื้อแบคทีเรีย <i>V. parahaemolyticus</i> หลังได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์	51
24.	แสดงกิจกรรมของเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (GPx) ของกึ่งขาวที่ติดเชื้อแบคทีเรีย <i>V. parahaemolyticus</i> หลังได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์	51
25.	แสดงปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ของกึ่งขาวที่ติดเชื้อแบคทีเรีย <i>V. parahaemolyticus</i> หลังได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์	52
26.	แสดงเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนของกึ่งขาวที่ติดเชื้อแบคทีเรีย <i>V. parahaemolyticus</i> หลังได้รับอาหารสูตรควบคุม เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบการตายของท่อตับ (ด็อกจัน) และการหลุดลอกของเซลล์เยื่อบุท่อตับ ไม่พบ B-cell, F-cell และ R-cell (ครีซี) (H&E, bar = 50 μ m)	53

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
27	แสดงเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนของกึ่งขาวที่ติดเชื้อแบคทีเรีย <i>V. parahaemolyticus</i> หลังได้รับอาหารทดลองที่ผสมเซลล์แบคทีเรีย 1 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนค่อนข้างปกติ (H&E, bar = 50 μ m)	53
28.	แสดงเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนของกึ่งขาวที่ติดเชื้อแบคทีเรีย <i>V. parahaemolyticus</i> หลังได้รับอาหารทดลองที่ผสมเซลล์แบคทีเรีย 3 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบการตายของท่อตับ (ดอกจัน) และมีเม็ดเลือดแทรกตัวอยู่รอบๆ ท่อตับ (สรชี้) (H&E, bar = 50 μ m)	54
29.	แสดงเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนของกึ่งขาวที่ติดเชื้อแบคทีเรีย <i>V. parahaemolyticus</i> หลังได้รับอาหารทดลองที่ผสมเซลล์แบคทีเรีย 5 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบการตายของท่อตับ (ดอกจัน) และมีเม็ดเลือดแทรกตัวอยู่รอบๆท่อตับ (สรชี้) เป็นจำนวนมาก (H&E, bar = 50 μ m)	54

บทที่ 1

บทนำ

1.1 บทนำต้นเรื่อง

ฟองน้ำทะเลเป็นสัตว์หน้าดินที่มีการกินอาหารแบบกรองกิน จัดอยู่ในไฟลัมพอร์เฟอร่า (*Porifera*) แบ่งได้เป็น 4 ชั้น (classes) คือ Calcarea, Hexactinellida, Demospongiae และ Sclerospongiae มีการกระจายตัวอยู่ทั่วโลกและมีจำนวนมากกว่า 8,370 ชนิด ส่วนใหญ่เป็นฟองน้ำที่อาศัยอยู่ในทะเล มีบทบาทสำคัญคือช่วยกรองน้ำ ทำให้น้ำทะเลมีความสะอาดขึ้น เป็นที่อยู่อาศัยของสัตว์ทะเล และยังสามารถสร้างสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ปัจจุบันพบว่าจุลินทรีย์ที่แยกได้จากฟองน้ำทะเลมีคุณสมบัติในการผลิตสารสีธรรมชาติหลากหลายชนิด เช่น สารสีกลุ่มแคโรทีนอยด์ (carotenoid) ได้แก่แบคทีเรีย *Methylobacterium mesophilicum* ที่ผลิตแอสตาแซนทิน และแบคทีเรีย *Psychrobacter celer* ที่ผลิต ไดโนแซนทิน (dinoxanthin) นีโอแซนทิน (neoxanthin) และ ฟูโคแซนทิน (fucoxanthin) เป็นต้น (Thawornwiriyannun *et al.*, 2009; Jackson *et al.*, 2015; Abfa *et al.*, 2017) แคโรทีนอยด์เป็นสารสีธรรมชาติมีสีเหลืองหรือแดง ส้มเพราะได้จากพืช และจุลินทรีย์ ยกเว้นสัตว์ แคโรทีนอยด์ มีประโยชน์ต่างๆ มากมาย และมีการนำไปใช้เพื่อเพิ่มสีสันให้กับสัตว์น้ำ (Rao and Rao, 2007; Eldahshan and Singab, 2013) นอกจากนี้แคโรทีนอยด์แล้วยังมีสารสีธรรมชาติอีกชนิดที่สามารถพบได้ในเซลล์แบคทีเรียคือ โพรดิจีโอซิน (Prodigiosin) ซึ่งเป็นสารสีแดง ไม่ละลายน้ำ แต่จะละลายได้ในแอลกอฮอล์ อีเทอร์ คลอโรฟอร์ม เมทานอล และไดเมทิล ซัลโฟไซด์ (DMSO) สามารถพบโพรดิจีโอซินได้ในแบคทีเรีย *Serratia marcescens*, *Vibrio psychoerythrus* และ *Rugamonas rubra* เป็นต้น โพรดิจีโอซินเป็นสารสีธรรมชาติที่มีความสำคัญเนื่องจากมีคุณสมบัติในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อรา (Araújo *et al.*, 2010; Shaikh, 2016) สารสีชนิดนี้อาจนำมาใช้รักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อชนิดต่างๆ ในสัตว์น้ำเพื่อลดการใช้จ่ายปฏิชีวนะ ซึ่งจะ เป็นประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกุ้งขาว (*L. vannamei*) ซึ่งเป็นกุ้งที่นิยมเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายในประเทศไทย เนื่องจากเป็นกุ้งที่เลี้ยงง่าย โตเร็ว มีราคาสูง เป็นที่นิยมของผู้บริโภค ทำให้ปัจจุบันในประเทศไทยมีการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวเพิ่มมากขึ้น การเพาะเลี้ยงกุ้งขาวเป็นอุตสาหกรรมที่มีความสำคัญมากกับเศรษฐกิจของประเทศ เนื่องจากสร้างรายได้ให้กับเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยง สร้างอาชีพให้กับคนในประเทศ และทำรายได้ให้ประเทศปีละหลายล้านบาท งานวิจัยชิ้นนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารสีที่ผลิตจากแบคทีเรียที่แยกได้จากฟองน้ำทะเลต่อการเจริญเติบโต การเพิ่มสี และระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว เพื่อเป็นประโยชน์ทางด้านวิชาการ รวมทั้งด้านการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวให้แก่เกษตรกรต่อไปในอนาคต

1.2 การตรวจเอกสาร

1.2.1 กุ้งขาว (*L. vannamei*)

1. ชีววิทยาของกุ้งขาว

กุ้งขาว (*L. vannamei*) เป็นกุ้งสายพันธุ์หลักของทวีปอเมริกา ในธรรมชาติพบได้ตั้งแต่ชายฝั่งทะเลของประเทศเม็กซิโก สหรัฐอเมริกา จนถึงชายฝั่งทะเลของประเทศเปรู ซึ่งเป็นเขตที่มีอุณหภูมิประมาณ 26-28 องศาเซลเซียส มีความเค็มประมาณ 35 ส่วนในพัน กุ้งชนิดนี้มีลำตัวสีขาวโปร่งใส ขนาดลำตัวค่อนข้างใหญ่ถ้าเปรียบเทียบกับกุ้งชนิดอื่นๆ รังกายของกุ้งขาวแบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือส่วนของหัวและอก (cephalothorax) และท้อง (abdomen) อวัยวะส่วนใหญ่ของกุ้ง เช่น เหงือก หัวใจ ตับและตับอ่อน และกระเพาะอาหารอยู่บริเวณส่วนหัวและอก ลำไส้และอวัยวะสืบพันธุ์อยู่ส่วนท้อง มีตาเป็นแบบตาประกอบ (compound eyes) มีขาเดิน (pereiopods) 5 คู่ ขาวว่ายน้ำ (pleopods) 5 คู่ มีหนวด 2 คู่ คือคู่สั้น (antennules) และคู่ยาว (antennae) มีระบบรับความรู้สึก และมีระบบเลือดเป็นแบบเปิด (Bailey-Brock *et al.*, 1992; Hickman *et al.*, 2006 อ้าง โดย An, 2011) กุ้งชนิดนี้จัดจำแนกชนิดตามหลักอนุกรมวิธานดังนี้

Phylum Arthropoda

Class Crustacea

Order Decapoda

Family Penaeidae

Genus *Penaeus*

Subgenus *Litopenaeus*

Species *vannamei*

2. การสืบพันธุ์และวงจรชีวิตของกุ้งขาว

การสืบพันธุ์ของกุ้งขาวส่วนใหญ่เกิดในเวลากลางคืน โดยกุ้งเพศผู้สอดอวัยวะเพศที่เรียกว่าพีแทสมา (petasma) เข้าไปในอวัยวะเพศเมียที่เรียกว่าทีไลคัม (thelycum) ซึ่งอยู่ตรงบริเวณขาเดินคู่ที่ 4-5 และทำหน้าที่เก็บน้ำเชื้อเพื่อรอโอกาสผสมกับไข่ในภายหลัง โดยไข่ของกุ้งเพศเมียที่ผลิตได้มีจำนวนประมาณ 1,000,000 ฟองต่อตัว เมื่อไข่แก่ และสุกเต็มที่จะถูกปล่อยออกมาจากช่องเพศบริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 3 และจะได้รับการผสมกับน้ำเชื้อเพศผู้ซึ่งขับออกจากถุงเก็บน้ำเชื้อทางรูเปิดเล็กๆ บริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 4-5 ของเพศเมีย ไข่จะเกิดการปฏิสนธิในน้ำแล้วค่อยๆ จมลงสู่พื้น เนื่องจากเป็นไข่จม ไข่กุ้งจะฟักเป็นตัวภายในเวลา 16 ชั่วโมงหลังการปฏิสนธิ และพัฒนาระยะตัวอ่อนในทะเล โดยไข่ของกุ้งที่ฟักเป็นตัวจะพัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะนอเพเลียส (nauplius) 6 ระยะ ระยะโปรโตซัว (protozoa) 3 ระยะ และระยะไมซิส (mysis) 3 ระยะ ลูกกุ้งในระยะเหล่านี้จะดำรงชีวิตเป็นแพลงก์ตอนสัตว์ เมื่อเข้าสู่ระยะโพสท์ลาร์วาจะอพยพเข้ามาอาศัยบริเวณปากแม่น้ำหรือป่าชายเลน และจะอาศัยอยู่บริเวณนี้เป็นเวลา 2-3 เดือน กุ้งที่โตเต็มวัยจะอพยพกลับสู่ทะเลเพื่อพัฒนาความสมบูรณ์เพศเป็นพ่อแม่พันธุ์ต่อไป (ธนพงศ์, 2546; An, 2011)

3. การเพาะเลี้ยงกุ้งขาว

กุ้งขาวเป็นกุ้งที่มีศักยภาพในการเพาะเลี้ยงสูง การเจริญเติบโตค่อนข้างดี โตได้อย่างรวดเร็ว ใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงเพียง 3-4 เดือน การเพาะเลี้ยงกุ้งขาวในปัจจุบันนิยมเลี้ยงในบ่อดินซึ่งอาจเป็นบ่อที่มีการปูด้วยผ้าโพลีเอทิลีนหรือไม่ปูก็ได้ การปล่อยกุ้งลงเลี้ยงจะปล่อยที่อัตราส่วน 100,000-150,000 ตัว/ไร่ อาหารที่ให้ให้เป็นอาหารสำเร็จรูป ควรมีโปรตีนอยู่ในระดับ 35-40 เปอร์เซ็นต์ การให้อาหารในระบบการเลี้ยงแบบพัฒนาจะให้อาหารกุ้งตลอดทั้งวัน ยกเว้นตอนกลางคืนจะไม่ให้อาหาร คุณภาพน้ำที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงกุ้งขาว อุณหภูมิควรอยู่ในช่วง 28-32 องศาเซลเซียส ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำไม่ควรต่ำกว่า 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเป็นกรดค้างอยู่ในช่วง 7.5-8.0 ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ไม่เกิน 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเค็มอยู่ในช่วง 2-35 ส่วนในพันส่วน ความกระด้างของน้ำไม่ต่ำกว่า 150 มิลลิกรัมต่อลิตร ของ CaCO_3 ความเป็นด่างไม่ต่ำกว่า 100 มิลลิกรัมต่อลิตรของ CaCO_3 ความโปร่งแสงของน้ำอยู่ในช่วง 20-40 เซนติเมตร แอมโมเนียอิสระไม่เกิน 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ไนไตรท์ไม่เกิน 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ

ไฮโดรเจนซัลไฟด์ไม่เกิน 0.002 มิลลิกรัมต่อลิตร ในช่วงการเลี้ยงควรมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำและกำจัดตะกอนเลนกันบ่อเพื่อกำจัดของเสียที่อยู่ในบ่อ และควรมีการป้องกันศัตรูและพาหะนำโรคของกุ้ง (พุทธ, 2557)

4. โรคในกุ้งขาว

ปัญหาเรื่องโรคที่เกิดขึ้นในการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวของประเทศไทยนั้นต้องการการจัดการควบคุมเป็นอย่างดีเพราะส่งผลกระทบต่อระบบการผลิต และผลผลิตของกุ้งขาว ซึ่งโรคสำคัญที่พบได้ในระหว่างการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวในปัจจุบันได้แก่

4.1 โรคตัวแดงดวงขาว (White spot syndrome)

เป็นโรคที่มีความรุนแรงสูงเนื่องจากกุ้งที่ป่วยด้วยโรคนี้อาจมีอัตราการตายถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังจากได้รับเชื้อ 3-10 วัน โรคตัวแดงดวงขาวมีสาเหตุมาจากไวรัสที่มีสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอ คือไวรัสชนิด White spot syndrome virus มีรายงานการระบาดของโรคตัวแดงดวงขาวในกุ้งครั้งแรกเมื่อประมาณปีพุทธศักราช 2535-2536 บริเวณแถบเอเชีย และอินโดนีเซีย โดยอาการของกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสชนิดนี้จะมีอาการเซื่องซึม กินอาหารลดลง มีลำตัวสีแดง มีจุดขาวใต้เปลือกลักษณะค่อนข้างกลมซึ่งเกิดจากความผิดปกติของการสะสมแคลเซียมในผิวหนังชั้น อีพิเดอ-มิส ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5-2.0 มิลลิเมตร จึงเรียกโรคชนิดนี้ว่า โรคตัวแดงดวงขาว (Lightner, 1996 อ้างโดย นเรศ, 2555)

4.2 โรค Hepatopancreatic microsporidiosis

โรค Hepatopancreatic microsporidiosis มีสาเหตุจากเชื้อ *Enterocytozoon hepatopenaei* หรือ EHP ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวจำพวกเชื้อรา หรือที่รู้จักกันในชื่อ ไมโครสปอริเดีย ปัจจุบัน EHP ส่งผลกระทบต่อ การเพาะเลี้ยงกุ้งขาวอย่างมาก เนื่องจากทำให้กุ้งที่เลี้ยงเจริญเติบโตช้า พบการแพร่ระบาดของโรคนี้ได้ทั้งในประเทศอินเดีย เวียดนาม และประเทศไทย (Rajendran *et al.*, 2016) มีรายงานการพบเชื้อ EHP ครั้งแรกในกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในประเทศไทย (Tourtip *et al.*, 2009) เซลล์มีรูปร่างเป็นวงรี ขนาดประมาณ 0.7 -11 ไมโครเมตร สามารถเจริญเติบโต และสร้างสปอร์ภายในเซลล์ของเจ้าบ้าน ในกุ้งสามารถพบเชื้อ EHP ได้ภายในเซลล์ตับ และตับอ่อนของกุ้งส่งผลให้กุ้งมีลักษณะอาการที่เรียกว่า ขี้ขาว ซึ่งภายในอุจจาระที่มีลักษณะสีขาวนั้นจะประกอบไปด้วย สปอร์ของเชื้อ EHP และเซลล์ของท่อตับและตับอ่อนที่หลุดลอกออกมา (Tourtip *et al.*, 2009; Tang *et al.*, 2016)

4.3 โรคตับและตับอ่อนวายเฉียบพลัน (Acute hepatopancreatic necrosis disease: AHPND)

โรคตับและตับอ่อนวายเฉียบพลันหรือในอดีตเรียกว่าโรคตายด่วน (Early mortality syndrome: EMS) เป็นโรคที่สร้างความเสียหายอย่างหนักต่อการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวในประเทศไทย พบการระบาดของโรคนี้นี้ครั้งแรกเมื่อประมาณปีพุทธศักราช 2554-2555 และส่งผลกระทบต่อปริมาณจนถึงปัจจุบัน โรคนี้นี้ทำให้กุ้งที่เลี้ยงมีอัตราการตายถึง 100 เปอร์เซ็นต์ โดยลักษณะอาการที่สำคัญของกุ้งที่ติดเชื้อชนิดนี้คือ ตับและตับอ่อนมีสีซีด ตับเหนียว และภายในลำไส้ไม่มีอาหาร ลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนของกุ้งที่ติดเชื้อชนิดนี้ มีการหลุดลอกของเซลล์ที่ตับและตับอ่อน ท่อตับตาย และมีเม็ดเลือดแทรกตัวรอบๆท่อตับที่ตาย (Lai *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2017) สาเหตุของโรค AHPND เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่พบปนเปื้อนในอาหารทะเลหลายชนิดเช่น หมึก หอยนางรม กุ้ง และหอยแมลงภู่ และเป็นสาเหตุของการเกิดโรคอาหารเป็นพิษในมนุษย์ แบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง ต้องการเกลือในการเจริญเติบโต สามารถผลิตเอนไซม์ออกซิเดส เอนไซม์คาตาเลส แต่ไม่สร้างเอนไซม์ยูรีเอส เจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulphate citrate bilesalt sucrose agar มีโคโลนีสีเขียว เจริญบนอาหาร CHROMagar มีโคโลนีสีม่วง และสามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 42 องศาเซลเซียส (สุริย์ และคณะ 2556)

1.2.2 ฟองน้ำ

1. ชีววิทยาของฟองน้ำ

ฟองน้ำทะเลเป็นสัตว์ในกลุ่มเมตาซัว (Metazoan) เก่าแก่ที่สุดที่ยังหลงเหลืออยู่ ซากดึกดำบรรพ์ของฟองน้ำที่พบมีอายุเกือบ 630 ล้านปี ฟองน้ำมีการกระจายตัวอยู่ทั่วโลกและมีหลากหลายชนิดมากหากเปรียบเทียบกับสัตว์หน้าดินชนิดอื่นๆ ซึ่งในฐานข้อมูลพบว่าจำนวนชนิดของฟองน้ำทั่วโลกมีมากกว่า 8,370 ชนิด ส่วนใหญ่เป็นฟองน้ำที่อาศัยอยู่ในทะเล มีเพียงประมาณ 150 ชนิดที่อาศัยอยู่ในน้ำจืด รูปร่างลักษณะของฟองน้ำมีความแตกต่างกันไป ส่วนใหญ่เป็นรูปทรงกระบอกและแตกแขนง ซึ่งโครงสร้างของฟองน้ำจะจัดเรียงตัวเป็นชั้นเซลล์ 2 ชั้นคือ พินาโคเดิร์ม (pinacoderm) เป็นชั้นเซลล์ด้านนอกมีเซลล์ลักษณะแบบหลายเหลี่ยมเรียงต่อกัน เรียกเซลล์ชนิดนี้ว่า พินาโคไซต์ (pinacocyte) และโคเอโนเดิร์ม (choanoderm) เป็นชั้นเซลล์ด้านในประกอบด้วยเซลล์โคเอโนไซต์ (choanocyte) เรียงตัวอยู่ภายในลำตัวของฟองน้ำ มีหน้าที่ในการกิน

อาหารโดยการดักจับสารอินทรีย์ด้วยเมือกและ โบกพัดน้ำ ระหว่างชั้นพินาโคเดิร์ม และโคเอโนเดิร์มมีชั้นวุ้นแทรกอยู่ เรียกชั้นนี้ว่า มีโซฮิว (mesohyl) มีเซลล์แบบอะมีบาเคลื่อนที่อยู่ภายในทำหน้าที่หลากหลาย เช่น สร้างเซลล์สืบพันธุ์ สร้างโครงร่างค้ำจุนร่างกาย เป็นต้น

บทบาทสำคัญของฟองน้ำคือช่วยกรองน้ำ ทำให้น้ำทะเลมีความสะอาดขึ้น ช่วยกำจัดตะกอนขนาดเล็กและลดปริมาณตะกอนในน้ำทะเล เป็นที่อยู่อาศัยหลบภัยของสัตว์ทะเล และเกี่ยวข้องกับการหมุนเวียนธาตุอาหารในทะเล ซึ่งเป็นแหล่งของอินทรีย์ใน ไตรเจนที่ละลายน้ำ อินทรีย์ใน ไตรเจนที่ละลายน้ำ และอินทรีย์คาร์บอนละลายน้ำ เป็นต้น ฟองน้ำสามารถแบ่งได้เป็น 4 ชั้น (classes) (บพิท และนันทพร, 2547; Jackson *et al.*, 2015) คือ

1. ชั้น Calcarea เป็นฟองน้ำที่มีสปิคูล (spicule) เป็นหินปูนลักษณะแข็งเปราะ
2. ชั้น Hexactinellida เป็นฟองน้ำที่มีสปิคูลเป็นสารประกอบพวกซิลิกา
3. ชั้น Demospongiae เป็นฟองน้ำที่มีสปิคูลเป็นซิลิกาผสมไฮโปรตีน
4. ชั้น Sclerospongiae เป็นฟองน้ำที่สปิคูลเป็นซิลิกาและเส้นใยโปรตีน แต่จะมีหินปูนพอกอยู่ที่ฐานของตัวฟองน้ำ และภายนอกจะมีหินปูนชั้นบางๆหุ้มอยู่

2. การสืบพันธุ์ของฟองน้ำ

ฟองน้ำสืบพันธุ์ได้ทั้งแบบอาศัยเพศ และไม่อาศัยเพศ การสืบพันธุ์แต่ละแบบมีลักษณะดังนี้

การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ มี 2 ลักษณะได้แก่ การแตกหน่อ ฟองน้ำจะมีหน่อที่แตกออกมาจากตัวเดิมแล้วหลุดออกไปหาที่เกาะใหม่ หรืออาจอยู่กับตัวเดิมจนเป็นกลุ่มใหญ่ก็ได้ และการสร้างเจมมูล (gemmule) โดยเจมมูลมีลักษณะคล้ายแคปซูลที่ภายในบรรจุจะมีบอไซต์ (amoebocyte) ไว้ เจมมูลจะถูกปลดปล่อยออกมาในตอนที่ตัวเดิมตายหรือสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม และเมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมจะสามารถเจริญเติบโตเป็นตัวใหม่ต่อไป

การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ โดยปกติฟองน้ำมีเพศรวมแต่ไม่มีการผสมภายในตัวเองเนื่องจากการสร้างเซลล์ไข่และอสุจิไม่พร้อมกัน ทำให้ไม่สามารถผสมภายในตัวเองได้ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นการผสมกับตัวอื่น โดยเริ่มจากเซลล์แบบอะมีบาในชั้นมีโซฮิวที่สามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นทั้งเซลล์ไข่และอสุจิ เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นอสุจิจะถูกปลดปล่อยออกทางระบบ

หมูนเวียนน้ำในตัวแล้วเข้าสู่ฟองน้ำตัวอื่น อสุจิจะผสมกับเซลล์ไข่เกิดการปฏิสนธิภายในตัวและเจริญเป็นตัวอ่อน หลังจากนั้นตัวอ่อนจะออกจากตัวแม่ตามกระแสเลือดไปหาที่ยึดเกาะใหม่และเจริญเติบโตต่อไป (ศิริเพ็ญ, 2550)

3. ฟองน้ำทะเลในประเทศไทย

ฟองน้ำทะเลที่พบในประเทศไทยส่วนใหญ่จะเป็นฟองน้ำในชั้น Demospongiae ซึ่งเป็นกลุ่มของฟองน้ำที่มีสปicules เป็นซิลิกาผสมเส้นใยโปรตีน ตัวอย่างชนิดของฟองน้ำทะเลที่พบในประเทศไทยแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ตัวอย่างชนิดฟองน้ำทะเลที่พบในประเทศไทย

Species	Locality
<i>Paratetilla bacca</i>	เกาะโลซิน ปัตตานี, หมู่เกาะสุรินทร์ พังงา
<i>Paratetilla</i> sp.	เกาะโลซิน ปัตตานี, หมู่เกาะสุรินทร์ พังงา
<i>Spheciospongia congenera</i>	หมู่เกาะกระ นครศรีธรรมราช, เกาะโลซิน ปัตตานี
<i>Monanchora unguiculata</i>	หมู่เกาะกระ นครศรีธรรมราช, เกาะโลซิน ปัตตานี
<i>Gelliodes</i> sp.	หมู่เกาะกระ นครศรีธรรมราช, เกาะโลซิน ปัตตานี
<i>Oceanapia sagittaria</i>	หมู่เกาะกระ นครศรีธรรมราช, เกาะโลซิน ปัตตานี, หมู่เกาะสุรินทร์ พังงา
<i>Neopetrosia exigua</i>	เกาะโลซิน ปัตตานี
<i>Xestospongia testudinaria</i>	หมู่เกาะกระ นครศรีธรรมราช, เกาะโลซิน ปัตตานี
<i>Hyrtios</i> sp.	หมู่เกาะกระ นครศรีธรรมราช, เกาะโลซิน ปัตตานี
<i>Pseudoceratina</i> sp.	หมู่เกาะกระ นครศรีธรรมราช, เกาะโลซิน ปัตตานี
<i>Plakina</i> sp.	หมู่เกาะกระ นครศรีธรรมราช
<i>Rhabdastrella</i> sp.	หมู่เกาะกระ นครศรีธรรมราช
<i>Clathria</i> sp.	หมู่เกาะกระ นครศรีธรรมราช, หมู่เกาะสุรินทร์ พังงา
<i>Haliclona</i> sp.	หมู่เกาะกระ นครศรีธรรมราช, หมู่เกาะสุรินทร์ พังงา
<i>Stylissa</i> sp.	หมู่เกาะสุรินทร์ พังงา
<i>Petrosia</i> sp.	หมู่เกาะสุรินทร์ พังงา

ที่มา: คมสัน และสุเมตต์ (2553); คมสัน และคณะ(2554); คมสัน และสุเมตต์ (2556)

4. ประโยชน์ของฟองน้ำทะเล

ฟองน้ำมีประโยชน์ต่างๆ มากมาย เช่น เป็นที่อยู่อาศัย และหลบภัยของสัตว์น้ำชนิดต่างๆ ช่วยกรองกินสารอินทรีย์ที่อยู่ในมวลน้ำ ทำให้น้ำใส ในเชิงการค้าสามารถสร้างรายได้และอาชีพจากการเพาะเลี้ยงฟองน้ำตุ้ม และ เป็นแหล่งท่องเที่ยวดำน้ำแก่นักท่องเที่ยว ปัจจุบันมีการศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับประโยชน์ของฟองน้ำอย่างแพร่หลาย เช่น กุทริรงค์ และ พันธุ์ทิพย์ (2549) พบว่าสารสกัดจากฟองน้ำทะเลที่เก็บตัวอย่างได้จากบริเวณหมู่เกาะช้าง จังหวัดตราด จำนวน 14 ชนิดจากทั้งหมด 19 ชนิด มีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรีย *Enterococcus faecalis*, *Rolstonia solanaceum*, *Vibrio cholerae* และ *Vibrio fluvialis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ก่อโรคในมนุษย์ ฟิช และ กุ้งทะเล และ สารสกัดบางชนิดยังยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus niger*, *Microsporium gypseum* และ *Trichophyton mentagrophyte* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ต่างๆ ได้แล้ว สารสกัดจากฟองน้ำยังสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้อีกด้วย การศึกษาของ Chairman และคณะ (2012) พบว่าสารสกัดจากฟองน้ำ *Rhabdastrella globostellata* และ *Spirastrella inconstans* สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งปากมดลูกของมนุษย์ และ เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนูได้

5. การแยกเชื้อแบคทีเรียจากฟองน้ำทะเล

การแยกเชื้อแบคทีเรียจากฟองน้ำทะเลสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การนำตัวอย่างฟองน้ำที่ต้องการแยกเชื้อแบคทีเรียมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำทะเลปลอดเชื้อ จากนั้นตัดตัวอย่างฟองน้ำให้ได้ขนาดประมาณ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ใส่ในหลอดที่มีน้ำทะเลปลอดเชื้อ 5 มิลลิลิตร บดตัวอย่างให้ละเอียด คูดสารละลายที่ได้ไปเจือจางให้ได้ความเจือจาง 100, 1,000 และ 10,000 เท่า คูดตัวอย่างแต่ละความเจือจางมาปริมาตร 100 ไมโครลิตร เกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Marine agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 2-3 วัน คัดแยกแบคทีเรียจากลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกัน เช่น สี รูปร่าง ขนาด เป็นต้น (กุทริรงค์ และคณะ, 2548) และการแยกเชื้อแบคทีเรียจากฟองน้ำทะเล *Spongia officinalis* Linnaeus, 1759 โดยการนำตัวอย่างฟองน้ำขนาดประมาณ 30 ลูกบาศก์เซนติเมตร มาบิบบด้วยแท่งแก้วแล้วคูดสารละลายที่ได้มา 1 มิลลิลิตร นำไปเจือจางให้ได้ความเจือจาง 10, 100 และ 1,000 เท่า คูดตัวอย่างแต่ละความเจือจางมา 1 มิลลิลิตร ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ 15 มิลลิลิตรในงานเพาะเชื้อ ที่มีอาหาร Nutrient agar และ MacConkey agar จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อนำแบคทีเรียทั้งหมดที่แยกได้จากฟองน้ำชนิดนี้ไปจำแนกชนิดโดยอาศัยคุณสมบัติทางชีวเคมีสามารถจำแนกชนิดได้เป็น *Escherichia*, *Morganella*, *Proteus*,

Pasteurella, *Aeromonas*, *Pseudomonas* และ *Acinetobacter* (Kefalas *et al.*, 2003) และยังมีแบคทีเรีย *Streptomyces* sp., *Salinobacter* sp., *Roseobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Vibrio* sp., *Micromonospora* sp., *Saccharomonospora* sp. และ *Alteromonas* sp. ที่พบในฟองน้ำทะเลชนิด *Fasciospongia cavernosa* (Selvin *et al.*, 2009) นอกจากนี้พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากฟองน้ำทะเล ยังมีคุณสมบัติในการสร้างสารสีพวกแคโรทีนอยด์ เมื่อนำมาจำแนกชนิดโดยอาศัยเทคนิคทางชีวโมเลกุลพบว่า เป็นแบคทีเรีย *Sphingomonas natatoria* และ *Sphingomonas phyllosphaerae* ที่สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ชนิดซีแซนทีน (zeaxanthin) ได้ดีบนอาหาร modified Zobell medium (วรพจน์ และ ลีณา, 2553) ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้เพื่อให้เกิดประโยชน์ในด้านต่างๆ ได้

1.2.3 สารสีในธรรมชาติ

เม็ดสี หรือ รงควัตถุ เป็นสารประกอบทางเคมีที่ดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นที่ตาสามารถมองเห็นได้ ซึ่งเม็ดสีจะทำให้เกิดสีต่างๆ ในสิ่งมีชีวิตที่เราพบเห็นอยู่ทั่วไป เนื่องจากเม็ดสีมีการสะสมอยู่ในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ บนโลก โดยพืชเป็นผู้ผลิตหลักและเก็บสะสมเม็ดสีไว้ในส่วนของใบ ดอก และผล เป็นต้น และยังสามารถพบได้ในผิวหนัง หรือขน ของสัตว์ชนิดต่างๆ นอกจากนี้ยังพบได้ในยีสต์ รา และแบคทีเรีย ปัจจุบันสีที่พบในธรรมชาติไม่เพียงแต่ใช้ในการย้อมเสื้อผ้าเพียงเท่านั้น เพราะสารสีบางชนิดสามารถนำไปใช้ประโยชน์ด้านการแพทย์ เนื่องจากมีคุณสมบัติในการป้องกันโรค สารสีบางชนิดเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญของวิตามินที่ร่างกายต้องการ และยังสามารถนำไปใช้ในการประกอบอาหารหรือใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง และสีย้อมวัสดุต่างๆ ที่มีความปลอดภัย ไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ สารสีที่สามารถพบได้ในธรรมชาติมีหลากหลายชนิด (Vargas *et al.*, 2000) เช่น

1. แอนโทไซยานิน

แอนโทไซยานิน เป็นสารประกอบที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ จัดอยู่ในกลุ่มของฟลาโวนอยด์ มีสีส้ม แดง ม่วง หรือน้ำเงิน สามารถเปลี่ยนแปลงสีได้ตามค่าความเป็นกรดด่าง หากอยู่ในสภาวะที่เป็นกรดจะมีสีแดง สภาวะที่เป็นกลางมีสีม่วง และสภาวะที่เป็นด่างมีสีน้ำเงิน การเปลี่ยนแปลงสีเกิดจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของแอนโทไซยานินในสภาวะความเป็นกรดด่าง

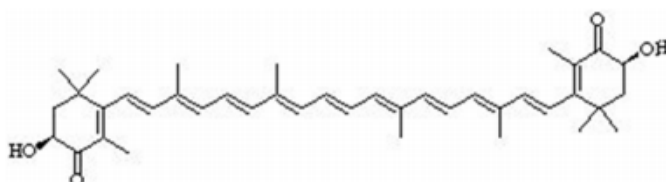
ต่างๆ โครงสร้างของแอนโทไซยานินประกอบด้วยสารประกอบ 2 หรือ 3 ชนิดคือ แอนโทไซยานิดิน น้ำตาล และกรด โดยกรดเป็นส่วนประกอบที่อาจจะมีหรือไม่มีก็ได้ขึ้นอยู่กับชนิดของแอนโทไซยานิน สารสีชนิดนี้สามารถพบได้ในส่วนต่างๆ ของพืชเช่น ลำต้น ใบ ดอก ผล ราก และมีส่วนช่วยป้องกันการทำลายจากรังสี UV ให้กับพืช โดยชื่อของสารสีชนิดนี้เป็นการรวมคำสองคำในภาษากรีกคือ Anthos แปลว่าดอกไม้ และ Kyanos แปลว่าสีน้ำเงิน เข้าด้วยกันเป็นคำว่า แอนโทไซยานิน (Anthocyanin) ซึ่งสารสีชนิดนี้เป็นสารที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพของมนุษย์ และมีรายงานเกี่ยวกับประโยชน์ของแอนโทไซยานินมากมาย เช่น มีคุณสมบัติในการลดการอักเสบ เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ช่วยรักษาอาการของโรคหลอดเลือดหัวใจ และโรคมะเร็งเป็นต้น (Pervaiz *et al.*, 2017)

2. แคโรทีนอยด์

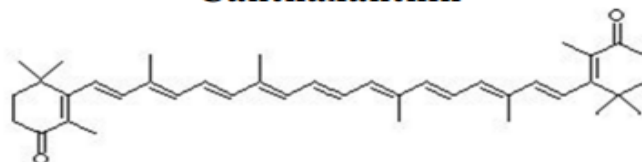
แคโรทีนอยด์เป็นสารสีที่มีความสำคัญชนิดหนึ่ง มีสีแดง ส้ม หรือเหลือง ไม่ละลายน้ำแต่ละลายได้ดีในไขมัน เป็นสารตั้งต้นที่ร่างกายสามารถนำไปใช้ในการสังเคราะห์วิตามินเอได้ และมีบทบาทในการกำหนดคุณภาพของผัก ผลไม้ ปลา และกุ้ง ส่วนใหญ่พบแคโรทีนอยด์ได้ในพืช สัตว์น้ำ และแบคทีเรียสังเคราะห์แสง นอกจากนี้อาจจะพบได้ในยีสต์ รา และสัตว์บางชนิด ปัจจุบันมีแคโรทีนอยด์ที่ทราบชนิดแล้วประมาณ 600 ชนิด โดยอาศัยเทคนิคสมัยใหม่ เช่นการใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) ในการจำแนกชนิดของแคโรทีนอยด์ แต่ยังมีแคโรทีนอยด์ในธรรมชาติอีกหลายชนิดที่ยังไม่ถูกค้นพบ สัตว์ส่วนใหญ่ไม่สามารถสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ได้ แต่จะได้รับจากอาหารที่มีแคโรทีนอยด์ผสมอยู่ และสัตว์จะเก็บสะสมไว้ในส่วนต่างๆ ของร่างกาย เช่น ไข่ กล้ามเนื้อ และเปลือก (Garbanzo *et al.*, 2011; Eldahshan and Singab, 2013) แคโรทีนอยด์ส่วนใหญ่เป็นสารประกอบในกลุ่มเทอร์พีน (terpene) ที่มีจำนวนคาร์บอน 40 อะตอม ประกอบด้วยหน่วยไอโซพรีน (isoprene units) 8 หน่วยต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะคู่คอนจูเกต (conjugated double bonds) ซึ่งมีความสามารถในการดูดกลืนแสง ทำหน้าที่เสมือนโครโมฟอร์ (chromophore) หากมีพันธะคู่ชนิดนี้อยู่มากจะทำให้แคโรทีนอยด์ชนิดนี้มีสีแดงเข้ม แคโรทีนอยด์สามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิดคือ แคโรทีน (carotene) เป็นกลุ่มที่ประกอบด้วยคาร์บอนและไฮโดรเจนเท่านั้น และแซนโทฟิลล์ (xanthophyll) เป็นกลุ่มที่

ประกอบด้วยคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน (บุษบา, 2542) ลักษณะโครงสร้างของแคโรทีนอยด์ชนิดต่างๆ แสดงในภาพที่ 1

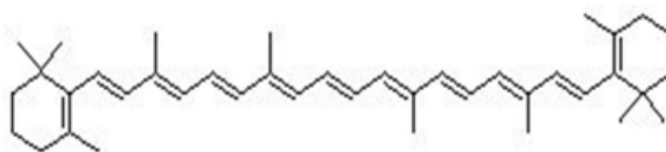
Astaxanthin



Canthaxanthin



β-Carotene



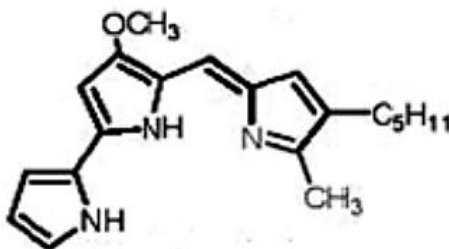
ภาพที่ 1 แสดงโครงสร้างของแคโรทีนอยด์ชนิดต่างๆ

ที่มา: Eldahshan และ Singab (2013)

3. โพรดิจีโอซิน (prodigiosin)

โพรดิจีโอซินเป็นสารสีธรรมชาติที่มีสีแดง และเป็นสารเมแทบอลิท์ทุติยภูมิ กลุ่มอัลคาลอยด์ โครงสร้างทางเคมีมีลักษณะเป็นวงแหวนไพโรล (pyrrole) สามวงต่อกัน เกิดจากการรวมตัวของโมนไพโรล (monopyrrole) และไบไพโรล (bipyrrrole) (ภาพที่ 2) (Giri *et al.*, 2004) โดยสารตั้งต้นที่สำคัญในการสังเคราะห์โพรดิจีโอซินคือ อะซิเตท (acetate) ซีรีน (serine) แอลานีน (alanine) เมไทโอนีน (methionine) และ โพรลีน (proline) (Shaikh, 2016) มีสูตรทางเคมีคือ $C_{20}H_{25}N_3O$ และมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 323.44 คาลตัน เป็นสารสีที่มีความไวต่อแสง ไม่ละลายน้ำ แต่จะละลายได้ในแอลกอฮอล์ อีเทอร์ คลอโรฟอร์ม เมทานอล และไดเมทิล ซัลโฟไซด์ (DMSO) สามารถพบโพรดิจีโอซินได้ในแบคทีเรียหลากหลายชนิด เช่น *S. marcescens*, *Pseudomonas*

magnesorubra, *Vibrio psychroerythrous*, *Serratia rubidaea*, *Vibrio gazogenes*, *Alteromonas rubra* และ *Rugamonas rubra* เป็นต้น (Araújo *et al.*, 2010; Darshan and Manonmani, 2015)



ภาพที่ 2 แสดง โครงสร้างของโปรติจีโอซิน

ที่มา: Araújo และคณะ (2010)

3.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตโปรติจีโอซินของแบคทีเรีย

ปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อการผลิตโปรติจีโอซินของแบคทีเรียมีหลายอย่าง ได้แก่ องค์ประกอบอาหารที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรีย อุณหภูมิ และ ค่าความเป็นกรดด่าง (Williamson *et al.*, 2005) อาหารเหลวที่นิยมนำมาใช้เลี้ยงแบคทีเรียที่ผลิตโปรติจีโอซินคือ nutrient broth และ peptone glycerol broth การทดลองเลี้ยงแบคทีเรีย *Serratia* spp. ด้วยอาหารที่แตกต่างกัน 3 ชนิดคือ nutrient broth, peptone glycerol broth และ พงเมล็ดงาละลายน้ำ (sesame seed broth) พบว่าแบคทีเรียที่เลี้ยงด้วยพงเมล็ดงาละลายน้ำสามารถผลิตโปรติจีโอซินได้สูงสุด 16.68 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่แบคทีเรียที่เลี้ยงด้วยอาหาร nutrient broth และ peptone glycerol broth ผลิตโปรติจีโอซินได้เพียง 0.52 และ 0.302 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แต่เมื่อเปรียบเทียบการผลิตโปรติจีโอซินของแบคทีเรีย *Serratia* spp. ที่เจริญในพงเมล็ดงาละลายน้ำ พงถั่วลิสงละลายน้ำ (Peanut seed broth) และ พงเนื้อมะพร้าวละลายน้ำ (Copra seed broth) พบว่าแบคทีเรียที่เจริญในพงถั่วลิสงละลายน้ำสามารถผลิตโปรติจีโอซินได้สูงสุด 38.75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Giri *et al.*, 2004) และการทดลองเสริมแหล่งของคาร์บอนซึ่งได้แก่น้ำตาล แลคโตส มอลโทส ซูโครส แมนนิโทส ฟรุคโตส และ กลูโคส ลงในอาหาร peptone glycerol broth พบว่าน้ำตาลมอลโทสมีส่วนช่วยให้แบคทีเรีย *S. marcescens* สามารถผลิตโปรติจีโอซินเพิ่มสูงขึ้นกว่าน้ำตาลชนิดอื่นๆ (Gulani *et al.*, 2012) นอกจากนี้การใช้เลี้ยงแบคทีเรียจะมีผลต่อการผลิตโปรติจีโอซินแล้ว อุณหภูมิที่แตกต่างกันยังมี

ผลต่อการผลิตโพรดิจิโอซินเช่นเดียวกัน การศึกษาการผลิตสารโพรดิจิโอซินของแบคทีเรีย *S. marcescens* ที่อุณหภูมิ -20, 0, 27, 37 และ 50 องศาเซลเซียส พบว่าแบคทีเรียสามารถผลิตโพรดิจิโอซินได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส แต่เมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นเป็น 37 องศาเซลเซียส แบคทีเรียชนิดนี้จะไม่สามารถผลิตสารโพรดิจิโอซินได้ (Shaikh, 2016) เช่นเดียวกับการรายงานของ Giri และคณะ (2004) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตโพรดิจิโอซินของแบคทีเรีย *Serratia* spp. คือ 28 องศาเซลเซียส และอีกปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตโพรดิจิโอซินของแบคทีเรียคือค่าความเป็นกรดด่าง ซึ่งการศึกษาของ Shaikh (2016) พบว่าแบคทีเรีย *S. marcescens* สามารถผลิตโพรดิจิโอซินได้ดีที่สุดที่ค่าความเป็นกรดด่าง 7.5 และ Sundaramoorthy และคณะ (2009) รายงานว่าค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการผลิตโพรดิจิโอซินของ *S. marcescens* คือค่าความเป็นกรดด่าง 7

3.2 ความเป็นพิษของโพรดิจิโอซิน

การศึกษาความเป็นพิษของโพรดิจิโอซินต่อเซลล์โดยการนำโพรดิจิโอซินที่ความเข้มข้นระดับต่างๆตั้งแต่ 2-30 ไมโครโมลาร์ บ่มร่วมกับเซลล์ทดสอบคือเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของหนู (V79 fibroblast cell line) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตด้วยวิธีนิวคลีอิก แอซิด คอนเทนต์ (Nucleic acid content: NAC) พบว่าความเข้มข้นของโพรดิจิโอซินที่ทำให้เซลล์ไฟโบรบลาสต์ตายครึ่งหนึ่ง (IC_{50}) มีค่าเท่ากับ 20 ไมโครโมลาร์ (Melo *et al.*, 2000) เช่นเดียวกับการทดลองของ Lapenda และคณะ 2014 ที่ได้ศึกษาความเป็นพิษของโพรดิจิโอซินต่ออาร์ทีเมีย (*Artemia salina*) โดยการนำอาร์ทีเมียมาเลี้ยงในโพรดิจิโอซินที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ 100, 50, 20, 5 และ 2.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมานับจำนวนอาร์ทีเมียที่มีชีวิตและอาร์ทีเมียที่ตาย พบว่าความเข้มข้นของโพรดิจิโอซินที่ทำให้อาร์ทีเมียตายครึ่งหนึ่งคือ 78.33 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.3 ความเสถียรต่ออุณหภูมิของโพรดิจิโอซิน

ปัจจุบันโพรดิจิโอซินเริ่มเป็นที่รู้จักกันอย่างแพร่หลาย ซึ่งข้อมูลเกี่ยวกับการทนต่อความร้อนของสารชนิดนี้ค่อนข้างมีประโยชน์ต่อการทดลองและวิจัยเป็นอย่างมาก จากการทดลองของ Park และคณะ (2012) รายงานว่าโพรดิจิโอซินที่ละลายอยู่ในตัวทำละลายอะซิโตนและ เอทานอล ที่เก็บรักษาไว้ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถเก็บรักษาไว้ได้นาน 30 วัน โดย

ปริมาณโพรดิจิโอซินลดลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น แต่โพรดิจิโอซินที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 วัน กลับทำให้ปริมาณโพรดิจิโอซินในตัวทำลายทั้งสองชนิดลดลงเป็นอย่างมากแตกต่างจากอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสอย่างชัดเจน อย่างไรก็ตาม Gulani และคณะ (2012) ได้รายงานเกี่ยวกับการทดลองผลของอุณหภูมิต่อการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของโพรดิจิโอซิน โดยการนำสารโพรดิจิโอซินที่สกัดได้จากแบคทีเรีย *S. marcescens* บ่มที่อุณหภูมิต่างๆคือ 30, 50 และ 80 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที และ 121 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งจากการทดลองพบว่าอุณหภูมิไม่มีผลต่อการออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของโพรดิจิโอซิน แสดงให้เห็นว่าโพรดิจิโอซินสามารถทนต่อความร้อนสูงได้ เช่นเดียวกับการรายงานของ Vaidyanathan และคณะ (2012) ที่พบว่าโพรดิจิโอซินสามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสได้นาน 1 ชั่วโมง

3.4 ประโยชน์ของโพรดิจิโอซิน

สารสีธรรมชาติชนิดนี้มีประโยชน์ต่างๆ มากมาย เช่น มีการนำโพรดิจิโอซินไปใช้เป็นสีข้อมธรรมชาติเนื่องจากไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ ซึ่งมีรายงานว่าสามารถนำไปย้อมสีแก้วอะคริลิก (polymethyl methacrylate: PMMA) ย้อมสีผลิตภัณฑ์ยาง หรือแม้กระทั่งกระดาษได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Krishna *et al.*, 2013) โพรดิจิโอซินยังมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลากหลายชนิด จากการศึกษาของ Jimtha และคณะ (2017) รายงานว่าโพรดิจิโอซินที่แยกได้จากแบคทีเรีย *Serratia sp.* สามารถยับยั้งเชื้อราชนิด *Pythium myriotylum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Phytophthora infestans*, และ *Fusarium oxysporum* นอกจากนี้ยังพบว่าโพรดิจิโอซินยังมีคุณสมบัติในการยับยั้งมาลาเรีย และยับยั้งแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* และ *Streptococcus pyogenes* (Lapenda *et al.*, 2015) กลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของโพรดิจิโอซินนั้นจะเริ่มจากการผ่านเข้าสู่เซลล์และไปยังยังการทำงานของเอนไซม์เป้าหมายได้แก่ ดีเอ็นเอ ไจเรส (DNA gyrase) และ โทโปไอโซเมอเรส 4 (topoisomerase IV) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแบ่งเซลล์ของแบคทีเรียทำให้แบคทีเรียหยุดการเจริญเติบโตและตายลงในที่สุด (Berlanga *et al.*, 2000) นอกจากนี้ยังพบว่าโพรดิจิโอซินมีฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็ง จากการศึกษาคุณสมบัติการต้านมะเร็งของโพรดิจิโอซินที่แยกได้จากแบคทีเรีย *S. marcescens* ต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูกของมนุษย์ (Hela-229 cell line)

พบว่าโพรดิจิโอซินมีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ และยังมีผลทำให้เซลล์มะเร็งปากมดลูกตาย (Kavitha *et al.*, 2010)

1.2.4 บทบาทของสารสีในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

1. การเพิ่มสีในปลาและกุ้ง

สีของปลาและกุ้งเป็นสิ่งสำคัญสำหรับการตัดสินใจซื้อของผู้บริโภค เพราะสีเป็นตัวบ่งบอกถึงคุณภาพของปลาและกุ้งชนิดต่างๆ นอกจากนี้ยังทำให้สามารถขายได้ในราคาที่สูงขึ้น โดยสีที่สะสมอยู่ในตัวกุ้งและปลาส่วนใหญ่เป็นสารสีธรรมชาติคือ แคโรทีนอยด์ แต่ปลาและกุ้งไม่สามารถสังเคราะห์แคโรทีนอยด์เช่นเดียวกับสัตว์ชนิดอื่นๆ ดังนั้นสัตว์เหล่านี้จะได้รับแคโรทีนอยด์จากอาหารที่กินเข้าไป โดยในธรรมชาติจะได้รับแคโรทีนอยด์จากแพลงก์ตอนหรือสาหร่ายต่างๆ ดังนั้นในระบบการเพาะเลี้ยง ปลาและกุ้งที่เลี้ยงอาจจะไม่ได้รับแคโรทีนอยด์จากอาหารธรรมชาติจึงจำเป็นต้องมีการเสริมแคโรทีนอยด์ในอาหาร ปัจจุบันมีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการเพิ่มสารสีในปลาและกุ้งอย่างแพร่หลาย เช่น การศึกษาของ Boonyaratpalin และคณะ (2001b) ได้ทดลองเปรียบเทียบผลของสารสี 2 ชนิดคือ แอสตาแซนทินสังเคราะห์ และเบตา-แคโรทีนจากสาหร่าย *Dunaliella salina* ในกุ้งกุลาดำ พบว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารที่เสริมเบตา-แคโรทีนจากสาหร่าย *D. salina* มีปริมาณแคโรทีนอยด์สะสมในตัวเพิ่มขึ้น ให้ผลการทดลองที่ใกล้เคียงกับกุ้งที่ได้รับอาหารเสริมแอสตาแซนทินสังเคราะห์ เช่นเดียวกับ Barclay และคณะ (2006) รายงานว่ากุ้งลอกปสเตอร์ *Panulirus ornatus* ที่ได้รับอาหารเสริมแอสตาแซนทินส่งผลทำให้กุ้งมีสีลำตัวที่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้อุดมพันธ์ (2549) พบว่าการเสริมซีแซนทิน และแคโรทีนอยด์ที่ได้จากสาหร่าย สไปรูลิлинаที่ระดับ 150 ส่วนในล้าน ทำให้การสะสมแคโรทีนอยด์รวมในปลานิลแดงแปลงเพศมีค่าสูงขึ้นแตกต่างจากชุดการทดลองอื่นๆ โดยปลาที่ได้รับอาหารที่เสริมด้วยซีแซนทินจะมีค่าความแดงสูงที่สุดแตกต่างจากชุดการทดลองอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ และสุภญา และคณะ (2556) ทดลองเพิ่มสารสีให้กับปลากระแห (*Barbonymus schwanenfeldii*) ด้วยแคโรทีนอยด์ชนิดต่างๆ พบว่าปลากระแหที่ได้รับแอสตาแซนทิน และแคโรทีนอยด์จากสาหร่ายสไปรูลิลินามีผลทำให้ลำตัวของปลากระแหมีสีเหลือง และหางมีสีแดงเพิ่มขึ้นมากกว่าปลาที่ได้รับแคโรทีนอยด์ชนิดอื่นๆ

2. การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในปลาและกุ้ง

บทบาทของสารสีในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำนอกจากใช้ในการเพิ่มสีส้มให้กับสัตว์น้ำแล้ว ยังมีการนำสารสีชนิดต่างๆ มาใช้เพื่อกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในปลาและกุ้ง เช่นรายงานของ กิจการ และคณะ (2549) พบว่าการผสมแคโรทีนอยด์ที่ได้จากสาหร่ายสไปรูลีนา ฟริกหวาน ปาล์ม น้ำมัน และเบตา-แคโรทีนสังเคราะห์ ที่ระดับ 100 ส่วนในล้าน ในอาหารกุ้งขาวมีผลในการกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งขาว ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ ฟีนอลออกซิเดสมีค่าสูงกว่ากุ้งที่ได้รับอาหารในชุดควบคุม แต่กุ้งที่ได้รับอาหารผสมแคโรทีนอยด์จากปาล์มน้ำมันกลับทำให้เอนไซม์ชนิดนี้มีค่าลดลง ส่วนการศึกษาของ Pham และคณะ (2014) ได้ศึกษาผลของแคโรทีนอยด์ชนิดต่างๆ ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระภายในตับ พลาสมา และเนื้อของลูกปลาชีกเดียว (*Paralichthys olivaceus*) เปรียบเทียบกับปลาที่ได้รับอาหารในชุดควบคุม พบว่าปลาที่ได้รับอาหารผสมแคโรทีนอยด์ จากฟริกปาปริก้า และสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* มีกิจกรรมของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล (hydroxyl radical) อนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH; 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) และอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ (superoxide radicals) สูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารในชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ Kim และคณะ (2010) ได้ศึกษาผลของแบคทีเรีย *Z. ganghwensis* ที่สามารถผลิตสารสีโพรดีจีโอซิน ต่อกการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของปลาชีกเดียว (*P. olivaceus*) พบว่าปลาชีกเดียวที่ได้รับอาหารผสมเซลล์แบคทีเรียชนิดนี้ในระดับความเข้มข้นต่างๆ มีกระบวนการจับกินสิ่งแปลกปลอม ปริมาณเอนไซม์ไลโซไซม์ และค่าการลดลงของ NBT (Nitroblue tetrazolium) สูงขึ้นหลังได้รับอาหารเป็นเวลา 8 สัปดาห์ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากปลาในชุดควบคุม และยังพบว่าปลาที่ได้รับอาหารที่ผสมเซลล์แบคทีเรีย *Z. ganghwensis* มีความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus iniae* โดยปลาที่ได้รับอาหารในชุดควบคุมมีอัตราการตายสะสมสูงถึง 85 เปอร์เซ็นต์หลังการติดเชื้อแบคทีเรีย แต่ปลาที่ได้รับอาหารผสมเซลล์แบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้นสามระดับมีอัตราการตายสะสมเพียง 25 35 และ 40 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่แยกได้จากฟองน้ำทะเลโดยอาศัยคุณสมบัติทางกายภาพ ชีวเคมี และชีวโมเลกุล
2. เพื่อศึกษาชนิด ปริมาณ และสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารสีของแบคทีเรียที่แยกได้จากฟองน้ำทะเล
3. เพื่อศึกษาผลของสารสีที่ผลิตจากแบคทีเรียที่แยกได้จากฟองน้ำทะเลต่อการเจริญเติบโต การเพิ่มสี และระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว (*L. vannamei*)

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการศึกษา

2.1 วัสดุ

2.1.1 กุ้งขาว

กุ้งขาวแปซิฟิก (*L. vannamei*) น้ำหนักประมาณ 13 กรัม

2.1.2 อาหารสำหรับเลี้ยงกุ้งขาว

การทดลองนี้ใช้อาหารสำหรับเลี้ยงกุ้งทดลองทั้งหมด 4 สูตร แตกต่างกันตามปริมาณของ เซลล์แบคทีเรีย โดยคำนวณสูตรอาหารให้มีระดับคุณค่าทางโภชนาการเท่ากันทุกชุดการทดลอง แต่ละสูตรมีระดับโปรตีนประมาณ 36 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 7 เปอร์เซ็นต์

2.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Marine agar (Conda, Spain)
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Marine broth (HiMedia, India)

2.1.4 สารเคมี

1. สารเคมีสำหรับการเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรีย
2. สารเคมีสำหรับการสกัดสารดี
3. สารเคมีสำหรับการทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพและชีวเคมีของแบคทีเรีย
4. สารเคมีสำหรับการยืนยันชนิดของแบคทีเรียด้วยเทคนิค phylogenetic analysis
5. สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์องค์ประกอบเนื้อปลา
6. สารเคมีสำหรับวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์
7. สารเคมีสำหรับการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพ

2.2 อุปกรณ์

1. อุปกรณ์สำหรับการเก็บตัวอย่างแบคทีเรีย
2. อุปกรณ์สำหรับการเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรีย
3. อุปกรณ์สำหรับคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียชนิดที่สามารถผลิตสารสีปริมาณสูงที่สุด
4. อุปกรณ์สำหรับยืนยันชนิดของแบคทีเรียด้วยเทคนิค phylogenetic analysis
5. อุปกรณ์สำหรับการศึกษาปัจจัยทางกายภาพที่เหมาะสมต่อการผลิตสารสีของแบคทีเรีย
6. อุปกรณ์สำหรับการศึกษาผลของแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารสีต่อการเจริญเติบโต ระบบภูมิคุ้มกัน และความต้านทานโรคในกุ้งขาว

2.3 วิธีการศึกษา

2.3.1 การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตสารสีจากฟองน้ำทะเล

เก็บตัวอย่างฟองน้ำทะเลจากจังหวัดพังงา และจังหวัดสตูล ทำการบันทึกข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น นำข้อมูลที่ได้ไปจำแนกชนิดของฟองน้ำโดยเปรียบเทียบจากรายงานของ คมสัน และคณะ (2556) และ สุเมตต์ (2555) จากนั้นนำตัวอย่างฟองน้ำมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ให้ได้น้ำหนักประมาณ 1 กรัม ล้างด้วยน้ำทะเลปลอดเชื้อ ก่อนนำมาบดให้ละเอียดแล้วเติมน้ำทะเลปลอดเชื้อ 9 มิลลิลิตร จะได้สารละลายที่มีความเจือจาง 10 เท่า จากนั้นเจือจางต่อให้ได้ความเจือจาง 100 เท่า คูดตัวอย่างที่เจือจางทั้ง 2 ระดับ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Marine agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงนาน 24-48 ชั่วโมง คัดเลือกเฉพาะแบคทีเรียที่มีโคโลนีสีแดงหรือเหลืองนำไปเลี้ยงต่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์

2.3.2 การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรีย

นำแบคทีเรียที่ได้จากการคัดเลือกละเลียงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Marine agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงนาน 24-48 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อที่ได้ถ่ายลงในหลอดทดลองที่มีอาหาร Marine broth ปริมาตร 6 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสภายใต้แสงและเขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 24-48 ชั่วโมง คูดเชื้อในอาหาร Marine broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีกลีเซอรอลปลอดเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน คูดเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

2.3.3 การคัดเลือกแบคทีเรียชนิดที่ผลิตสารสีปริมาณสูงที่สุด

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตรที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Marine broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงและเขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 24-48 ชั่วโมง จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อ Marine broth ที่มีเซลล์ของแบคทีเรียมาหมวนแห้งด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำเกลือปลอดเชื้อความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ หมวนแห้งซ้ำอีก 2 ครั้ง นำเซลล์ที่ได้มาทำให้แห้งภายใต้สภาวะเยือกแข็ง (freeze dry) จากนั้นนำไปสกัดด้วยตัวทำละลายอะซิโตนพร้อมกับการบดเซลล์เพื่อให้เซลล์แตก สกัดซ้ำตามขั้นตอนเดิมจนกระทั่งตัวทำละลายที่ใช้ไม่มีสี

จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาใส่กรวยแยก เติมนิโคเอทิลอีเทอร์และน้ำกลั่น เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ จนกระทั่งสารละลายแยกชั้น ใสส่วนที่เป็นน้ำทิ้ง เติมน้ำกลั่นอีกครั้ง เขย่าตั้งทิ้งไว้ ใสส่วนที่เป็นน้ำ ทิ้ง ทำซ้ำ 5-7 ครั้ง สารละลายที่ได้นำไปวิเคราะห์ปริมาณสารสีด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตเมตริก ออานาไลซิส (spectrophotometric analysis) โดยใช้สูตรที่ดัดแปลงจากวิธีการของ Britton และคณะ (1995) และ Williams และคณะ (1955) ดังนี้

$$\text{Pigment content } (\mu\text{g/g}) = ((\text{OD} / 0.25) \times \text{extract volume}) / \text{weigh of sample}$$

จากนั้นคัดเลือกเฉพาะตัวอย่างที่มีปริมาณสารสีมากที่สุด นำไปวิเคราะห์ชนิดของ สารสีด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin layer chromatography: TLC) และ Scanning spectroscopy ยืนยันชนิดของสารสีที่แบคทีเรียผลิตด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรเมตรี (Mass spectrometry) ผลที่ได้จะใช้ในการคัดเลือกแบคทีเรียเพื่อใช้ศึกษาในการทดลองต่อไป

2.3.4 การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย

จำแนกชนิดของแบคทีเรียที่ผลิตสารสีได้ในปริมาณสูงที่สุด โดยการทดสอบ คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีได้แก่ การย้อมแกรม การทดสอบการสร้างเอนไซม์ ออกซิเดส และเอนไซม์คาตาเลส และการทดสอบทางชีวโมเลกุลโดย สกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรีย ตามวิธีการของ Berridge และคณะ (1998) จากนั้นนำมาเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยวิธี polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ 20F (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3') และ 1500R (5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3') ซึ่งมีความจำเพาะต่อยีน *16s rDNA* ของแบคทีเรีย (Weisburg *et al.*, 1991) โดยขั้นตอนการทำ PCR เริ่มจากการเตรียมสารละลายที่มีความเข้มข้นของสารแต่ละชนิดต่อ 1 ตัวอย่าง ประกอบด้วย 2xPCR master mix bluetag (RBC Bioscience, Taiwan) ปริมาตร 7.5 ไมโครลิตร ไพรเมอร์แต่ละชนิด (ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร น้ำกลั่น ปริมาตร 4.5 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอที่สกัดได้ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ควบคุมอุณหภูมิและเวลาของ ขั้นตอนต่างๆ ด้วยเครื่อง Thermal cyclers (PTC-100™, MJ Research Inc.) ภายใต้สภาวะ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 40 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ทำซ้ำ denaturation annealing และ extension จำนวน 30 รอบ และ final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เมื่อได้ตัวอย่างดีเอ็นเอจากการทำ PCR นำไป

ตรวจสอบโดยวิธีเจล อิเล็กโตรโฟรีซิสในอะกาโรส เจล (agarose gel) ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย TBE (90 mM Tris, 90 mM borate and 2m M ethylenediaminetetraacetic acid, pH 8) และใช้ One Mark 100 (Gene Direx, Taiwan) เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดสกัด Gel Extraction Kit (Qiagen) และนำดีเอ็นเอบริสุทธิ์ที่ได้ไปวิเคราะห์ลำดับเบสโดยใช้ไพรมอร์ 20F และ 1500R จากนั้นนำลำดับเบสที่วิเคราะห์ได้มาเปรียบเทียบกับโปรแกรม Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, <http://www.ncbi.nlm.gov>) และใช้โปรแกรม Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) package (version 7.0) ในการทำ phylogenetic analysis

2.3.5 การศึกษาปัจจัยทางกายภาพที่เหมาะสมต่อการผลิตสารสีของแบคทีเรีย

นำแบคทีเรียที่คัดเลือกและจำแนกชนิดแล้วมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Marine agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงนาน 48 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อที่ได้ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหาร Marine broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงและเขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 48 ชั่วโมง คูลเชื้อแบคทีเรียปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตรจำนวน 3 ขวด ที่มีอาหาร Marine broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ค่าความเป็นกรดต่าง 7.6 ± 0.2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 20, 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงและเขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นนำแบคทีเรียที่ได้ไปหมუნเหวียง และสกัดสารสีตามวิธีการข้อ 3 เพื่อศึกษาปริมาณสารสีที่แบคทีเรียผลิตได้ที่อุณหภูมิต่างๆ

ศึกษาผลของค่าความเป็นกรดต่างต่อการผลิตสารสีของแบคทีเรียโดยเตรียมเชื้อแบคทีเรียเช่นเดียวกับการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตสารสีของแบคทีเรีย จากนั้นถ่ายเชื้อแบคทีเรียปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตรจำนวน 3 ขวด ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Marine broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ค่าความเป็นกรดต่าง 5, 6, 7, 8 และ 9 นำไปบ่มโดยใช้อุณหภูมิที่แบคทีเรียเจริญเติบโตดีที่สุดจากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตสารสีของแบคทีเรีย ภายใต้แสงและเขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นนำแบคทีเรียที่ได้ไปหมუნเหวียง และสกัดสารสีตามวิธีการข้อ 3 เพื่อศึกษาปริมาณสารสีที่แบคทีเรียผลิตได้ที่ความเป็นกรดต่างระดับต่างๆ

2.3.6 การศึกษาผลของแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารสื่อต่อการเจริญเติบโต ระบบภูมิคุ้มกัน และความต้านทานโรคในกุ้งขาว

1. การเตรียมอาหาร

อาหารที่จะใช้ในการทดลองครั้งนี้มีทั้งหมด 4 สูตร กำหนดให้อาหารทุกสูตรมีคุณค่าทางโภชนาการใกล้เคียงกันทั้ง 4 สูตรคือ โปรตีน 36 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 7 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2) อาหารทดลองสูตรที่ 1 เป็นอาหารสูตรควบคุมที่ไม่เสริมแหล่งของสารสื่อ อาหารทดลองสูตรที่ 2-4 เป็นอาหารที่มีการผสมเซลล์ของแบคทีเรียปริมาณ 1, 3 และ 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ตามลำดับ ก่อนเริ่มการทดลองทำการตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของอาหารทั้ง 4 สูตรตามวิธีการของ AOAC (1990) และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนไอซอินในอาหารตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Britton และคณะ (1995) และ Williams และคณะ (1955) (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 2 สูตรอาหารที่ใช้สำหรับเลี้ยงกุ้งขาวในแต่ละชุดการทดลอง

Ingredients	Experimental diet			
	T1 (Control)	T2 (1g/kg)	T3 (3g/kg)	T4 (5g/kg)
Fish meal (60%CP)	200.0	200.0	200.0	200.0
Soybean de-hulled (45%CP)	220.0	219.0	217.0	215.0
Corn protein concentrate	70.0	70.0	70.0	70.0
Wheat gluten (pellet binder)	20.0	20.0	20.0	20.0
Wheat flour	250.0	250.0	250.0	250.0
Rice flour	151.6	151.6	151.6	151.6
Squid liver powder	30.0	30.0	30.0	30.0
Fish oil	30.0	30.0	30.0	30.0
Lecithin	10.0	10.0	10.0	10.0
Choline chloride	1.0	1.0	1.0	1.0
ROVIMIX 2050	2.0	2.0	2.0	2.0
Inositol	0.4	0.4	0.4	0.4
DCP	15.0	15.0	15.0	15.0
Bacteria	0.0	1.0	3.0	5.0
Total (g)	1000	1000	1000	1000

วิตามินและแร่ธาตุรวม (Rovimix 2050): Retinal (A) 7,000 IU; Cholecalciferol (D3) 3,000 IU; Tocopherol (E) 1,500 mg; Menadione sodium bisulfite (K3) 30 mg; Thiamine (B1) 25 mg; Riboflavin (B2) 20 mg; Pyridoxine (B6) 25 mg; Cobalamin (B12) 0.02 mg; Niacin 100 mg; pantothenic acid 80 mg; Ascorbic acid (C) 200 mg; Biotin 1 mg; Folic acid 10 mg; Cu 25 mg; Fe 30 mg; Mn 30 mg; I 1 mg; Co 0.2 mg; Zn 100 mg; Se 0.35 mg

ตารางที่ 3 องค์ประกอบทางเคมีของอาหารที่ใช้เลี้ยงกุ้งขาวในแต่ละชุดการทดลอง

Chemical composition	Experimental diet			
	T1 (Control)	T2 (1g/kg)	T3 (3g/kg)	T4 (5g/kg)
Protein (%)	36.86±0.19	37.18±0.21	36.41±0.11	36.64±0.05
Lipid (%)	6.90±0.08	6.99±0.09	6.91±0.04	6.93±0.08
Ash (%)	6.81±0.03	6.84±0.02	6.63±0.07	6.74±0.01
Moisture (%)	8.37±0.10	7.83±0.15	8.82±0.11	8.23±0.13
Prodigiosin (mg/kg)	0.0±0.0	5.70±0.58	15.78±0.73	28.34±0.38

2. การศึกษาการเจริญเติบโตและความต้านทานเชื้อแบคทีเรีย

แบ่งการทดลองเป็น 4 ชุดการทดลองๆ ละ 3 ซ้ำ โดยชุดการทดลองที่ 1 เป็นกุ้งขาวที่ได้รับอาหารสูตรควบคุมที่ไม่เสริมเซลล์แบคทีเรีย ชุดการทดลองที่ 2-4 เป็นกุ้งที่ขาวได้รับอาหารที่มีการผสมเซลล์แบคทีเรียเท่ากับ 1, 3 และ 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมตามลำดับ ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ใช้กุ้งขาว PL 12 นำมาเลี้ยงด้วยน้ำทะเลความเค็ม 15 ส่วนในพัน ในบ่อขนาด 3 ตัน จนได้กุ้งขนาดประมาณ 13 กรัม หลังจากนั้นคัดแยกกุ้งลงเลี้ยงในตู้ จำนวน 15 ตู้ๆ ละ 20 ตัว เลี้ยงด้วยอาหารสูตรควบคุมประมาณ 7 วัน เพื่อให้กุ้งปรับสภาพให้คุ้นเคยต่อการเลี้ยงในตู้ ก่อนเริ่มการทดลองทำการชั่งน้ำหนักของกุ้งทุกตู้และติดเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ให้กับกุ้งในทุกชุดการทดลองก่อนการเลี้ยงด้วยอาหารทดลอง โดยนำเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* PSU-KSAAHRC411 มาเลี้ยงในอาหาร Tryptic soy agar (TSA) ที่ผสมเกลือแกงความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อที่ได้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy broth (TSB) ที่ผสมเกลือแกง 1.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 60 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30

องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง นำไปหมูนเหวียงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างเซลล์แบคทีเรียด้วยสารละลาย PBS (pH 7.4) 2 ครั้ง จากนั้นเจือจางเชื้อให้มีปริมาณแบคทีเรียเท่ากับ 10^6 โคโลนีต่อมิลลิลิตร นำไปฉีดเข้าตัวกุ้งที่บริเวณกล้ามเนื้อท้อง ปล้องสุดท้ายตัวละ 0.1 มิลลิลิตร

หลังจากนั้นเริ่มให้อาหารทดลองชุดต่างๆ กับกุ้งที่เลี้ยง โดยให้อาหารวันละ 4 มื้อ เลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ระหว่างการเลี้ยงมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำ ตรวจสอบคุณภาพน้ำ จดบันทึกอาหารที่ให้ บันทึกอัตราการตาย เพาะเชื้อจากตับของกุ้งที่ตายทุกตัวเพื่อยืนยันสาเหตุการตาย และชั่งน้ำหนักของกุ้งที่ได้รับอาหารทดลอง เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณประสิทธิภาพการใช้อาหาร การเจริญเติบโต และอัตราการรอดตายโดยใช้สมการต่างๆ ตามรายงานของกิจการ และคณะ (2549) และ Yaemsooksawat และคณะ (2009) ดังนี้

อัตราการรอดตาย (survival rate %)

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

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate: SGR, เปอร์เซ็นต์ต่อวัน)

$$= \frac{(\ln \text{ น้ำหนักกุ้งเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} - \ln \text{ น้ำหนักกุ้งเมื่อเริ่มการทดลอง}) \times 100}{\text{ระยะเวลา (วัน)}}$$

อัตราการเจริญเติบโต (Average daily gain: ADG, กรัม/ตัว/วัน)

$$= \frac{(\text{น้ำหนักกุ้งเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} - \text{น้ำหนักกุ้งเริ่มต้น})}{\text{ระยะเวลา (วัน)}}$$

ปริมาณอาหารที่กุ้งกิน (Feed intake, กรัม/ตัว)

$$= \frac{\text{น้ำหนักอาหารที่กุ้งกินทั้งหมด}}{\text{จำนวนกุ้งเมื่อสิ้นสุดการทดลอง}}$$

น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (weight gain, เปอร์เซ็นต์)

$$= \frac{(\text{น้ำหนักกุ้งเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} - \text{น้ำหนักกุ้งเริ่มต้น}) \times 100}{\text{น้ำหนักกุ้งเริ่มต้น}}$$

3. การเปลี่ยนแปลงสีของตัวกุ้ง

หลังเลี้ยงกุ้งด้วยอาหารทดลองเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ สุ่มกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหาร ทั้ง 4 ชุดการทดลองๆ ละ 9 ตัว นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 3 นาที ถ่ายรูปกุ้งหลังต้ม จากนั้นนำกุ้งที่ผ่านการต้มไปวัดสีด้วยเครื่องวัดค่าสี (HunterLab, USA) โดยสุ่มวัดบริเวณหัว (carapace) และลำตัว (abdomen) ซึ่งจะรายงานผลที่ได้เป็น ค่าความสว่าง (L*) ค่าสีแดง (a*) และ ค่าสีเหลือง (b*)

4. การศึกษาองค์ประกอบเลือด

หลังสิ้นสุดการทดลองเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ สุ่มเก็บตัวอย่างกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารทั้ง 4 ชุดการทดลอง ๆ ละ 9 ตัว นำมาศึกษาองค์ประกอบเลือดโดยมีวิธีการศึกษาดังนี้

4.1 ปริมาณเม็ดเลือดรวม

ตรวจนับจำนวนเม็ดเลือดกุ้งตามวิธีการของกิจการ และคณะ (2543) โดยใช้เข็มพลาสติกขนาด 1 มิลลิเมตร เจาะเลือดจากโคนขาเดินคู่ที่ 3-4 จากนั้นนำเลือดที่ได้มาเจือจางด้วยสารละลายไทรแพนบลู (trypan blue) ในสัดส่วน 1:10 นำส่วนผสมที่ได้มานับจำนวนเม็ดเลือดด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ (hemacytometer) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และคำนวณปริมาณเม็ดเลือดเป็นจำนวนเซลล์/ลูกบาศก์มิลลิเมตร

4.2 ปริมาณน้ำตาลในเลือด

วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในเลือดตามวิธีการของ Hyvarinen และ Nikkila (1962) โดยนำเลือดกุ้งมา 100 ไมโครลิตรใส่ใน Trichloroacetic acid ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิตร ผสมให้เข้ากัน วางทิ้งไว้ 2-3 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,500 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูเฉพาะส่วนใส 500 ไมโครลิตรผสมกับ color reagent ปริมาตร 4.5 มิลลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 7 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (standard glucose) ที่เตรียมด้วยวิธีการเดียวกับตัวอย่างแต่เปลี่ยนจากเลือดกุ้งเป็นสารละลายกลูโคสมาตรฐาน ค่าที่ได้นำไปคำนวณหาปริมาณน้ำตาลในเลือดดังสูตร

$$\text{ปริมาณน้ำตาลในเลือด (mg \%)} = \frac{\text{OD}_{630} \text{ unknown} \times \text{ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน}}{\text{OD}_{630} \text{ standard}}$$

4.3 ปริมาณโปรตีนในน้ำเลือด

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในน้ำเลือดตามวิธีการของ Lowry และคณะ (1951) ที่ดัดแปลงโดยกิจการ และคณะ (2543) โดยเจาะเลือดกึ่งบริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 3-4 โดยไม่ใช้สารป้องกันเลือดแข็งตัว ใส่ในหลอดไมโครเซนทริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้แข็งตัว จากนั้นบดด้วยแท่งบดให้ละเอียดและนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ใส่น้ำกลั่น 5 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 995 ไมโครลิตร เติมน้ำสารละลายอัลคาไลน์ คอปเปอร์ (alkaline copper solution) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที เติมน้ำสารประกอบโฟลีน (folin reagent) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เพื่อทำปฏิกิริยากับโปรตีนในซีรัม ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร นำไปเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานของอัลบูมิน

4.4 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส

วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Smith และ Söderhall (1983) โดยการเก็บตัวอย่างเลือดกึ่ง 200 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซนทริฟิวส์ที่มีสารละลายคาโคดีเลท บัฟเฟอร์ (cacodylate buffer) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แช่ในไนโตรเจนเหลว และนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาบดให้ละเอียดแล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ใส่น้ำกลั่นส่วนใส 25 ไมโครลิตร ใส่ในถาดหลุม (96-microwell plate) เติมน้ำสารละลายทริปซิน (trypsin) ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที เติมน้ำสารละลายคาโคดีเลท บัฟเฟอร์ ปริมาตร 150 ไมโครลิตร จากนั้นเติมน้ำสารละลาย L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 2 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท ทุกๆ 2 นาที เป็นเวลา 30 นาที โดยกำหนดให้ 1 หน่วย คือความสามารถของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสที่สามารถเปลี่ยน L-DOPA เป็น โดปามีน (dopamine) ด้วยการดูดกลืนแสง 0.001/นาที/มิลลิกรัม ของโปรตีนในสารละลาย

4.5 การศึกษากิจกรรมการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาว

วิเคราะห์กิจกรรมการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาวตามวิธีการของกิจการและคณะ (2543) โดยเก็บตัวอย่างเลือดประมาณ 0.5 มิลลิลิตร นำไปผสมกับ แอล-ซิสเตอีน (L-cysteine) พีเอช 7.4 ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ในสารละลาย K-199 เป็นสารป้องกันเลือดแข็งตัวจนได้ปริมาตรสุดท้าย 1 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,500 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ใส่น้ำที่เย็นและนำตะกอนเม็ดเลือดที่ได้ล้างด้วย K-199 อีก 1 รอบ จากนั้นละลายเม็ดเลือดด้วย K-199 แบ่งบางส่วนไปนับจำนวนเม็ดเลือด โดยนำเม็ดเลือดที่ได้ผสมกับสารละลายไทรเพนบลู ในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นนำไปนับจำนวนภายใต้กล้องจุลทรรศน์และปรับเม็ดเลือดให้ได้ความเข้มข้น 2×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษากิจกรรมการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาว ซึ่งมีวิธีการดังนี้

วางแผ่นสไลด์กลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตรลงในถาดหลุม (24-microwell plate) จากนั้นดูดเม็ดเลือดที่มีความเข้มข้น 2×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 400 ไมโครลิตรผสมกับเม็ดพลาสติกเรืองแสงที่ละลายอยู่ใน K-199 ความเข้มข้น 2×10^7 เม็ดต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 400 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยเติมกลูตาโรลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.125 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย K-199 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 5 นาที ยกแผ่นสไลด์กลมไปย้อมด้วยสิดิฟควิก (diff quick) ทิ้งไว้ให้แห้ง และทำเป็นสไลด์ถาวร ก่อนจะนำไปนับจำนวนเม็ดเลือดทั้งหมด และจำนวนเม็ดเลือดที่จับกินเม็ดพลาสติก ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40x หลังจากนั้นนำมาคำนวณตามสูตร

$$\text{Phagocytosis (\%)} = \frac{\text{จำนวนเม็ดเลือดที่จับกินเม็ดพลาสติก}}{\text{จำนวนเม็ดเลือดทั้งหมด}} \times 100$$

$$\text{Phagocytic index} = \frac{\text{จำนวนเม็ดเลือดที่จับกินเม็ดพลาสติก}}{\text{จำนวนเม็ดเลือดทั้งหมด}} \times \frac{\text{จำนวนเม็ดพลาสติกที่ถูกจับกิน}}{\text{จำนวนเม็ดเลือดทั้งหมด}} \times 100$$

$$\text{Average number of the bead ingested per cell} = \frac{\text{จำนวนเม็ดพลาสติกที่เซลล์เม็ดเลือดจับกิน}}{\text{จำนวนเม็ดเลือดที่จับกินเม็ดพลาสติก}} \quad (\text{bead/cell})$$

4.6 การวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ไลโซไซม์

ศึกษาปริมาณเอนไซม์ไลโซไซม์ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Demers และ Bayne (1997) โดยดูดซึมจากตัวอย่างปริมาตร 25 ไมโครลิตร ใส่ในถาดหลุม (96-microwell plate) ตัวอย่างละ 3 หลุม หลังจากนั้นเติมสารละลายเชื้อแบคทีเรีย *Micrococcus lysodeikticus* ความเข้มข้น 0.075 เปอร์เซ็นต์ ลงไปในหลุมๆ ละ 175 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท ทุกๆ 30 วินาที เป็นเวลา 5 นาที นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปเปรียบเทียบกับไลโซไซม์มาตรฐานที่ทราบความเข้มข้น รายงานผลเป็นยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน โดยกำหนดให้ 1 ยูนิตไลโซไซม์ มีค่าเท่ากับปริมาณซึ่มที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลง 0.001/ นาที

5. การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์

หลังสิ้นสุดการทดลองเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ สุ่มเก็บตัวอย่างกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารทั้ง 4 ชุดการทดลอง ๆ ละ 6 ตัว นำมาศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ โดยสลับกุ้งด้วยน้ำที่เย็นจัด ผ่าตัดเก็บตัวอย่างตับและตับอ่อนของกุ้งใส่ในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์ นำไปแช่ในไนโตรเจนเหลว ก่อนนำไปสกัดเอนไซม์ จากนั้นสกัดเอนไซม์ตามวิธีการของ Ávila-Villa และคณะ (2012) โดยนำตับและตับอ่อนของกุ้งมาชั่งน้ำหนัก บดให้ละเอียดด้วยแท่งบดและเติมสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl (pH 7.5) ปริมาตร 4 เท่าของตัวอย่างลงในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์ นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเฉพาะส่วนใสใส่หลอดใหม่ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ต่างๆ ดังนี้

5.1 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ทริปซิน

เจือจางสารสกัดเอนไซม์ที่สกัดได้ในขั้นตอนข้างต้นให้ได้ความเจือจาง 10 เท่า นำไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในสารสกัดตามวิธีการของ Lowry และคณะ (1951) ที่ดัดแปลงโดยกิจการ และคณะ (2543) จากนั้นวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินตามวิธีการของ Ávila-Villa และคณะ (2012) และ Xu และคณะ (2012) โดยนำสารสกัดเอนไซม์ที่เจือจางมา 20 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น Benzoyl-L-Arg-p-nitroanilide (BAPNA) ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 480 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที หยุดปฏิกิริยา

ด้วย Trichloroacetic acid (TCA) ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที คัดเฉพาะส่วนใสนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร ค่าที่ได้นำไปคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินตามสูตร

ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ทริปซิน (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน)

$$= \frac{\text{OD 410 nm} \times 1000 \times \text{ปริมาตรรวมของปฏิกิริยา (มิลลิลิตร)}}{8800 \times \text{ระยะเวลาที่บ่ม (นาที)} \times \text{ปริมาณโปรตีนในสารสกัดเอนไซม์ (มิลลิกรัม)}}$$

5.2 การศึกษากิจกรรมเอนไซม์ไลโซทริปซิน

เจือจางสารสกัดเอนไซม์ให้มีความเจือจาง 10 เท่า นำไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในสารสกัดตามวิธีการของ Lowry และคณะ (1951) ที่ดัดแปลงโดยกิจการ และคณะ (2543) จากนั้นวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลโซทริปซินตามวิธีการของ Ávila-Villa และคณะ (2012) และ Xu และคณะ (2012) โดยนำสารสกัดเอนไซม์ที่เจือจางมา 20 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น Succinyl-Ala-Ala-Pro-phenylalanine-p-nitroanilid (SAPNA) ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 480 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย TCA ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที คัดเฉพาะส่วนใสนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร ค่าที่ได้นำไปคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ไลโซทริปซินตามสูตร

ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลโซทริปซิน (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน)

$$= \frac{\text{OD 410 nm} \times 1000 \times \text{ปริมาตรรวมของปฏิกิริยา (มิลลิลิตร)}}{8800 \times \text{ระยะเวลาที่บ่ม (นาที)} \times \text{ปริมาณโปรตีนในสารสกัดเอนไซม์ (มิลลิกรัม)}}$$

5.3 การศึกษากิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส

วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสตามวิธีการของ Anand และคณะ (2014) โดยนำสารสกัดเอนไซม์ที่เจือจางให้มีความเจือจาง 10 เท่า มา 50 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นคือสารละลายน้ำแป้ง (Soluble starch) ความเข้มข้น 1 % ปริมาตร 250 ไมโครลิตรในหลอดทดลองที่มี Tris-HCl (pH 7.5) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ห่อหลอดทดลองด้วยกระดาษ

อลูมิเนียม ฟอสเฟตให้สนิทอย่าให้โดนแสง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือด นาน 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เติมน้ำกลั่นปริมาตร 20 มิลลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ค่าที่ได้นำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานมอลโทส (maltose) ที่ทราบความเข้มข้น

5.4 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตามวิธีการของ Klahan และคณะ (2009) โดยนำสารสกัดเอนไซม์ที่เจือจางให้ได้ความเจือจาง 5 เท่า มา 50 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น *p*-Nitrophenylpalmitate ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ในหลอดทดลองที่มี Tris-HCl (pH 7.5) ปริมาตร 800 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย Na₂CO₃ (sodium carbonate) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 250 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร ค่าที่ได้นำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ *p*-nitrophenol ที่ทราบความเข้มข้น

5.5 การวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (GPx)

การวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดสเป็นการวัดกิจกรรมในทางอ้อมโดยวัดจากการลดลงของ NADPH ซึ่งเป็นตัวให้อิเล็กตรอนแก่กลูตาไธโอนในสภาพออกซิไดซ์ (GSSG) ให้กลายเป็นกลูตาไธโอนในสภาพรีดิวซ์ (GSH) ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ใช้ชุดทดสอบ Glutathione Peroxidase Assay Kit No.703102 (Cayman, USA) ในการวิเคราะห์ โดยนำสารสกัดเอนไซม์ที่เจือจางให้ได้ความเจือจาง 10 เท่า ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมกับชุดน้ำยาสำเร็จรูปลงในถาดหลุม (96-microwell plate) ที่ประกอบด้วย สารละลาย Assay buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร สารละลาย Co-substrate mixture ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ส่วนในหลุม negative control เติมสารละลาย Assay buffer ปริมาตร 120 ไมโครลิตร สารละลาย Co-substrate mixture ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และในหลุม positive control เติมสารละลาย Assay buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร สารละลาย Co-substrate mixture ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และสารละลายกลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส ปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย Cumene hydroperoxide ปริมาตร 20 ไมโครลิตรลงในทุกหลุมตัวอย่าง เขย่าถาดหลุมประมาณ 3 วินาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตร โดยวัดทุกๆ 1 นาที เป็นเวลา 5 นาที ค่าที่ได้นำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน activity of bovine erythrocyte GPx ในคู่มือของชุดทดสอบ

5.6 การวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์คาตาเลส

วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์คาตาเลสตามวิธีการของ Trasviña-Arenas และคณะ (2013) โดยดูดสารสกัดเอนไซม์ที่เจือจางให้มีความเจือจาง 5 เท่า มา 20 ไมโครลิตร ใส่ใน ถาดหลุม (96-microwell plate) ที่มีสารละลาย potassium phosphate buffer (pH 7.0) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และเมทานอลความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 30 ไมโครลิตร จากนั้นเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ห่อถาดหลุมด้วยฟิล์มพลาสติกก่อนนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่า (orbital shaker) นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิห้องเมื่อครบเวลาที่กำหนดเติมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ความเข้มข้น 10 โมลาร์ ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และ Purpald® ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ห่อถาดหลุมด้วยฟิล์มพลาสติกนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่า นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลาเติมสารละลายโพแทสเซียมไอโอเดต (KIO_3) ความเข้มข้น 62.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ห่อถาดหลุมด้วยฟิล์มพลาสติกอีกครั้งก่อนนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่า นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิห้องหลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรค่าที่ได้นำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของฟอร์มัลดีไฮด์ (formaldehyde) ที่ทราบความเข้มข้น

5.7 การวิเคราะห์ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ (Malondialdehyde: MDA)

การวิเคราะห์ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ตามวิธีการของ Nirmal และ Benjakul (2010) โดยนำตับและตับอ่อนของกึ่งมาตัดให้ได้ขนาดประมาณ 0.1 กรัม ใส่ในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์ เติมสารละลายกรดฟอสฟอริก (Phosphoric acid) ความเข้มข้น 1.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 800 ไมโครลิตร บดให้ละเอียดด้วยแท่งบดนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที คัดเฉพาะส่วนใสใส่หลอดใหม่จากนั้นนำสารละลายที่ได้มา 200 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์แล้วเติมสารละลายผสมระหว่างกรดไทโอบาร์บิทูริก (TBA) ความเข้มข้น 0.375 เปอร์เซ็นต์กับกรดไตรคลอโรอะซิติก (TCA) ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ที่ละลายอยู่ในกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.25 นอร์มอล ปริมาตร 600 ไมโครลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที แล้วทำให้เย็นทันทีก่อนจะนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร ค่าที่ได้นำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของมาลอนไดอัลดีไฮด์ที่ทราบความเข้มข้น

6. การศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนของกึ่งขาว

เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อตับและตับอ่อน (hepatopancreas) ของกึ่งขาวหลังสิ้นสุดการทดลองทั้ง 4 ชุดการทดลองๆละ 3 ตัว มาศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพ ตามวิธีการของ

Humason (1979) โดยนำตับและตับอ่อนมาดองในน้ำยาเควิดสันนาน 3 วัน จากนั้นเปลี่ยนเป็นเอทานอลความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 วัน และเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 วัน เพื่อรักษาสภาพของเนื้อเยื่อ นำอวัยวะทั้งหมดมาผ่านขั้นตอนการทำเนื้อเยื่อด้วยเครื่อง Automatic Tissue Processor ซึ่งจะผ่านแอลกอฮอล์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ จาก 50 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ เพื่อดึงน้ำออกจากเซลล์ แล้วผ่านลงในไอโซโพรพิล และไซลีน และฝังลงในพาราพลาส นำตัวอย่างที่ได้มาตัดด้วยเครื่องไมโครโทมให้มีความหนา 3-5 ไมครอน จากนั้นย้อมด้วยสีสีมาทอกไซลีนและอีโอซินตามวิธีการของ Bancroft (1967) และตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2.3.7 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลแบบทางเดียว (One-way ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Duncan's multiple-range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ตามวิธีการของ Steel และ Torrie (1980)

บทที่ 3

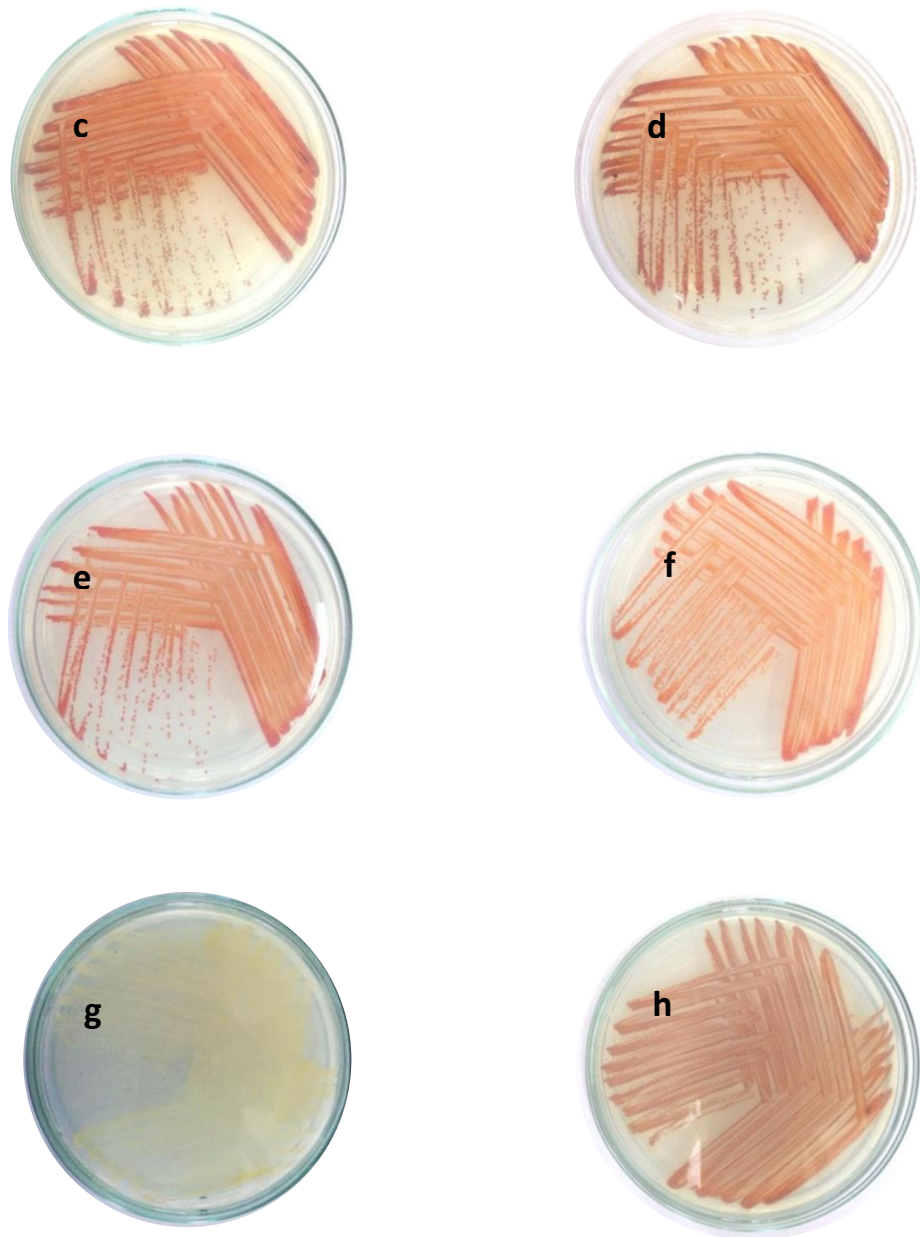
ผลการศึกษา

3.1 การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตสารสีจากฟองน้ำทะเล

ตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ. 2558 ถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2559 สามารถเก็บตัวอย่างฟองน้ำทะเลจากจังหวัดสตูล และพังงา ได้ 5 ชนิด แยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารสีได้ทั้งหมดจำนวน 8 ไอโซเลต (PSU-KSAAHRC MS 1-8) (ตารางที่ 4) โดยไอโซเลต PSU-KSAAHRC MS1 มีลักษณะโคโลนีกลมมน ขอบเรียบ มันวาว สีแดงอมชมพูอ่อน ไอโซเลต PSU-KSAAHRC MS2 มีลักษณะโคโลนีค่อนข้างกลม ขอบเรียบ สีแดงเข้ม ไอโซเลต PSU-KSAAHRC MS3 มีลักษณะโคโลนีกลมมน ขอบเรียบ มันวาว สีแดง ไอโซเลต PSU-KSAAHRC MS4 มีลักษณะโคโลนีกลมมน ขอบเรียบ มันวาวสีแดง ไอโซเลต PSU-KSAAHRC MS5 มีลักษณะโคโลนีกลมมน ขอบเรียบ มันวาว สีแดงอมส้ม ไอโซเลต PSU-KSAAHRC MS6 มีลักษณะโคโลนีกลมมน ขอบเรียบ มันวาว สีแดงอมส้ม ไอโซเลต PSU-KSAAHRC MS7 มีลักษณะโคโลนีกลมมน ขอบเรียบ มันวาว สีเหลือง และไอโซเลต PSU-KSAAHRC MS8 มีลักษณะโคโลนีกลมมน ขอบเรียบ มันวาว สีแดงอ่อน (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตที่แยกได้จากฟองน้ำทะเล และเพาะเลี้ยงบนอาหาร Marine agar (a) PSU-KSAAHRC MS1 (b) PSU-KSAAHRC MS2 (c) PSU-KSAAHRC MS3 (d) PSU-KSAAHRC MS4 (e) PSU-KSAAHRC MS5 (f) PSU-KSAAHRC MS6 (g) PSU-KSAAHRCMS7 (h) PSU-KSAAHRCMS8



ภาพที่ 3 (ต่อ) แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตที่แยกได้จากฟองน้ำทะเล และ
 เพาะเลี้ยงบนอาหาร Marine agar (a) PSU-KSAAHRC MS1 (b) PSU- KSAAHRC MS2
 (c) PSU-KSAAHRC MS3 (d) PSU-KSAAHRC MS4 (e) PSU-KSAAHRC MS5 (f)
 PSU-KSAAHRC MS6 (g) PSU-KSAAHRCMS7 (h) PSU-KSAAHRCMS8

ตารางที่ 4 แสดงเวลาและสถานที่เก็บตัวอย่าง สีของแบคทีเรีย และปริมาณสารสีที่ผลิตโดยแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตที่แยกได้จากฟองน้ำทะเล

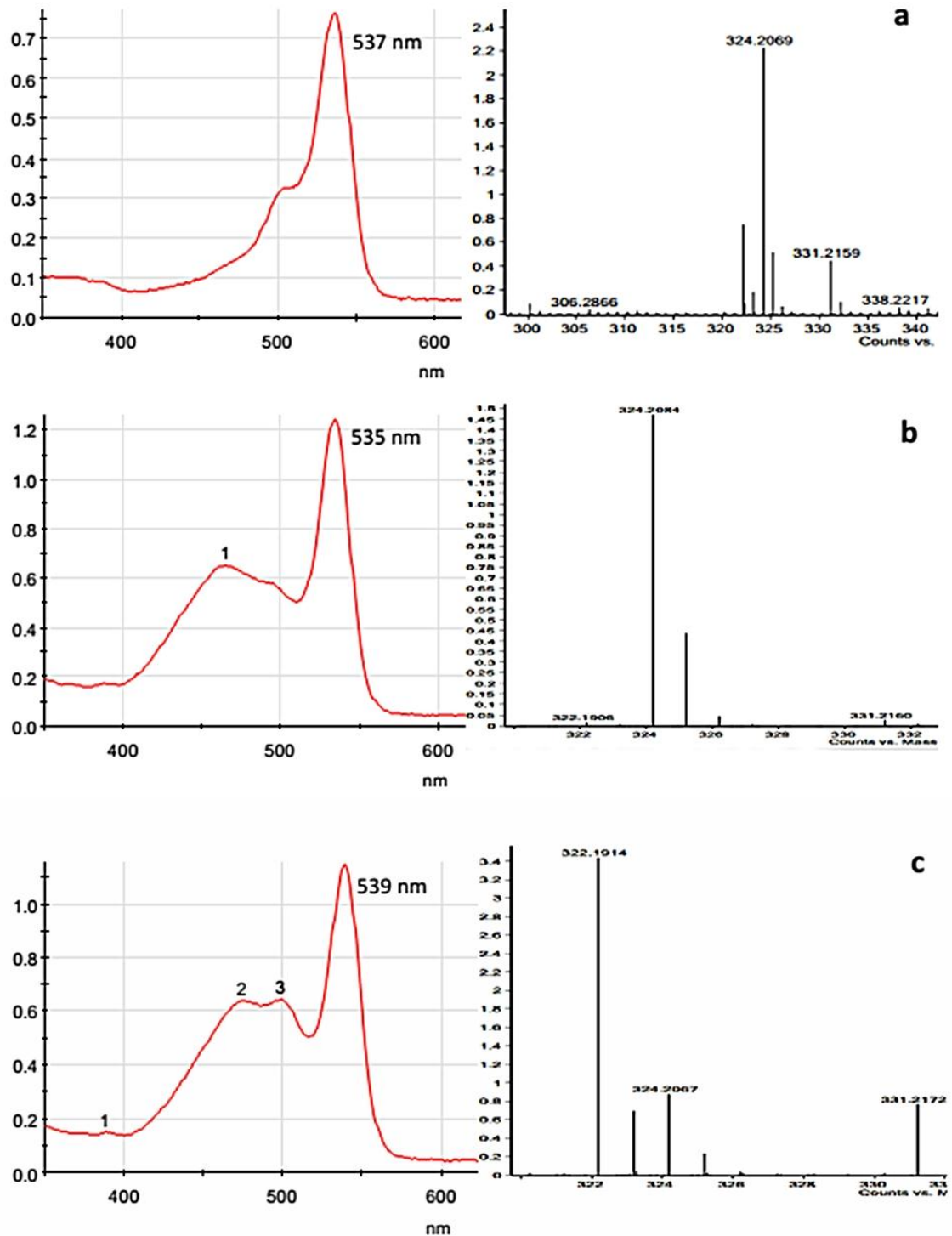
No.	Date	Origin	Marine sponge	Bacterial isolate	Color	Pigment content ($\mu\text{g/g}$)
1	ต.ค. 2558	ตะกั่วป่า, พังงา	<i>Callyspongia</i> sp.	PSU-KSAAHRC MS1	ชมพูอ่อน	$149.52 \pm 50.60^{\text{bcd}}$
2	ธ.ค. 2558	ละงู, สตูล	<i>Haliclona</i> sp.	PSU-KSAAHRC MS2	แดงเข้ม	$3,140.23 \pm 464.80^{\text{a}}$
3	ม.ค. 2559	ตะกั่วทุ่ง, พังงา	<i>Dysidea</i> sp.	PSU-KSAAHRC MS3	แดง	$527.12 \pm 126.00^{\text{b}}$
4	ธ.ค. 2559	ตะกั่วทุ่ง, พังงา	<i>Stylissa carteri</i>	PSU-KSAAHRC MS4	แดง	$372.73 \pm 94.37^{\text{bcd}}$
			<i>Stylissa carteri</i>	PSU-KSAAHRC MS5	แดงอมส้ม	$425.97 \pm 92.38^{\text{bc}}$
			<i>Stylissa carteri</i>	PSU-KSAAHRC MS6	แดงอมส้ม	$44.55 \pm 4.79^{\text{cd}}$
			<i>Stylissa carteri</i>	PSU-KSAAHRC MS7	เหลือง	$0.00 \pm 0.00^{\text{d}}$
			<i>Callyspongia diffusa</i>	PSU-KSAAHRC MS8	แดงอ่อน	$31.09 \pm 3.19^{\text{cd}}$

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีตัวอักษรต่างกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

3.2 การคัดเลือกแบคทีเรียชนิดที่สามารถผลิตสารสีปริมาณสูงที่สุด

การวิเคราะห์ปริมาณสารสีของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตเมตริก อนุบาลิซิส พบว่าแบคทีเรียทั้ง 8 ไอโซเลตที่แยกได้จากฟองน้ำทะเลสามารถผลิตสารสีได้ในช่วง 0-3,140.23 ไมโครกรัมต่อกรัม โดยพบว่าแบคทีเรียไอโซเลต PSU-KSAAHRC MS7 ไม่ผลิตสารสี ส่วนแบคทีเรียไอโซเลต PSU-KSAAHRC MS2 สามารถผลิตสารสีได้สูงสุดคือ $3,140.23 \pm 464.80$ ไมโครกรัมต่อกรัม (ตารางที่ 4) เมื่อนำสารสีที่สกัดได้จากแบคทีเรียไปทดสอบด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี พบว่าสารสีที่สกัดจากแบคทีเรียไอโซเลต PSU-KSAAHRC MS2 แยกออกเป็น 3 แถบบนแผ่น TLC โดยแถบที่ 1 เป็นสารที่มีสีชมพู แถบที่ 2 เป็นสารที่มีสีแดงอมส้ม และแถบที่ 3 เป็นสารที่มีสีชมพูอ่อน เมื่อนำสารสีที่แยกได้จากแผ่น TLC ทั้ง 3 แถบ ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 400-600 นาโนเมตร พบว่าสารสีแถบที่ 1 มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 537 นาโนเมตร สารสีแถบที่ 2 มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 535 นาโนเมตร และสารสีแถบที่ 3 มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 539 นาโนเมตร และการวิเคราะห์หามวลโมเลกุลของสารสีทั้ง 3 แถบที่แยกได้จากแผ่น TLC ด้วยเทคนิคแมส สเปกโตรเมตรี พบว่าสารสีทั้งสามแถบบมีน้ำหนักโมเลกุล 324.20, 324.20 และ 322.19 ดาลตัน ตามลำดับ (ภาพที่ 4) การวิเคราะห์ข้อมูลเบื้องต้นพบว่ารูปแบบของการดูดกลืนแสงและน้ำหนักโมเลกุลของสารสีทั้ง 3 แถบมีลักษณะใกล้เคียงกับสารสีโพรดิจิโอะซิน

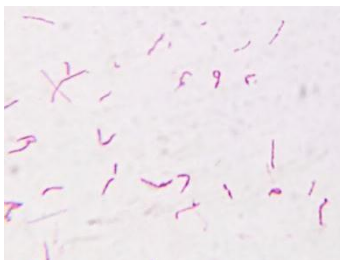
เนื่องจากแบคทีเรียไอโซเลต PSU-KSAAHRC MS2 สามารถผลิตสารสีได้สูงสุดจึงเลือกแบคทีเรียไอโซเลตดังกล่าวสำหรับการศึกษาต่อไป



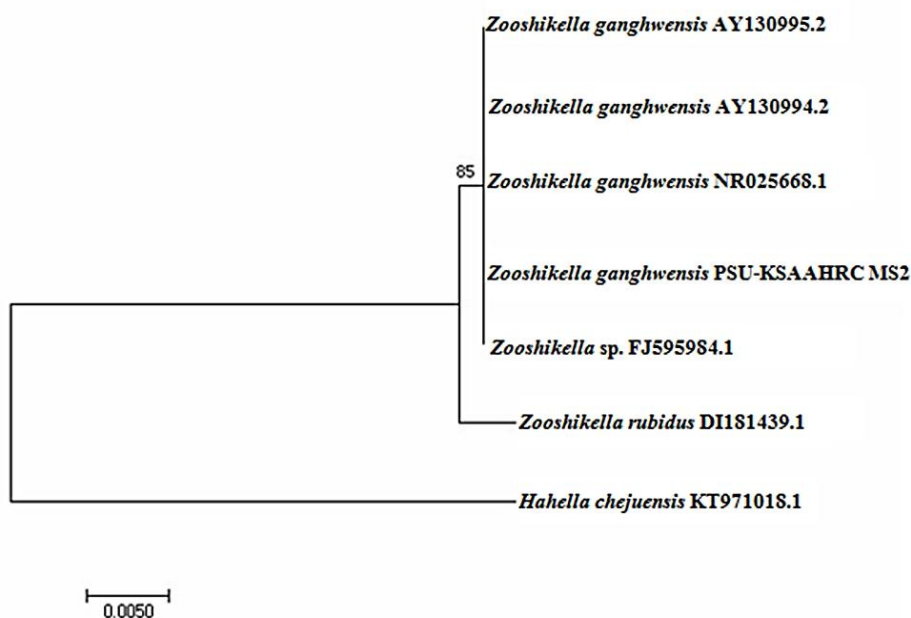
ภาพที่ 4 แสดงลักษณะการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 400-600 นาโนเมตร และผลการวิเคราะห์แมส สเปกโตรเมตรีของสารสีทั้ง 3 แถบจากแผ่น TLC (a) รูปแบบของการดูดกลืนแสงและผลแมส สเปกโตรเมตรีของสารสีแถบที่ 1 (b) รูปแบบของการดูดกลืนแสงและผลแมส สเปกโตรเมตรีของสารสีแถบที่ 2 (c) รูปแบบของการดูดกลืนแสงและผลแมส สเปกโตรเมตรีของสารสีแถบที่ 3

3.3 การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย

การทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพและชีวเคมีของแบคทีเรีย PSU- KSAAHRC MS2 พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง (ภาพที่ 5) สามารถผลิตเอนไซม์ออกซิเดส คาทาเลส เจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Marine agar มีโคโลนีสีแดงเข้ม สามารถผลิตสารสีโพรดิจิโอสิน และการจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *16s rDNA* โดยอาศัยเทคนิค Phylogenetic analysis พบว่าลำดับเบสของยีน *16s rDNA* ของแบคทีเรีย PSU- KSAAHRC MS2 มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรีย *Zooshikella ganghwensis* (GenBank accession number AY130995.2, AY130994.2 และ NR025668.1) คิดเป็น 99 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 6)



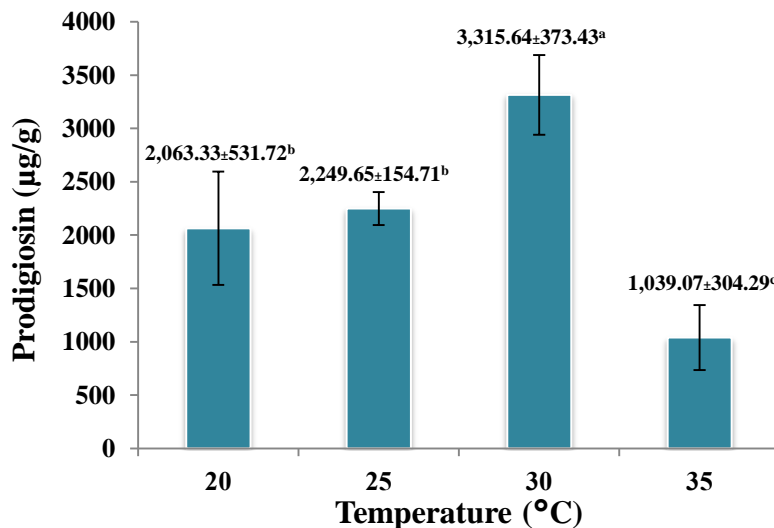
ภาพที่ 5 แสดงลักษณะแกรมลบ รูปแท่ง ของแบคทีเรีย *Z. ganghwensis* PSU- KSAAHRC MS2



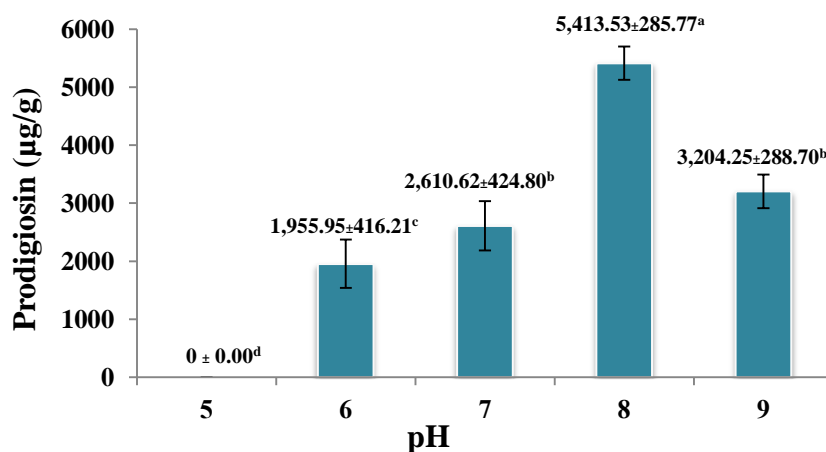
ภาพที่ 6 Phylogenetic tree ของแบคทีเรีย *Z. ganghwensis* PSU-KSAAHRC MS2 ที่ทำการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *16s rDNA* กับแบคทีเรีย *Z. ganghwensis* จากฐานข้อมูลใน GenBank ด้วยวิธี Neighbour Joining

3.4 การศึกษาปัจจัยทางกายภาพที่เหมาะสมต่อการผลิตสารสีของแบคทีเรีย

การศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตสารสีโพรดิจิโอินของแบคทีเรียในอาหาร Marine broth ที่อุณหภูมิ 20, 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.6 ± 0.2 พบว่าแบคทีเรีย *Z. ganghwensis* PSU-KSAAHRC MS2 สามารถผลิตสารสีโพรดิจิโอินได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยสามารถผลิตสารสีได้ $3,315.64 \pm 373.43$ ไมโครกรัมต่อกรัม (ภาพที่ 7) และเมื่อนำมาศึกษาผลของค่าความเป็นกรด-ด่างต่อการผลิตสารสีโพรดิจิโอินที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5, 6, 7, 8 และ 9 พบว่าแบคทีเรียชนิดนี้ไม่สามารถเจริญเติบโตที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5 แต่แบคทีเรียชนิดนี้ผลิตสารสีโพรดิจิโอินได้สูงที่สุดที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 8 โดยสามารถผลิตสารสีได้ $5,413.53 \pm 285.77$ ไมโครกรัมต่อกรัม (ภาพที่ 8) ดังนั้นในงานวิจัยชิ้นนี้จึงใช้อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรด-ด่าง 8 ในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเพื่อเก็บเกี่ยวเซลล์ที่ได้ใช้สำหรับการทดลองต่อไป



ภาพที่ 7 แสดงผลของอุณหภูมิต่อการผลิตสารสีโพรดิจิโอินของแบคทีเรีย *Z. ganghwensis* PSU-KSAAHRC MS2



ภาพที่ 8 แสดงผลของความเป็นกรด-ด่างต่อการผลิตสารสี โพรดิจีโอซินของแบคทีเรีย *Z. ganghwensis* PSU-KSAAHRC MS2

3.5 การศึกษาผลของแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารสีต่อการเจริญเติบโต ระบบภูมิคุ้มกัน และความต้านทานโรคในกุ้งขาว

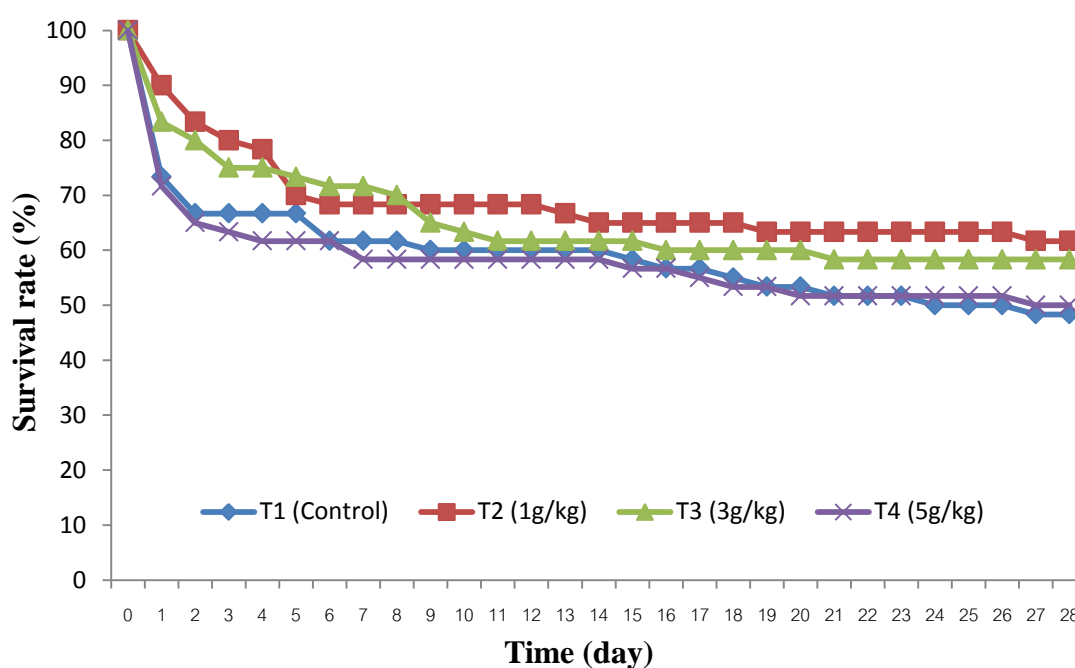
3.5.1 การเจริญเติบโตและความต้านทานเชื้อแบคทีเรีย

น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น ปริมาณอาหารที่กึ่งกิน อัตราการเจริญเติบโต และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของกุ้งขาวที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* หลังได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ แสดงไว้ในตารางที่ 5 จากการทดลองพบว่า น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโต และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ของกุ้งในชุดการทดลองที่ 2 ที่ได้รับอาหารผสมเซลล์แบคทีเรีย 1 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นจากชุดการทดลองอื่นๆ แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$) การศึกษาอัตราการรอดของกุ้งขาวที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* หลังได้รับอาหารทดลองในสูตรต่างๆ พบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารผสมเซลล์แบคทีเรีย 1 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร มีความสามารถในการต้านทานเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ได้ดีกว่ากุ้งที่ได้รับอาหารผสมเซลล์แบคทีเรีย 3 และ 5 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร และกุ้งที่ได้รับอาหารในชุดควบคุม โดยกุ้งขาวในชุดการทดลองที่ 2 ที่ได้รับอาหารผสมเซลล์แบคทีเรีย 1 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร มีอัตราการรอดสูงสุดคือ 61.67 ± 24.66 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$) รองลงมาคือกุ้งในชุดการทดลองที่ 3 ที่ได้รับอาหารผสมเซลล์แบคทีเรีย 3 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร มีอัตราการรอด 58.33 ± 20.21 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกุ้งในชุดการทดลองที่ 4 ที่ได้รับอาหารผสมเซลล์แบคทีเรีย 5 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร และกุ้งในชุดควบคุมมีอัตราการรอด 50.00 ± 20.00 และ 48.33 ± 2.89 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ภาพที่ 9)

ตารางที่ 5 แสดงประสิทธิภาพการใช้อาหารและการเจริญเติบโตของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารทดลอง ทั้ง 4 สูตรเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

Parameter	Treatment			
	T1	T2	T3	T4
	(Control)	(1g/kg)	(3g/kg)	(5g/kg)
Initial weight (g)	13.61±0.05 ^a	13.49±0.02 ^a	13.60±0.09 ^a	13.55±0.04 ^a
Final weight (g)	14.40±0.00 ^a	14.60±1.54 ^a	14.31±0.64 ^a	14.15±0.19 ^a
Weight gain (%)	5.78±0.38 ^a	8.24±11.26 ^a	5.29±5.46 ^a	4.50±1.73 ^a
Specific growth rate (%/day)	0.20±0.01 ^a	0.27±0.37 ^a	0.18±0.19 ^a	0.16±0.06 ^a
Average daily gain (g/shrimp/day)	0.03±0.00 ^a	0.04±0.05 ^a	0.03±0.03 ^a	0.02±0.01 ^a
Feed intake (g/shrimp)	7.12±0.94 ^a	7.09±0.36 ^a	6.74±1.18 ^a	6.53±0.79 ^a

ค่าเฉลี่ยในแถวที่มีตัวอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$)



ภาพที่ 9 แสดงอัตราการรอดของกุ้งขาวที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* หลังได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

3.5.2 การเปลี่ยนแปลงสีของตัวกุ้ง

การเปลี่ยนแปลงสีตัวของกุ้งขาวที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ที่ได้รับอาหารทดลองในสูตรต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์หลังต้มด้วยน้ำเดือด (ภาพที่ 10) เมื่อนำมาวัดสีด้วยเครื่องคัลเลอร์มิเตอร์พบว่า ค่าความสว่าง ค่าความแดง และค่าความเหลืองบริเวณหัวของกุ้งในทุกชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ยกเว้นค่าความสว่างบริเวณลำตัวของกุ้งในชุดการทดลองที่ 4 ที่ได้รับอาหารผสมเซลล์แบคทีเรีย 5 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร มีค่าความสว่าง 61.66 ± 1.56 ต่ำกว่าชุดการทดลองที่ 2 ที่ได้รับอาหารผสมเซลล์แบคทีเรีย 1 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (65.04 ± 1.38) และชุดควบคุม (64.45 ± 2.30) อย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่แตกต่างจากกุ้งในชุดการทดลองที่ 3 ที่ได้รับอาหารผสมเซลล์แบคทีเรีย 3 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (63.25 ± 2.12) ส่วนค่าความแดงและค่าความเหลืองบริเวณลำตัวของกุ้งในทุกชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 แสดงค่าสีตัวของกุ้งขาวที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* หลังได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

Parameter	Treatment			
	T1 (Control)	T2 (1g/kg)	T3 (3g/kg)	T4 (5g/kg)
Carapace				
Lightness (L*)	58.93 ± 4.10^a	60.45 ± 4.55^a	60.41 ± 3.95^a	58.06 ± 3.39^a
Redness (a*)	17.26 ± 4.82^a	15.74 ± 2.63^a	18.38 ± 4.50^a	16.16 ± 2.66^a
Yellowness (b*)	27.32 ± 6.69^a	27.97 ± 2.63^a	29.39 ± 4.50^a	27.66 ± 2.66^a
Abdomen				
Lightness (L*)	64.45 ± 2.30^a	65.04 ± 1.38^a	63.25 ± 2.12^{ab}	61.66 ± 1.56^b
Redness (a*)	17.06 ± 3.30^a	15.44 ± 4.23^a	15.74 ± 3.46^a	14.98 ± 3.41^a
Yellowness (b*)	24.61 ± 4.39^a	23.01 ± 5.94^a	22.30 ± 5.81^a	24.19 ± 3.76^a

ค่าเฉลี่ยในแถวที่มีตัวอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$)

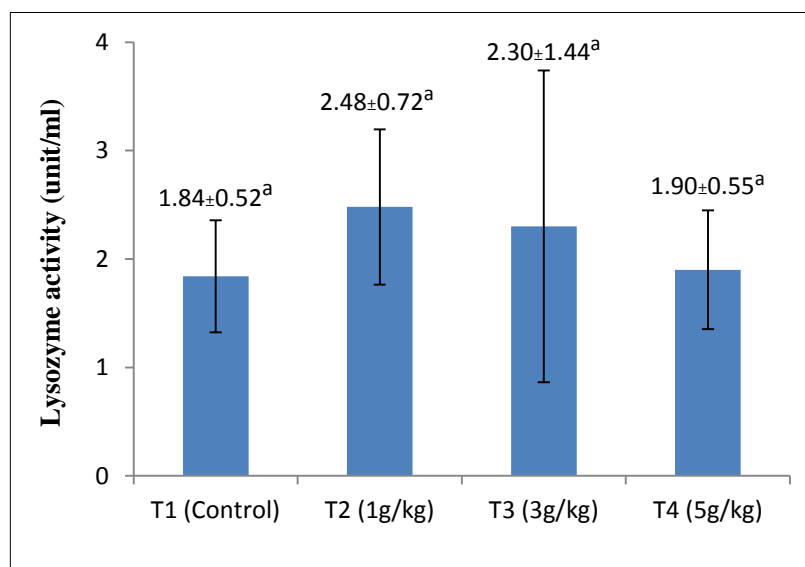


ภาพที่ 10 แสดงสีของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารทดลองในสูตรต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์หลังผ่านการต้ม นาน 3 นาที

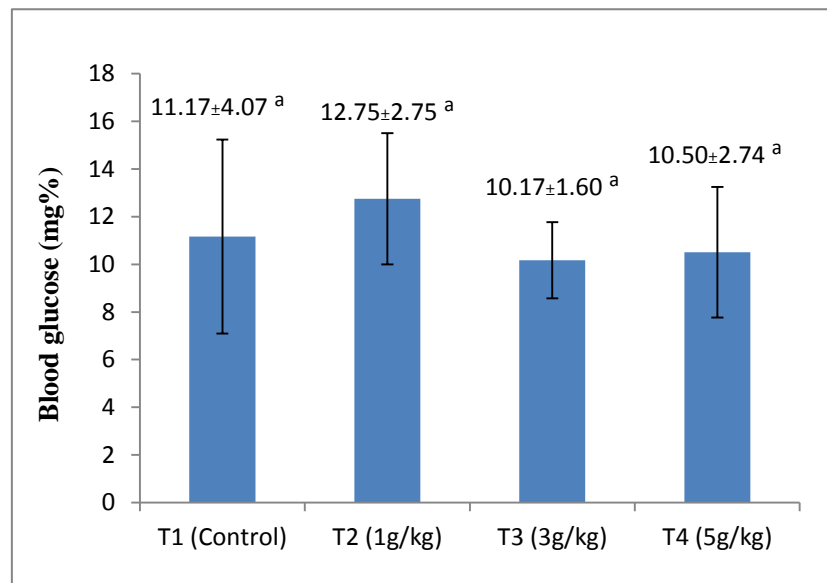
3.5.3 องค์ประกอบเลือดของกุ้งขาว

การศึกษาองค์ประกอบเลือดของกุ้งขาวที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* หลังได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าปริมาณเอนไซม์ไลโซไซม์ ปริมาณน้ำตาลในเลือด และปริมาณโปรตีนในน้ำเลือดของกุ้งทุกชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) โดยมีปริมาณเอนไซม์ไลโซไซม์อยู่ในช่วง 1.84 ± 0.52 ถึง 2.48 ± 0.72 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 11) ปริมาณน้ำตาลในเลือดอยู่ในช่วง 10.17 ± 1.60 ถึง 12.75 ± 2.75 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 12) และปริมาณโปรตีนในน้ำเลือดอยู่ในช่วง 125.83 ± 13.8 ถึง 137.92 ± 10.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 13) แต่ปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งในชุดการทดลองที่ 2 ที่ได้รับอาหารผสมเซลล์แบคทีเรีย 1 กรัมต่อกิโลกรัมอาหารมีค่าสูงที่สุดคือ $3.73\pm 0.70\times 10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร แตกต่างจากกุ้งในชุดการทดลองที่ 4 ที่ได้รับอาหารผสมเซลล์แบคทีเรีย 5 กรัมต่อกิโลกรัมอาหารและชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) แต่ไม่แตกต่างจากกุ้งในชุดการทดลองที่ 3 ที่ได้รับอาหารผสมเซลล์แบคทีเรีย 3 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (ภาพที่ 14)

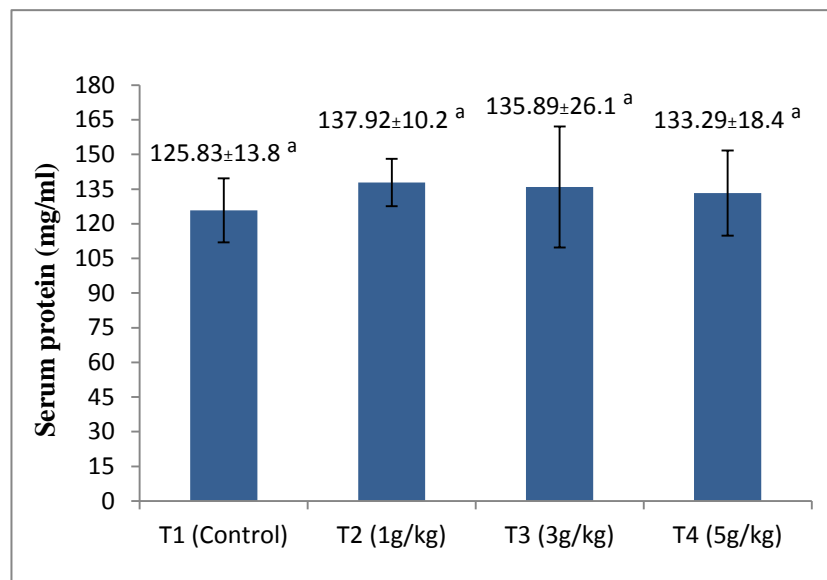
การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสของกุ้งขาวที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ที่ได้รับอาหารทดลองในสูตรต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่ากุ้งในชุดการทดลองที่ 2 ที่ได้รับอาหารผสมเซลล์แบคทีเรีย 1 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร มีกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสสูงที่สุดคือ 19.57 ± 1.23 หน่วยต่อนาที่ต่อมิลลิกรัมโปรตีน แตกต่างจากกุ้งในชุดการทดลองอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (ภาพที่ 15) เช่นเดียวกับกิจกรรมการจับกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytosis) และค่าดัชนีการจับกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytic index) ของกุ้งในชุดการทดลองที่ 2 ที่มีค่าเท่ากับ 54.33 ± 0.76 เปอร์เซ็นต์ และ 42.82 ± 0.66 สูงกว่ากุ้งในชุดการทดลองอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (ภาพที่ 16-17) แต่ค่าเฉลี่ยของเม็ดพลาสติกที่ถูกจับกินต่อเซลล์เม็ดเลือดกุ้ง (average number of the bead ingested per cell) ในชุดการทดลองที่ 4 มีค่าต่ำที่สุด 1.28 ± 0.06 แตกต่างจากชุดการทดลองที่ 2 และชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับชุดการทดลองที่ 3 ($p > 0.05$) (ภาพที่ 18)



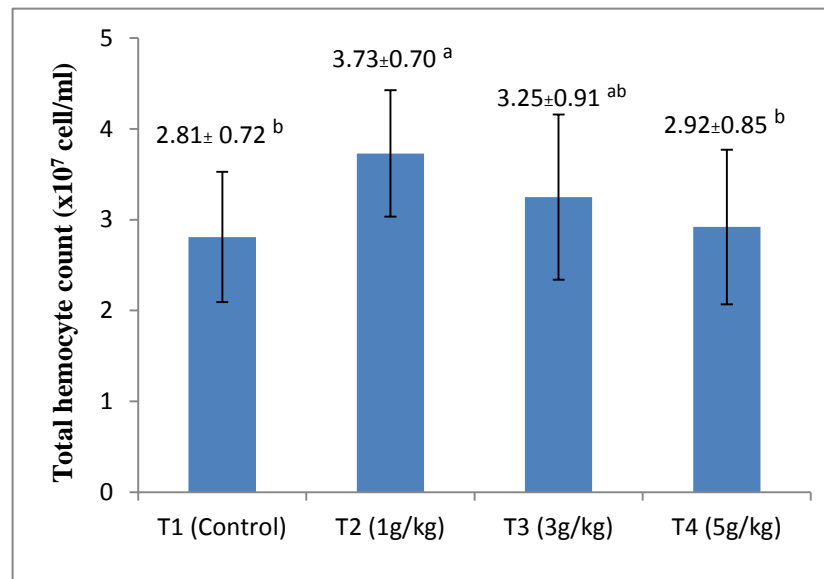
ภาพที่ 11 แสดงปริมาณเอนไซม์ไลโซไซม์ของกุ้งขาวที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* หลังได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์



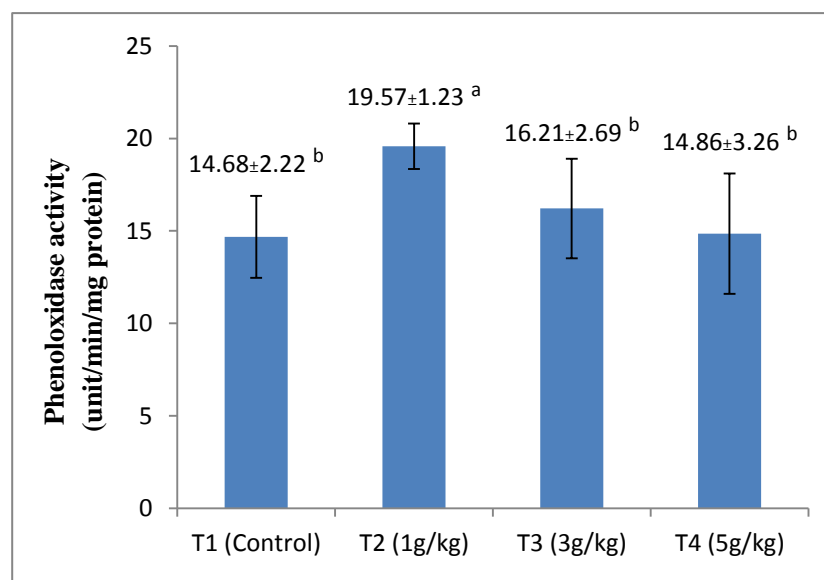
ภาพที่ 12 แสดงปริมาณน้ำตาลในเลือดของกุ้งขาวที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* หลังได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์



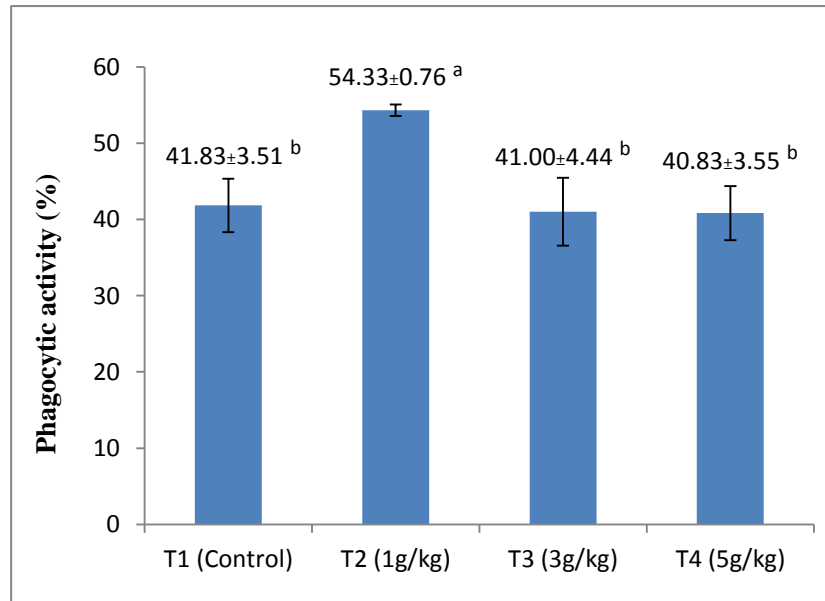
ภาพที่ 13 แสดงปริมาณโปรตีนในน้ำเลือดของกุ้งขาวที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* หลังได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์



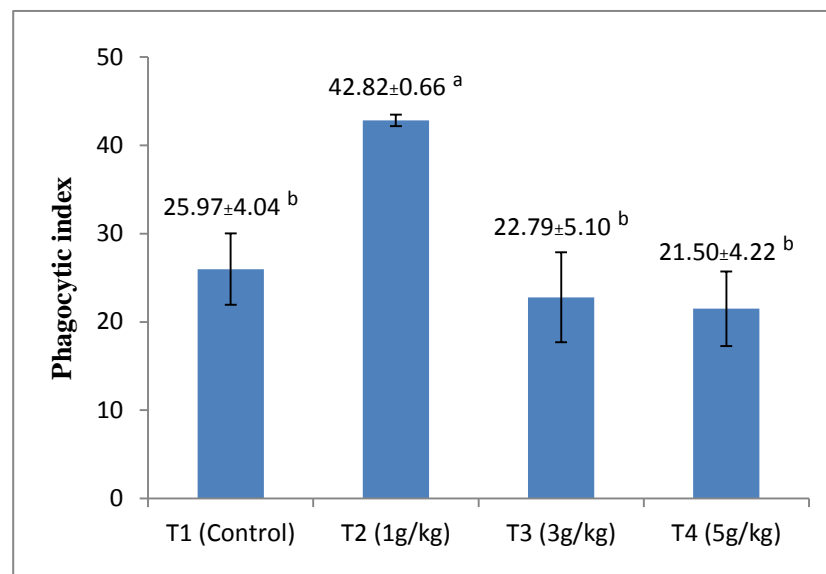
ภาพที่ 14 แสดงปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งขาวที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* หลังได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์



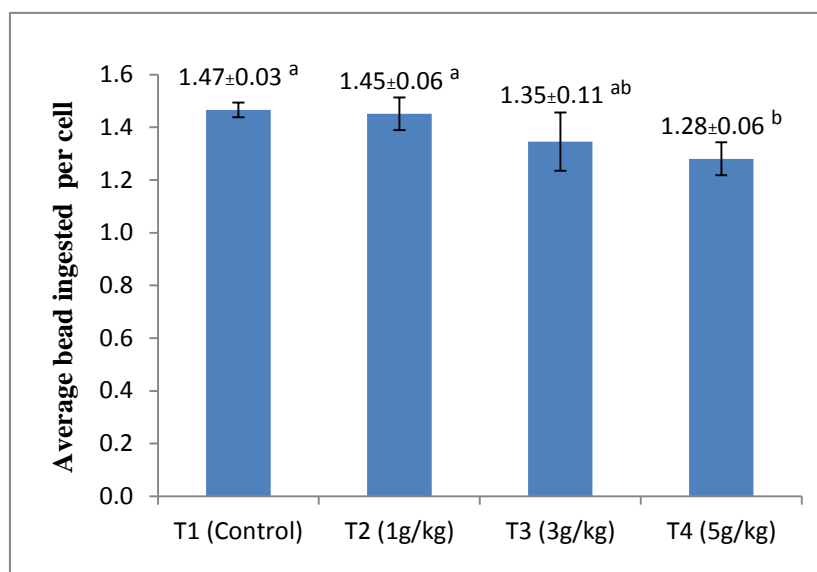
ภาพที่ 15 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในกุ้งขาวที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* หลังได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์



ภาพที่ 16 แสดงกิจกรรมการจับกินสิ่งแปลกปลอมของกุ้งขาวที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* หลังได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์



ภาพที่ 17 แสดงดัชนีการจับกินสิ่งแปลกปลอมของกุ้งขาวที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* หลังได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์



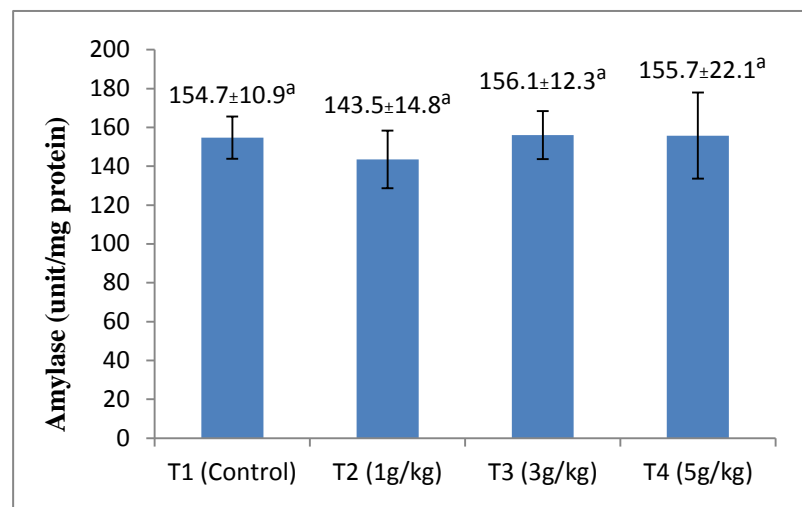
ภาพที่ 18 แสดงค่าเฉลี่ยของเม็ดพลาสติกที่ถูกจับกินต่อเซลล์เม็ดเลือดกึ่งขาวที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* หลังได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

3.5.4 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์

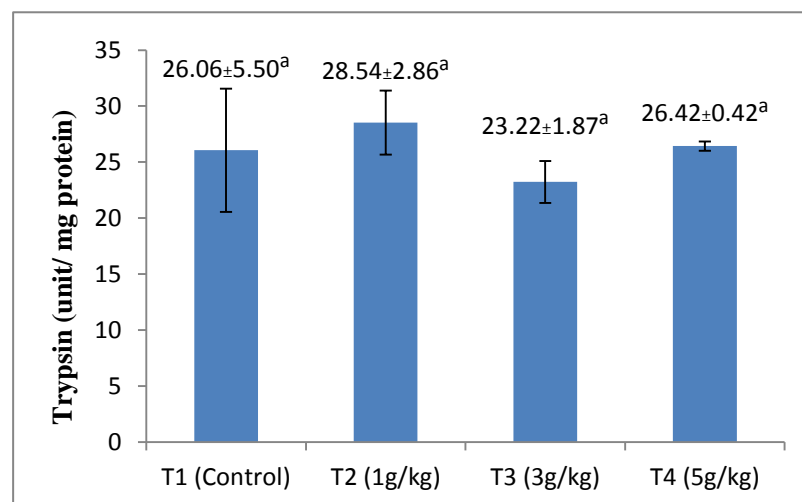
การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ในตับและตับอ่อนของกึ่งขาวที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* หลังได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหาร ได้แก่เอนไซม์อะไมเลส ทริปซิน ไคโมทริปซิน และไลเปส ของกึ่งขาวในแต่ละชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$) โดยกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสมีค่าอยู่ในช่วง 143.5 ± 14.8 ถึง 165.1 ± 12.3 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน (ภาพที่ 19) กิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินมีค่าอยู่ในช่วง 23.22 ± 1.87 ถึง 28.54 ± 2.86 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน (ภาพที่ 20) กิจกรรมของเอนไซม์ไคโมทริปซินมีค่าอยู่ในช่วง 8.23 ± 1.30 ถึง 9.54 ± 1.02 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน (ภาพที่ 21) และกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสมีค่าอยู่ในช่วง 0.081 ± 0.02 ถึง 0.086 ± 0.03 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน (ภาพที่ 22)

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ด้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ กิจกรรมของเอนไซม์คาตาเลส กิจกรรมของเอนไซม์กลูตาไรโอนเปอร์ออกซิเดส และการวิเคราะห์ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ของกึ่งขาวที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* หลังได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์คาตาเลสของกึ่งขาวในชุดการทดลองที่ 2 ที่ได้รับอาหารผสมเซลล์แบคทีเรีย 1 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร มีค่าสูงที่สุดคือ 73.40 ± 24.6 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน แตกต่างจากกึ่งขาวในชุดการทดลองอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (ภาพที่ 23) แต่กิจกรรม

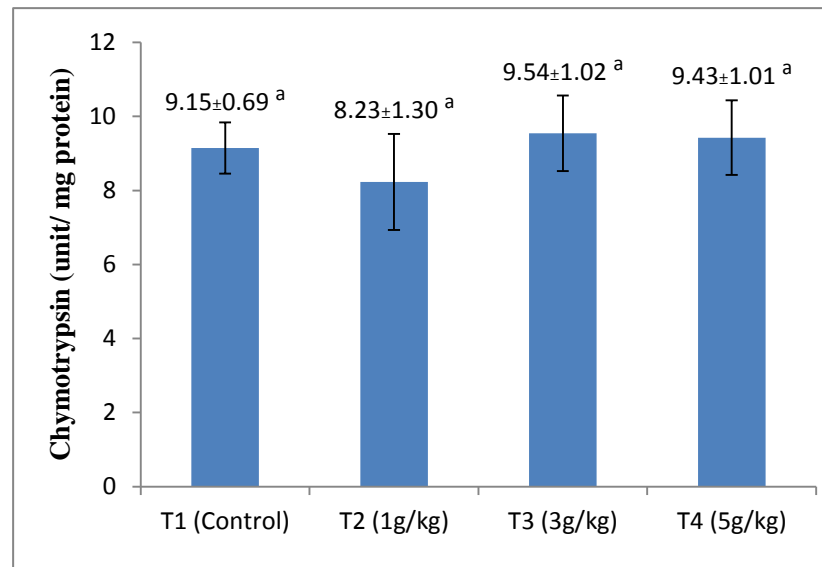
ของเอนไซม์กลูตาไซโอนเปอร้ออกซิเดส และการวิเคราะห์ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ของกุ้งในแต่ละชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูตาไซโอนเปอร้ออกซิเดส อยู่ในช่วง $2,160.09\pm 165.54$ ถึง $2,406.04\pm 191.54$ ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีนและปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์อยู่ในช่วง 36.96 ± 2.44 ถึง 52.10 ± 17.87 ไมโครโมลต่อกรัมตัวอย่าง (ภาพที่ 24-25)



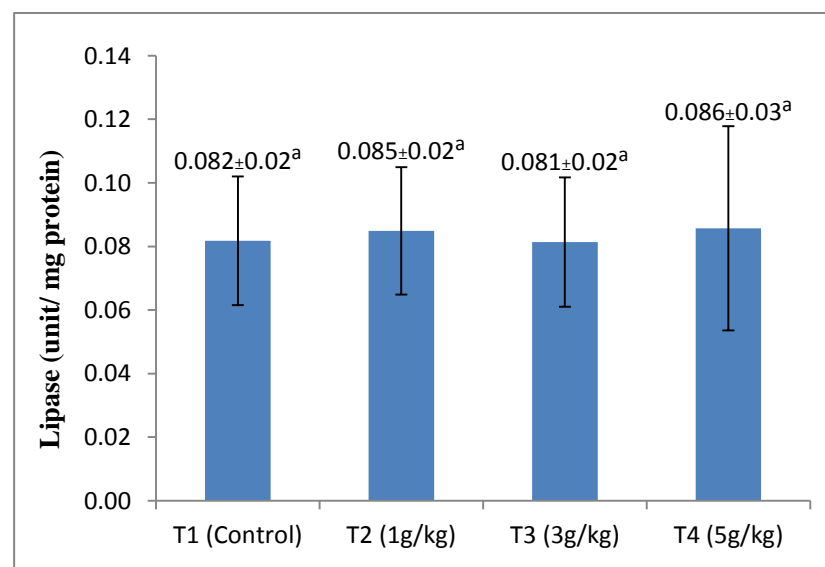
ภาพที่ 19 แสดงกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสของกุ้งขาวที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* หลังได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์



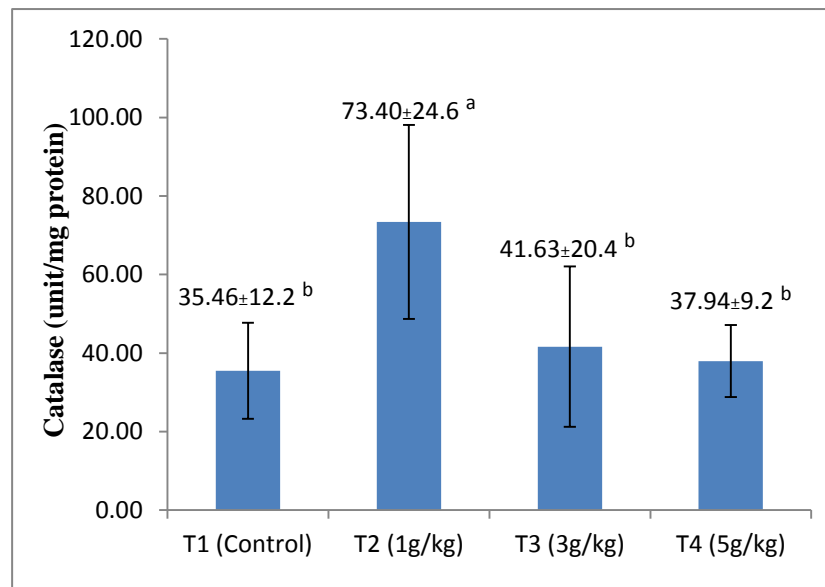
ภาพที่ 20 แสดงกิจกรรมเอนไซม์ทริปซินของกุ้งขาวที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* หลังได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์



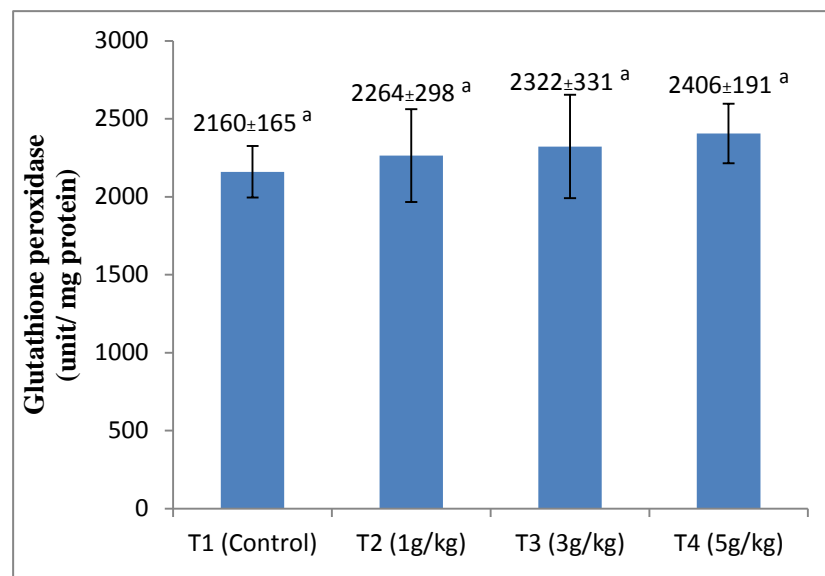
ภาพที่ 21 แสดงกิจกรรมเอนไซม์ไคโมทริปซินของกึ่งขาวที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* หลังได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์



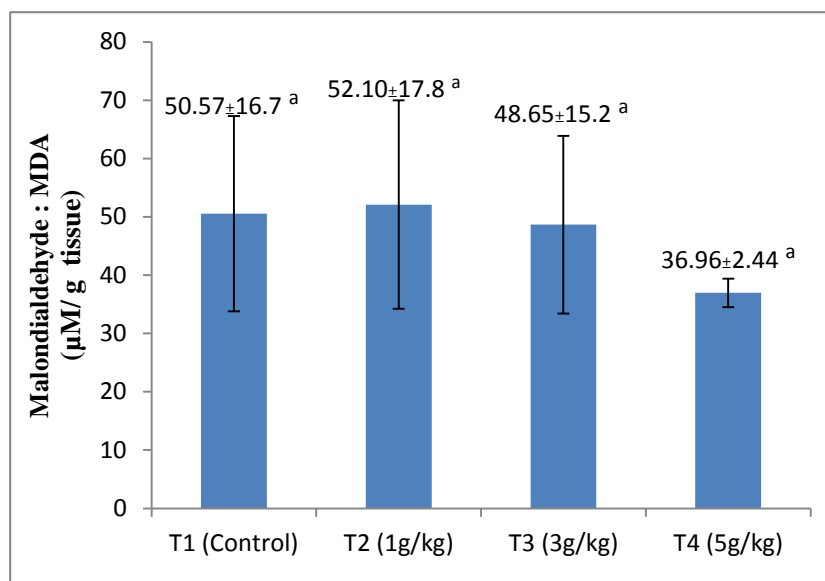
ภาพที่ 22 แสดงกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของกึ่งขาวที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* หลังได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์



ภาพที่ 23 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์คาตาเลสของกึ่งขาที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* หลังได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์



ภาพที่ 24 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (GPx) ของกึ่งขาที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* หลังได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์



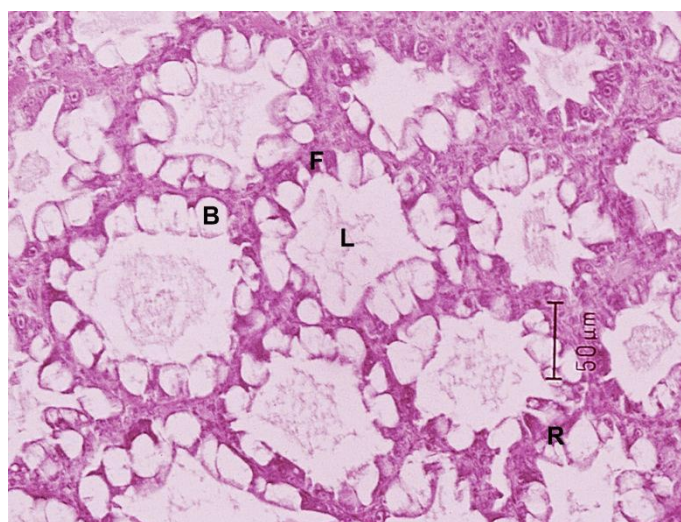
ภาพที่ 25 แสดงปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ของกุ้งขาวที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* หลังได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

3.5.5 การศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนของกุ้งขาว

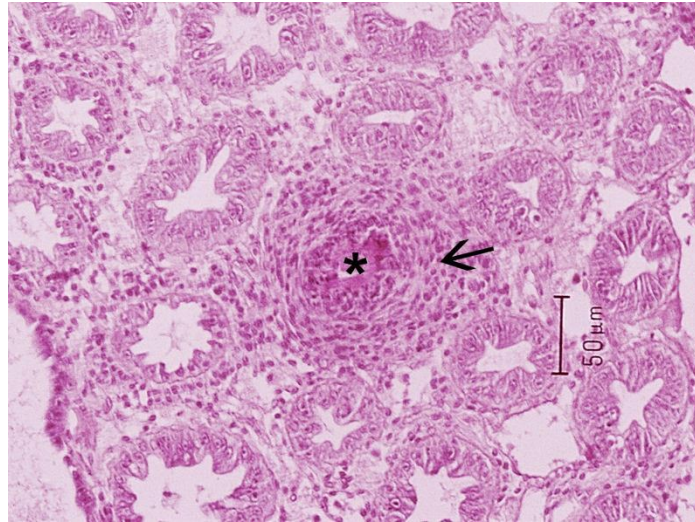
การศึกษการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพตับและตับอ่อนของกุ้งขาวที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* หลังได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนของกุ้งขาวในชุดการทดลองที่ 1 ที่ได้รับอาหารสูตรควบคุมมีการตายของท่อตับ และเกิดการหลุดลอกของเยื่อหุ้มท่อตับ ไม่พบ B-cell, F-cell และ R-cell (ภาพที่ 26) ส่วนเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนของกุ้งขาวในชุดการทดลองที่ 2 ที่ได้รับอาหารผสมเซลล์แบคทีเรีย 1 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร พบเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนค่อนข้างปกติ (ภาพที่ 27) และเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนของกุ้งขาวในชุดการทดลองที่ 3 ที่ได้รับอาหารผสมเซลล์แบคทีเรีย 3 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร พบการตายของท่อตับและมีเม็ดเลือดแทรกตัวอยู่รอบๆท่อตับ (ภาพที่ 28) เช่นเดียวกันกับกุ้งในชุดการทดลองที่ 4 ที่ได้รับอาหารผสมเซลล์แบคทีเรีย 5 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร พบการตายของท่อตับและมีเม็ดเลือดแทรกตัวอยู่รอบๆท่อตับเป็นจำนวนมาก (ภาพที่ 29)



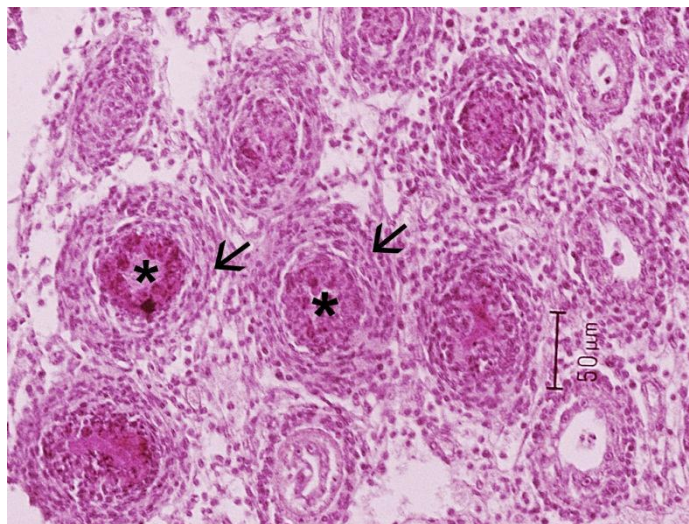
ภาพที่ 26 แสดงเนื้อเยื่อต้นและต้นอ่อนของกุ่มขาวที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* หลังได้รับอาหารสูตรควบคุม เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบการตายของท่อต้น (ดอกจัน) และการหลุดลอกของเซลล์เยื่อท่อต้น ไม่พบ B-cell, F-cell และ R-cell (ศรชี้) (H&E, bar = 50 µm)



ภาพที่ 27 แสดงเนื้อเยื่อต้นและต้นอ่อนของกุ่มขาวที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* หลังได้รับอาหารทดลองที่ผสมเซลล์แบคทีเรีย 1 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบเนื้อเยื่อต้นและต้นอ่อนค่อนข้างปกติ ประกอบด้วยท่อต้น (L), B-cell (B), F-cell (F) และ R-cell (R) (H&E, bar = 50 µm)



ภาพที่ 28 แสดงเนื้อเยื่ออัณฑะและอัณฑะอ่อนของกึ่งขาวที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* หลังได้รับอาหารทดลองที่ผสมเซลล์แบคทีเรีย 3 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบการตายของท่ออัณฑะ (ดอกจัน) และมีเม็ดเลือดแทรกตัวอยู่รอบๆ ท่ออัณฑะ (ศรชี้) (H&E, bar = 50 μ m)



ภาพที่ 29 แสดงเนื้อเยื่ออัณฑะและอัณฑะอ่อนของกึ่งขาวที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* หลังได้รับอาหารทดลองที่ผสมเซลล์แบคทีเรีย 5 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบการตายของท่ออัณฑะ (ดอกจัน) และมีเม็ดเลือดแทรกตัวอยู่รอบๆท่ออัณฑะ (ศรชี้) เป็นจำนวนมาก (H&E, bar = 50 μ m)

บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

ฟองน้ำทะเลเป็นสัตว์ในกลุ่มเมทาซัวเก่าแก่ที่สุดที่ยังหลงเหลืออยู่ (Malooof *et al.*, 2010; Jackson *et al.*, 2015) ฟองน้ำทะเลมีลักษณะการกินแบบกรองกิน โดยจะกรองกินอาหารจากน้ำทะเลที่อยู่รอบๆและยังเป็นที่อยู่อาศัยให้กับสิ่งมีชีวิตหลายชนิดเช่น อาร์เคียแบคทีเรีย และไวรัส ด้วยเหตุผลนี้ทำให้สามารถพบแบคทีเรียได้หลากหลายชนิดภายในเนื้อเยื่อของฟองน้ำทะเล (Jackson *et al.*, 2015) ตัวอย่างแบคทีเรียที่สามารถพบได้ในฟองน้ำทะเลเช่น *Pasteurella* sp., *Pseudomonas* sp. และ *Acinetobacter* sp. เป็นต้น (Kefalus *et al.*, 2003) แบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลเป็นแหล่งผลิตสารสีที่สำคัญในธรรมชาติ (Thawornwiriyanun *et al.*, 2009; Ibrahim *et al.*, 2014) การศึกษาครั้งนี้สามารถเก็บตัวอย่างฟองน้ำทะเลจากจังหวัดสตูล และพังงา ได้ 5 ชนิด ในเบื้องต้นสามารถแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารสีจากฟองน้ำทะเลได้จำนวน 18 ไอโซเลต แต่พบว่าแบคทีเรียหลายไอโซเลตตายหลังการต่อเชื้อบนอาหารใหม่ (subculture) จึงเหลือแบคทีเรียทั้งหมด 8 ไอโซเลต ทั้งนี้อาจเนื่องจากในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ขาดสารอาหารที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียบางชนิด ทำให้แบคทีเรียตายหลังการต่อเชื้อบนอาหารใหม่ อย่างไรก็ตามพบว่าแบคทีเรียทั้ง 8 ไอโซเลตที่แยกได้จากฟองน้ำทะเลสามารถผลิตสารสีส้ม เหลือง และแดง สอดคล้องกับรายงานของ Thawornwiriyanun และคณะ (2009) พบว่าแบคทีเรียจำนวน 24 ไอโซเลตที่แยกได้จากฟองน้ำทะเล สามารถผลิตสารสีส้ม น้ำตาล เหลือง และแดง เช่นเดียวกับซีรอสต์ (2551) ที่ทำการแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารสีจากสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆในทะเล เช่น สาหร่าย หล้าทะเล ปะการัง และฟองน้ำทะเล พบว่าแบคทีเรียที่ผลิตสารสีแดง เหลือง และส้ม ส่วนใหญ่สามารถแยกได้จากฟองน้ำทะเล

การศึกษานี้พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต PSU-KSAHRC MS2 ที่แยกได้จากฟองน้ำทะเล *Haliclona* sp. สามารถผลิตสารสีได้สูงสุดคือ 3,140.23 ไมโครกรัมต่อกรัม ฟองน้ำทะเล *Haliclona* sp. เป็นฟองน้ำที่จัดอยู่ในครอบครัว Chalimidae ซึ่งสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลายชนิดเช่น ฮาลิโคลนิน-เอ (haliclonin-A) จัดเป็นยาปฏิชีวนะกลุ่มแมกโครไซคลิก (macrocylic) ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียได้หลายชนิด (Jang *et al.*, 2009) และฮาลิคราสเตอร์อล ดี (halicrasterols D) เป็นสารประกอบที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก (Cheng *et al.*, 2013) นอกจากนี้ยังมี

รายงานถึงความสามารถในการยับยั้งเชื้อราของสารสกัดจากฟองน้ำทะเล *Haliclona* sp. อีกด้วย (Nazemi *et al.*, 2014) แม้ว่าฟองน้ำทะเลเป็นแหล่งที่สำคัญของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ แต่การนำฟองน้ำทะเลมาใช้ประโยชน์ในปริมาณมากๆ นั้นทำได้ยาก อีกทั้งการเพาะเลี้ยงฟองน้ำทะเลก็เป็นเรื่องยากเช่นเดียวกัน ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลจึงเป็นทางเลือกใหม่ที่น่าสนใจเนื่องจากแบคทีเรียมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว และเพาะเลี้ยงได้ง่ายกว่าฟองน้ำทะเล (Silberhorn *et al.*, 2008; Leal *et al.*, 2014)

การศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นประเด็นที่น่าสนใจ Asagabaldan และคณะ (2016) รายงานว่าแบคทีเรีย *Chromohalobacter salixigens* ที่แยกได้จากฟองน้ำทะเล *Haliclona* sp. มีคุณสมบัติในการผลิตสารต้านจุลชีพที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อต่อยาปฏิชีวนะได้ การศึกษาคุณสมบัติและการจำแนกชนิดของสารสีแดงที่ผลิตจากแบคทีเรียไอโซเลต PSU-KSAAHRC MS2 ที่แยกได้จากฟองน้ำทะเลในการศึกษารังนี้พบว่าสารสีแดงที่แบคทีเรียชนิดนี้ผลิตเป็นสาร โพรดิจิโอะซิน ซึ่งมีรูปแบบการดูดกลืนแสงที่ใกล้เคียงกับสารสีโพรดิจิโอะซิน ตามรายงานของ Araújo และคณะ (2010) ที่พบว่าสารสีโพรดิจิโอะซินที่ผลิตจากแบคทีเรีย *S. marcescens* UCP 1549 มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 536 นาโนเมตร เช่นเดียวกับ Allen (1967) ที่รายงานว่าสารสีโพรดิจิโอะซินที่ผลิตจากแบคทีเรีย *S. marcescens* มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดในช่วงความยาวคลื่น 535-540 นาโนเมตร นอกจากนี้การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของสารสีที่ผลิตจากแบคทีเรียชนิดนี้ให้ผลการทดลองใกล้เคียงกับน้ำหนักโมเลกุลของโพรดิจิโอะซินที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Serratia* sp. ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 324 ดาลตัน (Jimtha *et al.*, 2017) โพรดิจิโอะซินเป็นสารสีแดงในธรรมชาติ จัดเป็นสารเมแทบอลิท์ทุติยภูมิกลุ่มอัลคาลอยด์ โครงสร้างทางเคมีมีลักษณะเป็นวงแหวนไพโรล (pyrrole) สามวงต่อกัน มีน้ำหนักโมเลกุล 324 ดาลตัน (Araújo *et al.*, 2010)

การจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยอาศัยเทคนิค Phylogenetic analysis พบว่าลำดับเบสของยีน *16s rDNA* ของแบคทีเรียไอโซเลต PSU- KSAAHRC MS2 มีความใกล้เคียงกับลำดับเบสของยีน *16s rDNA* ของแบคทีเรีย *Z. ganghwensis* ในฐานข้อมูล GenBank ถึง 99 เปอร์เซ็นต์ การทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา กายภาพ และชีวเคมี พบว่าแบคทีเรียชนิดนี้เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง สามารถผลิตเอนไซม์ออกซิเดส คาทาเลส เจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ marine agar

มีโคโลนีสีแดงเข้ม และสามารถผลิตสารสีแดงคือโพรดิจิโอะซิน สอดคล้องกับ Yi และคณะ (2003) ได้รายงานเกี่ยวกับแบคทีเรีย *Z. ganghwensis* ที่แยกได้จากตะกอนดินว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง ต้องการเกลือในการเจริญเติบโต 1-7 เปอร์เซ็นต์ สามารถผลิตเอนไซม์ออกซิเดส คาตาเลส เจริญเติบโตได้บนอาหาร yeast extract agar, medium B, YTSS agar และ marine agar ให้โคโลนีสีเหลืองแดง หรือ สีแดง และสามารถผลิตสารสีแดงภายในเซลล์ที่ไม่ละลายน้ำคือ โพรดิจิโอะซิน ซึ่งมีรายงานการค้นพบแบคทีเรีย *Z. ganghwensis* เป็นครั้งแรกที่ประเทศเกาหลี (Yi *et al.*, 2003) ต่อมา มีรายงานการค้นพบในประเทศมาเลเซีย (Jafarzade *et al.*, 2013) และซาอุดีอาระเบีย (Rehman *et al.*, 2018) จากข้อมูลของผู้วิจัย การศึกษาครั้งนี้อาจเป็นการแยกเชื้อแบคทีเรีย *Z. ganghwensis* จากฟองน้ำทะเลได้เป็นครั้งแรกในประเทศไทย

การศึกษาปัจจัยทางกายภาพที่เหมาะสมต่อการผลิตสารสีโพรดิจิโอะซินของแบคทีเรีย *Z. ganghwensis* PSU- KSAAHRC MS2 พบว่าแบคทีเรียชนิดนี้สามารถผลิตสารสีโพรดิจิโอะซินได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สอดคล้องกับรายงานของ Sundaramoorthy และคณะ (2009) ที่พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตสาร โพรดิจิโอะซินของแบคทีเรีย *S. marcescens* คืออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และใกล้เคียงกับผลการศึกษาของ Shaikh (2016) ที่ศึกษาการผลิตสาร โพรดิจิโอะซินของแบคทีเรีย *S. marcescens* ที่อุณหภูมิ -20, 0, 27, 37 และ 50 องศาเซลเซียส โดยพบว่าแบคทีเรียสามารถผลิตสาร โพรดิจิโอะซิน ได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส แต่เมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นเป็น 37 องศาเซลเซียสแบคทีเรียชนิดนี้กลับไม่สามารถผลิตสารโพรดิจิโอะซินได้ ซึ่ง Giri และคณะ (2004) กล่าวว่าการผลิตโพรดิจิโอะซินภายในเซลล์แบคทีเรีย *S. marcescens* จะถูกขัดขวางเมื่ออุณหภูมิในอาหารเลี้ยงเชื้อสูงกว่า 30 องศาเซลเซียส และ Shaikh (2016) ให้เหตุผลว่าการสังเคราะห์โพรดิจิโอะซินในขั้นตอนการรวม โมโนไพร์โรล (monopyrrole) เข้ากับไบไพร์โรล (bipyrrole) เพื่อให้เกิดเป็นโพรดิจิโอะซินนั้นเป็นขั้นตอนที่ไวต่ออุณหภูมิสูงจึงทำให้แบคทีเรีย *S. marcescens* ไม่สามารถผลิตโพรดิจิโอะซินได้ในสภาวะที่อุณหภูมิสูง เมื่อนำแบคทีเรีย *Z. ganghwensis* PSU- KSAAHRC MS2 มาศึกษาผลของค่าความเป็นกรด-ด่าง ต่อการผลิตสารโพรดิจิโอะซิน พบว่าแบคทีเรียชนิดนี้ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5 แต่สามารถผลิตสารสีโพรดิจิโอะซินได้สูงที่สุดที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 8 ใกล้เคียงกับการศึกษาของ Shaikh (2016) ที่พบว่าแบคทีเรีย *S. marcescens* สามารถผลิตสารสีโพรดิจิโอะซินได้ดีที่สุดที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.5 และ

สอดคล้องกับ Elkenawy และคณะ (2017) ที่รายงานว่าแบคทีเรีย *S. marcescens* ผลิตโพรดิจีโอซิน ได้สูงสุดที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 9

การศึกษาครั้งนี้พบว่าการเจริญเติบโตของกุ้งขาวที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ที่ได้รับอาหารทั้ง 4 ชุดการทดลองเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) ใกล้เคียงกับการศึกษาของ Suantika และคณะ (2018) ที่รายงานว่ากุ้งขาวที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ก่อนได้รับอาหารทดลองที่ผสมสาหร่ายสีแดง (*Kappaphycus alvarezii*) เป็นระยะเวลา 16 วัน พบว่าการเจริญเติบโตของกุ้งขาวในแต่ละชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างเช่นเดียวกัน ถึงแม้ว่าอาหารที่กุ้งได้รับในการทดลองครั้งนี้จะไม่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตแต่ส่งผลต่ออัตราการรอดตายของกุ้งขาว โดยพบว่ากุ้งขาวที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ที่ได้รับอาหารผสมเซลล์แบคทีเรีย *Z. ganghwensis* 1 และ 3 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร มีอัตราการรอดตาย 61.67 ± 24.66 และ 58.33 ± 20.21 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ สูงกว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารชุดควบคุม (48.33 ± 2.89) สอดคล้องกับการรายงานของ Kim และคณะ 2010 พบว่าปลาซีกเดียว (*Paralichthys olivaceus*) ที่ทำให้ติดเชื้อแบคทีเรีย *S. iniae* ก่อนได้รับอาหารผสมเซลล์แบคทีเรีย *Zooshikella* sp. ที่มีชีวิต ทำให้ปลาซีกเดียวมีอัตราการรอดตายสูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารในชุดควบคุม ทั้งนี้อัตราการรอดของกุ้งขาวที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* หลังได้รับอาหารผสมเซลล์แบคทีเรีย *Z. ganghwensis* มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น อาจมีสาเหตุมาจากสารโพรดิจีโอซิน (prodigiosin) ที่อยู่ภายในเซลล์แบคทีเรีย *Z. ganghwensis* ที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านจุลชีพ (Ibrahim *et al.*, 2014 ; Lapenda *et al.*, 2015) จึงมีส่วนช่วยในการยับยั้งแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ภายในตัวกุ้งทำให้กุ้งขาวมีอัตราการรอดสูงขึ้นหลังการติดเชื้อแบคทีเรีย

จากอดีตจนถึงปัจจุบันมีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับเปปทิโดไกลแคน (peptidoglycan) และไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide) ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบชี้ให้เห็นว่าสารทั้งสองชนิดมีคุณสมบัติในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งได้เป็นอย่างดี (Purivirojkul *et al.*, 2006; Rungrasamee *et al.*, 2013; Apines-Amar and Amar, 2015; Pan *et al.*, 2015) เช่นเดียวกับการทดลองของ Chumpol และคณะ 2018 รายงานว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมเซลล์แบคทีเรีย *Rhodobacter sphaeroides* SS15 และ *Afifella marina* STW181 ซึ่งเป็นแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงกลุ่มไม่สะสมกัมมะถันในอัตราส่วน 1:1 มีแนวโน้ม

ทำให้ปริมาณเม็ดเลือดรวมเพิ่มสูงขึ้น และทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสของกุ้งที่ได้รับอาหารผสมเซลล์แบคทีเรียชนิดนี้สูงขึ้นกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และใกล้เคียงกับรายงานของ Tan และคณะ 2008 พบว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมเซลล์แบคทีเรีย *Arthrobacter* XE-7 ส่งผลให้กุ้งมีระบบภูมิคุ้มกันที่ดีขึ้น โดยทำให้กุ้งมี ปริมาณเม็ดเลือดรวม กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส และความสามารถในการจับกินสิ่งแปลกปลอม สูงแตกต่างจากกุ้งที่ได้รับอาหารในชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ สอดคล้องกับการทดลองในครั้งนี้ที่พบว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมเซลล์แบคทีเรีย *Z. ganghwensis* 1 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร มีปริมาณเม็ดเลือดรวม กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ความสามารถในการจับกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytosis) และค่าดัชนีการจับกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytic index) สูงขึ้นแตกต่างจากกุ้งที่ได้รับอาหารในชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ซึ่งให้เห็นว่าแบคทีเรีย *Z. ganghwensis* มีคุณสมบัติกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ทำให้กุ้งที่ได้รับอาหารผสมเซลล์แบคทีเรียชนิดนี้มีระบบภูมิคุ้มกันที่ดี และมีอัตราการรอดสูงขึ้นหลังได้รับเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus*

อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Lapenda และคณะ 2014 รายงานว่าโพรดิจิโอซินนั้นมีความเป็นพิษต่อเซลล์ของอาร์ทีเมีย (*Artemia salina*) โดยจากการทดลองพบว่าค่าความเข้มข้นของโพรดิจิโอซินที่ทำให้อาร์ทีเมียตายครั้งหนึ่งมีค่าเท่ากับ 78.33 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร และนอกจากนี้ Kalesperis และคณะ 1975 กล่าวว่าโพรดิจิโอซินยังมีความเป็นพิษต่อเซลล์เอ็มบริโอของไก่ อีกด้วย ซึ่งอาจเป็นเหตุผลที่ทำให้อัตราการรอดตายของกุ้งขาวในการทดลองครั้งนี้มีแนวโน้มลดลงตามปริมาณเซลล์แบคทีเรียที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากความเข้มข้นของสารโพรดิจิโอซินที่เพิ่มสูงขึ้นในอาหารอาจส่งผลกระทบต่อเซลล์ของกุ้งทำให้กุ้งที่ได้รับอาหารผสมเซลล์แบคทีเรียที่มากเกินไปเกินไป และมีอัตราการรอดที่ลดลง ดังนั้นในงานวิจัยครั้งต่อไปควรมีการศึกษาถึงปริมาณของโพรดิจิโอซินที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต ระบบภูมิคุ้มกัน และความต้านทานโรคในกุ้งขาว

การวัดการเปลี่ยนแปลงสีตัวของกุ้งขาวที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ที่ได้รับอาหารทดลองที่ผสมเซลล์แบคทีเรีย *Z. ganghwensis* เปรียบเทียบกับกุ้งขาวที่ได้รับอาหารชุดควบคุมเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าสารสีแดงหรือโพรดิจิโอซินที่สะสมอยู่ภายในเซลล์ของแบคทีเรีย *Z. ganghwensis* ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสีตัวของกุ้งขาว ทั้งนี้เนื่องจากสารสีที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสีตัวของกุ้งคือสารสีในกลุ่มแคโรทีนอยด์ ซึ่งแคโรทีนอยด์ชนิดสำคัญที่สะสมอยู่

ในตัวกุ้งคือ แอสตาแซนทิน โดยกุ้งจะมีกระบวนการเปลี่ยนแคโรทีนอยด์ที่ได้รับจากอาหารให้กลายเป็น แอสตาแซนทิน และแอสตาแซนทินจะจับกับโปรตีนครัสตา-ไซยานิน (crusta-cyanin) อยู่ในรูปของแคโรทีนโปรตีน (carotenoprotein) สะสมไว้ในส่วนต่างๆของร่างกาย (Maoka, 2011) ดังนั้นการเสริมเซลล์แบคทีเรีย *Z. ganghwensis* ที่มีรงควัตถุเป็นสารโพรดิจีโอซิน จึงไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสีตัวของกุ้งขาว

การเจริญเติบโตนั้นมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการดูดซึมและระบบย่อยอาหารในทางเดินอาหารของสัตว์น้ำ กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารจึงเป็นอีกค่าหนึ่งที่ยังบอกถึงความสามารถในการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำได้ (Nejad *et al.*, 2006; Zuo *et al.*, 2019) การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารได้แก่ กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส ทริปซิน โคลิโมทริปซินและ ไลเปส ในตับและตับอ่อนของกุ้งที่ได้รับอาหารในแต่ละชุดการทดลองไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) แตกต่างจากการทดลองของ Zheng และคณะ (2018) รายงานว่ากุ้งที่ได้รับอาหารผสมแบคทีเรีย *Lactobacillus plantarum* มีกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารในตับและตับอ่อนเพิ่มสูงขึ้นแตกต่างจากกุ้งที่ได้รับอาหารชุดควบคุม โดยแบคทีเรียชนิดนี้สามารถกระตุ้นการผลิตเอนไซม์ภายในทางเดินอาหารของกุ้ง และนอกจากนั้น Suzer และคณะ 2008 กล่าวว่าแบคทีเรียในกลุ่ม *Lactobacillus* spp. สามารถผลิตเอนไซม์ โปรติเอส และ อะไมเลสได้ ซึ่งจะมีส่วนช่วยในการทำงานของระบบย่อยอาหารของกุ้ง เป็นเหตุผลให้การทดลองที่ได้แตกต่างจากการทดลองในครั้งนี้ อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ด้านอนุมูลอิสระ พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์คาตาเลสในตับและตับอ่อนของกุ้งในชุดการทดลองที่ 2 ที่ได้รับอาหารผสมเซลล์แบคทีเรีย 1 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร มีค่าสูงขึ้นแตกต่างจากชุดการทดลองอื่นๆ และชุดควบคุม สอดคล้องกับการทดลองของ Raghu และคณะ (2016) รายงานว่ากุ้งกุลาค่าที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ที่ได้รับอาหารผสมเซลล์แบคทีเรีย *Bacillus coagulans* และ *Bacillus firmus* มีกิจกรรมของเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (Superoxide Dismutase) และเอนไซม์คาตาเลสในตับและตับอ่อนสูงขึ้นแตกต่างจากกุ้งที่ได้รับอาหารชุดควบคุม เช่นเดียวกับการทดลองของ Naresh และคณะ (2014) รายงานว่ากุ้งกุลาค่าที่ได้รับอาหารผสมเซลล์แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* และ *Lactobacillus rhamnosus* มีกิจกรรมของเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสและ เอนไซม์คาตาเลส ในเลือดของกุ้งเพิ่มสูงขึ้นแตกต่างจากชุดควบคุม การทดลองในครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าแบคทีเรีย *Z. ganghwensis* ที่กุ้ง

ได้รับไม่ส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารแต่ส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระคือ กิจกรรมของเอนไซม์แคตาเลสในตับและตับอ่อนของกึ่งงูเพิ่มสูงขึ้น

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพตับและตับอ่อนของกึ่งงูขาวที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* หลังได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ จากผลการทดลองอาจกล่าวได้ว่าสารโพรดิจิโอสินภายในเซลล์แบคทีเรีย *Z. ganghwensis* ที่กึ่งงูได้รับในปริมาณที่เหมาะสมมีส่วนช่วยรักษาอาการที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ให้กับกึ่งงูได้ โดยพบว่ากึ่งงูขาวในชุดการทดลองที่ 2 ที่ได้รับอาหารผสมเซลล์แบคทีเรีย 1 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร มีลักษณะเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนค่อนข้างปกติเมื่อเปรียบเทียบกับกึ่งงูขาวในชุดการทดลองที่ 1, 3 และ 4 พบการตายของท่อตับ และเกิดการหลุดลอกของเยื่อหุ้มท่อตับ ไม่พบ B-cell, F-cell และ R-cell มีเม็ดเลือดแทรกตัวอยู่รอบๆ ท่อตับที่ตาย สอดคล้องกับ Tran และคณะ (2013) รายงานว่าลักษณะตับและตับอ่อนของกึ่งงูที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* มีการตายและหลุดลอกของเยื่อหุ้มท่อตับ ไม่พบ B-cell, F-cell และ R-cell พบเศษซากของท่อตับ มีเม็ดเลือดแทรกตัวอยู่รอบๆ ท่อตับที่ตาย และพบโคโลนิของแบคทีเรียในท่อตับของกึ่งงูที่มีการติดเชื้อในระยะสุดท้าย เช่นเดียวกับ Lai และคณะ (2015) ได้รายงานเกี่ยวกับลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของตับและตับอ่อนของกึ่งงูขาวที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ว่ามีการหลุดลอกของเยื่อหุ้มท่อตับ และมีเม็ดเลือดแทรกตัวอยู่รอบๆ เซลล์ท่อตับที่ตาย ซึ่งลักษณะอาการที่เกิดขึ้นนั้นเกิดจากสารพิษ PirA^{VP} และ PirB^{VP} ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* (Lai et al., 2015; Lee et al., 2015) จึงทำให้ลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของตับและตับอ่อนของกึ่งงูขาวที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* มีลักษณะที่ใกล้เคียงกับกึ่งงูที่ได้รับสารพิษบางชนิด เช่นการรายงานของ Boonyaratpalin และคณะ (2001a) ที่พบว่ากึ่งงูกลาคำที่ได้รับสารพิษอะฟลาทอกซินบี₁ (aflatoxin B₁) มีการตายของท่อตับ มีเม็ดเลือดแทรกตัวอยู่รอบท่อตับที่ตายและมีการหลุดลอกของเยื่อหุ้มท่อตับ ดังนั้นจากข้อสันนิษฐานข้างต้นทำให้ไม่อาจสรุปได้แน่ชัดว่าผลการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพตับ และตับอ่อนของกึ่งงูในชุดการทดลองที่ 3 และ 4 ที่เกิดขึ้นนั้นมีสาเหตุจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* เพียงอย่างเดียวหรือเกิดจากความเป็นพิษของโพรดิจิโอสินร่วมด้วย และอาจเป็นผลจากสารเมแทบอลิท์ชนิดอื่นๆภายในเซลล์แบคทีเรีย ที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ตับและตับอ่อนของกึ่งงูขาวก็เป็นได้

ฟองน้ำทะเลเป็นสัตว์ที่มีการกินอาหารแบบกรองกินและมีบทบาทสำคัญในวัฏจักรการหมุนเวียนสารอาหารในทะเล จากการศึกษาในครั้งนี้สามารถแยกแบคทีเรีย *Z. ganghwensis* ได้จากฟองน้ำทะเล *Haliclona* sp. ในจังหวัดสตูล แบคทีเรียชนิดนี้สามารถผลิตสารสีแดงคือ โพรดิจิโอะซิน ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดอยู่ในช่วง 535-539 นาโนเมตร และมีน้ำหนักโมเลกุล 322.19-324.20 ดาลตัน และแบคทีเรีย *Z. ganghwensis* สามารถผลิตสารโพรดิจิโอะซินได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดต่าง 8 การศึกษาผลของแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารสีแดงต่อการเจริญเติบโตระบบภูมิคุ้มกัน และความต้านทานโรคในกุ้งขาวพบว่าปริมาณเซลล์แบคทีเรีย *Z. ganghwensis* ที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวคือ 1 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร โดยพบว่าปริมาณดังกล่าวที่กุ้งได้รับส่งผลให้กุ้งขาวที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* มีอัตราการรอดสูงกว่ากุ้งที่ได้รับอาหารในชุดควบคุม มีระบบภูมิคุ้มกันที่ดีขึ้น ส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ คือ เอนไซม์คาตาเลสเพิ่มสูงขึ้น การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของตับและตับอ่อน พบว่าตับและตับอ่อนของกุ้งที่ได้รับอาหารผสมเซลล์แบคทีเรีย 1 กรัมต่อกิโลกรัมอาหารมีลักษณะค่อนข้างปกติเมื่อเปรียบเทียบกับตับและตับอ่อนของกุ้งที่ได้รับอาหารในชุดควบคุมและชุดการทดลองอื่น แสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติของสารโพรดิจิโอะซินภายในเซลล์ของแบคทีเรีย *Z. ganghwensis* ต่อการช่วยรักษาอาการที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ในกุ้งขาว

บทที่ 5

สรุป

การศึกษารังนี้สามารถเก็บตัวอย่างฟองน้ำทะเลจากจังหวัดสตูล และพังงา ได้ 5 ชนิด สามารถแยกและคัดเลือกรหัสที่เรียกที่ผลิตสารสีได้ทั้งหมดจำนวน 8 ไอโซเลต พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต PSU-KSAAHRC MS2 มีลักษณะโคโลนีค่อนข้างกลม ขอบเรียบ สีแดงเข้ม แยกได้จากฟองน้ำทะเล *Haliclona* sp. สามารถผลิตสารสีได้สูงที่สุด $3,140.23 \pm 464.80$ ไมโครกรัมต่อกรัม และเมื่อนำสารสีที่แบคทีเรียผลิตมาศึกษาคุณสมบัติและจำแนกชนิดพบว่า เป็นสารโพรดิจิโอสิน ที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดอยู่ในช่วง 535-539 นาโนเมตร และมีน้ำหนักโมเลกุล $322.19-324.20$ คาลตัน

การจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยอาศัยคุณสมบัติทางชีวเคมีและชีวโมเลกุลพบว่าแบคทีเรียไอโซเลต PSU-KSAAHRC MS2 เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง สามารถผลิตเอนไซม์ออกซิเดส คาทาเลส เจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Marine agar มีโคโลนีสีแดงเข้ม สามารถผลิตสารสีโพรดิจิโอสิน และการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *16s rDNA* ร่วมกับการใช้เทคนิค Phylogenetic analysis สามารถจำแนกชนิดแบคทีเรียไอโซเลต PSU-KSAAHRC MS2 ได้เป็นแบคทีเรีย *Z. ganghwensis*

การศึกษายัจจัยทางกายภาพที่เหมาะสมต่อการผลิตสารสีของแบคทีเรียพบว่าแบคทีเรีย *Z. ganghwensis* PSU-KSAAHRC MS2 สามารถผลิตสารสีโพรดิจิโอสินได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยสามารถผลิตสารสีได้ $3,315.64 \pm 373.43$ ไมโครกรัมต่อกรัม และเมื่อนำแบคทีเรียดังกล่าวมาศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่าง ต่อการผลิตสารสีโพรดิจิโอสินที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าแบคทีเรียชนิดนี้ไม่สามารถเจริญเติบโตที่ความเป็นกรด-ด่าง 5 แต่แบคทีเรียชนิดนี้ผลิตสารโพรดิจิโอสินได้สูงที่สุดที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 8 โดยสามารถผลิตสารสีได้ $5,413.53 \pm 285.77$ ไมโครกรัมต่อกรัม

การศึกษาคผลของแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารสีต่อการเจริญเติบโต ระบบภูมิคุ้มกัน และความต้านทานโรคในกุ้งขาว พบว่ากุ้งขาวที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* หลังได้รับอาหารผสมเซลล์แบคทีเรีย *Z. ganghwensis* ในแต่ละชุดการทดลองเปรียบเทียบกับชุดควบคุมมีการเจริญเติบโตที่ไม่แตกต่างกัน การศึกษาอัตราการรอดของกุ้งขาวที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* หลังได้รับอาหารผสมเซลล์แบคทีเรีย *Z. ganghwensis* พบว่ากุ้งขาวในชุดการทดลองที่ 2 ที่ได้รับอาหารผสมเซลล์แบคทีเรีย 1 กรัมต่อกิโลกรัมอาหารมีอัตราการรอดสูงที่สุด 61.67 ± 24.66 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือกุ้งในชุดการทดลองที่ 3 มีอัตราการรอด 58.33 ± 20.21 ส่วนกุ้งในชุดการทดลองที่ 4 และกุ้งในชุดควบคุมมีอัตราการรอด 50.00 ± 20.00 และ 48.33 ± 2.89 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงสีตัวของกุ้งขาวที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* หลังได้รับอาหารทดลองสูตรต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าแบคทีเรีย *Z. ganghwensis* ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสีตัวของกุ้งขาว

การศึกษาองค์ประกอบเลือดของกุ้งขาวที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ที่ได้รับอาหารทดลองในสูตรต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าปริมาณไลโซไซม์ ปริมาณน้ำตาลในเลือด และปริมาณโปรตีนในน้ำเลือดของกุ้งในแต่ละชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างทางสถิติ แต่กุ้งในชุดการทดลองที่ 2 ที่ได้รับอาหารผสมเซลล์แบคทีเรีย 1 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร มีปริมาณเม็ดเลือดรวม กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ความสามารถในการจับกินสิ่งแปลกปลอม และค่าดัชนีการจับกินสิ่งแปลกปลอมสูงแตกต่างจากกุ้งในชุดการทดลองอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ในตับและตับอ่อนของกุ้งขาวที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ที่ได้รับอาหารทดลองในสูตรต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหาร กิจกรรมของเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส และการวิเคราะห์ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ของกุ้งในแต่ละชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$) แต่พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์คาตาเลสของกุ้งในชุดการทดลองที่ 2 ที่ได้รับอาหารผสมเซลล์แบคทีเรีย 1 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร มีค่าสูงแตกต่างจากกุ้งในชุดการทดลองอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของตับและตับอ่อนของกุ้งขาวที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ที่ได้รับอาหารทดลองในสูตรต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่ากุ้งในชุดควบคุม และชุดการทดลองที่ 3 และ 4 มีการตายของท่อตับ เกิดการหลุดลอกของเยื่อหุ้มท่อตับ ไม่พบ B-cell, F-cell และ R-cell และมีเม็ดเลือดแทรกตัวอยู่รอบๆ ท่อตับที่ตาย แต่กุ้งขาวในชุดการทดลองที่ 2 มีเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนค่อนข้างปกติ

การศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นถึงผลของสาร โพรคิจิ โอซิน ในเซลล์แบคทีเรีย *Z. ganghwensis* ต่อการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ในกุ้งขาว ผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้อาจสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นยารักษาโรคเพื่อลดการใช้ยาปฏิชีวนะที่ส่งผลเสียต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ อย่างไรก็ตามการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับปริมาณของโพรคิจิ โอซินที่เหมาะสมต่อการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียในกุ้งขาว และผลของโพรคิจิ โอซินต่อการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียในสัตว์น้ำชนิดอื่นๆ นั้นนับเป็นสิ่งที่น่าสนใจ และเป็นประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในประเทศไทย

เอกสารอ้างอิง

- กิจการ ศุภมาตย์, จรีพร เรืองศรี, สุภฎา คีรีรัฐนิคม และนรินทร์ สงสีจันทร์. 2543. ระบบภูมิคุ้มกัน
โรคนกในกึ่งกุลาคำ: IV. การศึกษาค่าปกติของระบบภูมิคุ้มกันและองค์ประกอบเลือดในกึ่ง
กุลาคำ. ว. สงขลานครินทร์ วทท. 22 (ฉบับพิเศษ): 597-603
- กิจการ ศุภมาตย์, วุฒิพร พรหมขุนทอง และสุภฎา คีรีรัฐนิคม. 2549. ผลของแหล่งสารสีธรรมชาติ
ต่อการเร่งสีและความต้านทานต่อความเครียดในกึ่งขาว. รายงานโครงการวิจัยสำนักงาน
คณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.
- คมสัน หงษ์ทรี, นิษฐกานต์ เหมินทร์ และปิยะวัฒน์ สุจิระชาโต. 2554. ความหลากหลายทางชนิด
ของฟองน้ำทะเลบริเวณหมู่เกาะกระ จังหวัดนครศรีธรรมราช. พิพิธภัณฑ์ธรรมชาติวิทยา
ประมง, คณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.
- คมสัน หงษ์ทรี และ สุเมตต์ ปุจฉาการ. 2553. ความหลากหลายทางชนิดของฟองน้ำชั้น
Demospongiae บริเวณเกาะโลซิน จังหวัดปัตตานี. พิพิธภัณฑ์ธรรมชาติวิทยาประมง, คณะ
ประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.
- คมสัน หงษ์ทรี และ สุเมตต์ ปุจฉาการ. 2556. ความหลากหลายของฟองน้ำทะเลบริเวณหมู่เกาะ
สุรินทร์ จังหวัดพังงา. พิพิธภัณฑ์ธรรมชาติวิทยาประมง, คณะประมง,
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.
- ชนพงศ์ แสงซื่อ. 2546. กึ่งขาวอินเทคค์. กรุงเทพฯ : อินเทคค์และแลบอินเตอร์. 242 หน้า
- ธีรศักดิ์ อนันตพงศ์. 2551. การคัดเลือกแบคทีเรียจากทะเลที่ผลิตแคโรทีนอยด์และการหาสภาวะที่
เหมาะสมในการผลิตระดับขวดเขย่า. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชา
เทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 91 หน้า.
- นเรศ ช้วนยุค. 2555. เอกสารประกอบการสอน วิชาโรคสัตว์น้ำ (Aquatic Animal diseases).
ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ กิจการ ศุภมาตย์ ภาควิชาวชิษศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา
- บพิช จารุพันธุ์ และ นันทพร จารุพันธุ์. 2547. สัตววิทยา: ปฏิบัติการ. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 211 หน้า.
- บุษบา ยงสมิทธิ์. 2542. จุลชีววิทยาการหมักวิตามินและสารสี. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 287 หน้า.
- พุทธ ส่องแสงจินดา. 2557. คู่มือการเลี้ยงกึ่งขาว (*Litopenaeus vannamei*) แบบพัฒนา.สถาบันวิจัย
และพัฒนาการเพาะเลี้ยงกึ่งทะเล, สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง, กรมประมง,
กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

- ฤทธิรงค์ พรหมมาศ, พงษ์เทพ วิไลพันธ์ และพันธุ์ทิพย์ วิเศษพงษ์พันธุ์. 2548. การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตสารยับยั้งจุลชีพจากฟองน้ำทะเล. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล, คณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.
- ฤทธิรงค์ พรหมมาศ และ พันธุ์ทิพย์ วิเศษพงษ์พันธุ์. 2549. การคัดเลือกสารยับยั้งจุลชีพจากสารสกัดฟองน้ำทะเล บริเวณหมู่เกาะช้าง จังหวัดตราด. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล, คณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.
- วรพจน์ สุนทรสุข และ ลีณา สุนทรสุข. 2553. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่อาศัยร่วมกับฟองน้ำทะเลในประเทศไทยที่ผลิตตรงควัตถุชีวภาพและการศึกษาคุณสมบัติของรงควัตถุชีวภาพ. ภาควิชาจุลชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.
- ศิริเพ็ญ สุภัทราวิวัฒน์. 2550. อาณาจักรสัตว์. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. 152 หน้า.
- สุกญา ศิริรัฐนิคม, อานุช ศิริรัฐนิคม และพันธิติธิ์ โชคสวัสดิกร. 2556. ผลของแคโรทีนอยด์ในอาหารต่อสีตัวของปลากระแห. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ และสิ่งแวดล้อม, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยทักษิณ.
- สุเมตต์ ปุจฉาการ. 2555. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์โครงการ ความหลากหลายของชนิดฟองน้ำทะเลบริเวณหมู่เกาะพีพี จังหวัดกระบี่. สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล, มหาวิทยาลัยบูรพา.
- สุรีย์ นานสมบัติ, นวรัตน์ โพธิราช, ประทุม แสนมา, วรชนนท์ หาเพิ่มพูน และสิทธิโชค ศิริสรชัย. 2556. การตรวจหาการปนเปื้อน *Vibrio parahaemolyticus* ในอาหารทะเลสดที่จำหน่ายในกรุงเทพและการศึกษาการต้านทานความร้อน. วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ 16(ฉบับพิเศษ): 175-184 .
- อุดมพันธ์ อุดม. 2549. ผลของแคโรทีนอยด์สังเคราะห์และสไปรูไลนาต่อการเจริญเติบโต การสะสมแคโรทีนอยด์ และภูมิคุ้มกันในปลานิลแดงแปลงเพศ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- Abfa, I. K., Radjasa, O. K., Susanto, A., Nuryadi, H. and Karwur, F. F. 2017. Exploration, isolation, and identification of carotenoid from bacterial symbiont of sponge *Callyspongia vaginali*. Indonesian Journal of Marine Sciences 22: 49-58.
- Allen, E. G. 1967. Conditions of the colour change of prodigiosin. Nature 216: 929-931.
- An, N. T. T. 2011. Development of a system for separation and characterization of *Litopenaeus vannamei* haemocytes. Faculty of Bioscience Engineering. Universiteit Gent.

- Anand, P. S. S., Kohli, M. P. S., Kumar, S., Sundaray, J. K., Roy, S. D., Venkateshwarlu, G., Sinha, A. and Pailan, G. H. 2014. Effect of dietary supplementation of biofloc on growth performance and digestive enzyme activities in *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 418–419: 108–115.
- AOAC. 1990. Official methods of analysis of the association of analytical chemistry, 15th edition. Association of official analytical chemists (AOAC). Washington, DC.
- Apines-Amar, M. J. S. and Amar, E. C. 2015. Use of immunostimulants in shrimp culture: An update. *Research Signpost* 2: 45-71.
- Araújo, H. W. C., Fukushima, K. and Takaki, G. M. C. 2010. Prodigiosin production by *Serratia marcescens* UCP 1549 using renewable-resources as a low cost substrate. *Molecules* 15: 6931-6940.
- Asagabaldan, M. A., Ayuningrum, D., Kristiana, R., Sabdono, A., Radjasa, O. K. and Trianto, A. 2016. Identification and antibacterial activity of bacteria isolated from marine sponge *Haliclona (Reniera)* sp. against multidrug resistant human pathogen. *Earth and Environmental Science* 55: 1-11.
- Ávila-Villa, L. A., Fimbres-Olivarria, D., García-Sánchez, G., Gollas-Galván, T., Hernández-López, J. and Martínez-Porchas, M. 2012. Physiological and immune responses of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) infected with necrotizing hepatopancreatitis bacterium. *Aquaculture* 324–325: 14–19.
- Bancroft, J. D. 1967. *Histochemical Techniques*. London: Butterworths.
- Barclay, M. C., Irvin, S. J., Williams, K. C. and Smith, D. M. 2006. Comparison of diets for the tropical spiny lobster *Panulirus ornatus*: astaxanthin-supplemented feeds and mussel flesh. *Aquaculture Nutrition* 12: 117-125.
- Berlanga, M., Ruiz, N., Hernandez-Borrell, J., Montero, T. and Viñas, M. 2000. Role of the outer membrane in the accumulation of quinolones by *Serratia marcescens*. *Canadian Journal of Microbiology* 46(8): 716-722.
- Berridge, R. B., Fuller, D. F., Azavedo, D. J., Low E. L., Bercovier, H., Frelier, F. P. 1998. Development of specific nested oligonucleotide PCR primers for the *Streptococcus iniae* 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacer. *Journal of Clinical Microbiology* 36: 2778–2781.

- Boonyaratpalin, M., Supamattaya, K., Verakunpiriya, V. and Suprasert, D. 2001a. Effects of aflatoxin B1 on growth performance, blood components, immune function and histopathological changes in black tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius). *Aquaculture Research* 32: 388-398.
- Boonyaratpalin, M., Thongrod, S., Supamattaya, K., Britton, G. and Schlipalius, L. E. 2001 b. Effects of β -carotene source, *Dunaliella salina*, and astaxanthin on pigmentation, growth, survival and health of *Penaeus monodon*. *Aquaculture Research* 32: 182-190.
- Britton, G., Liaaen-Jensen, S. and Pfender, H. 1995. Carotenoid: Isolation and Analysis Vol 1A. Birkhauser Verlag, Basel. 368 p.
- Chairman, K., Ranjit, S. A. and Alagumuthu, G. 2012. Cytotoxic and antioxidant activity of selected marine sponges. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 10: 234-238.
- Chatzifotis, S., Pavlidis, M., Jimeno, C. D., Vardanis, G., Sterioti, A. and Divanach, P. 2005. The effect of different carotenoid sources on skin coloration of cultured red porgy (*Pagrus pagrus*). *Aquaculture Research* 36: 1517-1525.
- Cheng, Z. B., Xiao, H., Fan, C. Q., Lu, Y. N., Zhang, G. and Yin, S. 2013. Bioactive polyhydroxylated sterols from the marine sponge *Haliclona crassiloba*. *Steroids* 78: 1353-1358.
- Chumpol, S., Kantachote, D., Nitoda, T. and Kanzaki, H. 2018. Administration of purple nonsulfur bacteria as single cell protein by mixing with shrimp feed to enhance growth, immune response and survival in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) cultivation. *Aquaculture* 489 : 85–95.
- Darshan, N. and Manonmani, H. K. 2015. Prodigiosin and its potential applications. *Journal of Food Science and Technology* 52: 5393–5407.
- Demers, N. E. and Bayne, C. J. 1997. The immediate effects of stress on hormones and plasma lysozyme in rainbow trout. *Development Comparative Immunology* 21: 363-373.
- Eldahshan, O. A. and Singab, A. N. B. 2013. Carotenoids. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 2: 225-234.
- Elkenawy, N. M., Yassin, A. S., Elhifnawy, H. N. and Amin, M. A. 2017. Optimization of prodigiosin production by *Serratia marcescens* using crude glycerol and enhancing production using gamma radiation. *Biotechnology Reports* 14: 47–53.

- Garbanzo, C. R., Perez, A. M., Carmona, J. B., and Vaillant, F. 2011. Identification and quantification of carotenoids by HPLC-DAD during the process of peach palm (*Bactris gasipaes* H.B.K.) flour. *Food Research International* 44: 2377–2384.
- Giri, A., Anandkumar, N., Muthukumaran, G. and Pennathur, G. 2004. A novel medium for the enhanced cell growth and production of prodigiosin from *Serratia marcescens* isolated from soil. *BMC Microbiology* 4: 1-10.
- Gulani, C., Bhattacharya, S. and Das, A. 2012. Assessment of process parameters influencing the enhanced production of prodigiosin from *Serratia marcescens* and evaluation of its antimicrobial, antioxidant and dyeing potentials. *Malaysian Journal of Microbiology* 8: 116-122.
- Humason, G. L. 1979. *Animal Tissue Techniques*. San Francisco: W. H. Freeman and Company.
- Hyvarinen, A. and Nikkila, E. 1962. Specific determination of blood glucose with O-toluidine. *Clinica Chimica Acta* 7: 140-143.
- Ibrahim, D., Nazari, T. F., Kassim, J. and Lim, S. H. 2014. Prodigiosin - an antibacterial red pigment produced by *Serratia marcescens* IBRL USM 84 associated with a marine sponge *Xestospongia testudinaria*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 4: 001-006.
- Jackson, A. S., Kennedy, J., Margassery, M. L., Flemer, B., O'Leary, N., Morrissey, P. J., O'Gara, F., Dobson, D. W. A., 2015. *Springer Handbook of Marine Biotechnology*. In Kim, S.-K. (ed.) Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Jafarzade, M., Yahya, N. A., Mohamad, S., Usup, G. and Ahmad, A. 2013. Isolation and characterization of pigmented bacteria showing antimicrobial activity from Malaysian marine environment. *Malaysian Journal of Microbiology* 9: 152-160.
- Jang, K. H., Kang, G. W., Jeon, J. E., Lim, C., Lee, H. S., Sim, C. J., Oh, K. B. and Shin, J. 2009. Haliclolin A, a new macrocyclic diamide from the spong *Haliclona* sp. *Organic Letters* 11: 1713-1716.
- Jimtha, C. J., Jishma, P., Sreelekha, S., Chithra, S. and Radhakrishnan, E. 2017. Antifungal properties of prodigiosin producing rhizospheric *Serratia* sp. *Rhizosphere* 3: 105–108.
- Kalesperis, G. S., Prahlad, K. V., Lynch, D. L. 1975. Toxigenic studies with the antibiotic pigments from *Serratia marcescens*. *Canadian Journal Microbiology* 21: 213–220.

- Kavitha, R., Aishwarya, S. and Ratnawali, C. M. G. 2010. Anticancer activity of red pigment from *Serratia marcescens* in Human cervix carcinoma. International Journal of PharmTech Research 2: 784-787.
- Kefalas, E., Castritsi-Catharios, J. and Miliou, H. 2003. Bacteria associated with the sponge *Spongia officinalis* as Indicators of Contaminations. Ecological Indicators 2: 339-343.
- Kim, J. S., Harikrishnan, R., Kim, M. C., Balasundaram, C. and Heo, M. S. 2010. Dietary administration of *Zooshikella* sp. enhance the innate immune response and disease resistance of *Paralichthys olivaceus* against *Streptococcus iniae*. Fish and Shellfish Immunology 29: 104-110.
- Klahan, R., Areechon, N., Yoonpundh, R. and Engkagul, A. 2009. Characterization and activity of digestive enzymes in different sizes of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). Kasetsart Journal (Natural Science) 43: 143-153.
- Krishna, J. G., Jacob, A., Kurian, P., KK, E. and Chandrasekaran, M. 2013. Marine bacterial prodigiosin as dye for rubber latex, polymethyl methacrylate sheets and paper. African Journal of Biotechnology 12: 2266-2269.
- Lai, H. C., Ng, T. H., Ando, M., Lee, C. T., Chen, I. T., Chuang, J. C., Mavichak, R., Chang, S. H., Yeh, M. D., Chiang, Y. A., Takeyama, H., Hamaguchi, H., Lo, C. F., Aoki, T. and Wang, H. C. 2015. Pathogenesis of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. Fish and Shellfish Immunology 47: 1006-1014.
- Lapenda, L. J. C., Maciel, C. C. S., Xavier, H. S., Alves da Silva, C. A. and Campos, T. G. M. 2014. Production and toxicological evaluation of prodigiosin from *Serratia marcescens* UCP/WFCC1549 on mannitol solid medium. International Journal of Applied Research in Natural Products 7: 32-38.
- Lapenda, J. C., Silva, P. A., Vicalvi, M. C., Sena, K. X. F. R. and Nascimento, S. C. 2015. Antimicrobial activity of prodigiosin isolated from *Serratia marcescens* UFPEDA 398. World Journal of Microbiology and Biotechnology 31: 399-406.
- Leal, M. C., Sheridan, C., Osinga, R., Dionísio, G., Rocha, R. J. M., Silva, B., Rosa, R. and Calado, R. 2014. Marine microorganism-invertebrate assemblages: perspectives to solve the “supply problem” in the initial steps of drug discovery. Marine Drugs 12: 3929-3952.

- Lee, C. T., Chen, I. T., Yang, Y. T., Ko, T. P., Huang, Y. T., Huang, J. Y., Huang, M. F., Lin S. J., Chen, C. Y., Lin, S. S., Lightner, D., Wang, H. C., Wang, H. J., Wang, H. C., Hor, L. I. and Lo, C.F. 2015. *Vibrio parahaemolyticus*: an opportunistic marine pathogen becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 112: 10798-10803.
- Li, P., Kinch, L. N., Ray, A., Dalia, A. B., Cong, Q., Nunan, L. M., Camilli, A., Grishin, N. V., Salomon, D. and Orth, K. 2017. Acute hepatopancreatic necrosis disease-causing *Vibrio parahaemolyticus* strains maintain an antibacterial type VI secretion system with versatile effector repertoires. Applied and Environmental Microbiology 83: 1-17.
- Maloof, A. C., Rose, C. V., Beach, R., Samuels, B. M., Calmet, C. C., Erwin, D. H., Poirier, G. R., Yoa, N. and Simons, F. J. 2010. Possible animal-body fossils in pre-Marinoan limestones from South Australia. Nature Geoscience 3: 653–659.
- Maoka, T. 2011. Carotenoid in marine animals. Marine Drugs 9: 278-293.
- Melo, P. D. S., Duran, N. and Haun, M. 2000. Cytotoxicity of prodigiosin and benznidazole on V79 cells. Toxicology Letters 116: 237–242.
- Nareesh, S., Suneetha, Y. and Reddy, M. S. 2014. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* and *Bacillus subtilis* supplemented probiotic diets on the growth patterns and antioxidant enzyme activities in *Penaeus monodon* and *Penaeus indicus*. American International Journal of Research in Formal, Applied & Natural Sciences 8: 76-80.
- Nazemi, M., Salimi, M. A., Salimi, P. A., Motallebi, A., Jahromi, S. T. and Ahmadzadeh, o. 2014. Antifungal and antibacterial activity of *Haliclona* sp. from the Persian Gulf, Iran. Journal de Mycologie Médical 24: 220-224.
- Nejad, S. Z., Rezaei, M. H., Takami, G. A., Lovett, D. L., Mirvaghefi, A. R. 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.
- Nirmal, N. P. and Benjakul, S. 2010. Effect of catechin and ferulic acid on melanosis and quality of Pacific white shrimp subjected to prior freeze–thawing during refrigerated storage. Food Control 21: 1263–1271.

- Pan, M. V., Traifalgar, R. F. M., Serrano, A. E. and Corre, V. L. 2015. Immunomodulatory and growth promoting effects of peptidoglycan supplementation in black tiger shrimp *Penaeus monodon* Fabricius 1798. *Asian Fisheries Science* 28: 60-71.
- Park, H., Lee, S. G., Kim, T. K., Han, S. J. and Yim, J. H. 2012. Selection of Extraction solvent and temperature effect on stability of the algicidal agent prodigiosin. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 17: 1232-1237.
- Pervaiz, T., Songtao, J., Faghihi, F., Haider, M. S. and Fang, J. 2017. Naturally occurring anthocyanin, structure, functions and biosynthetic pathway in fruit plants. *Journal of Plant Biochemistry and Physiology* 5: 1-9.
- Pham, M. A., Byun, H. G., Kim, K. D. and Lee, S. M. 2014. Effects of dietary carotenoid source and level on growth, skin pigmentation, antioxidant activity and chemical composition of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 431: 65–72.
- Purivirojkul, W., Areechon, N. and Srisapoome, P. 2006. The effect of peptidoglycan on immune response in black tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius). *Kasetsart Journal (Natural Science)* 40: 181-187.
- Raghu, p., Rajikkannu, M., Baburajan, R., Deva, A., Nandakumar, R., Masilamni, V. and Prabhakaran, K. 2016. Effect of *Bacillus coagulans* and *B. firmus* incorporated probiotic diet on Superoxide dismutase activity and catalase activity in *Penaeus monodon*. *World Scientific News* 44: 224-235.
- Rajendran, K.V., Shivam, Saloni, Ezhil Praveena, P., Joseph Sahaya Rajan, J., Sathish Kumar, T., Avunje, Satheesha, Jagadeesan, V., Prasad Babu, S.V.A.N.V., Pande, Ashish, Navaneeth Krishnan, A., Alavandi, S.V., Vijayan, K.K. 2016. Emergence of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in farmed *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* in India. *Aquaculture* 272–280.
- Rao, A. V. and Rao, L. G. 2007. Carotenoids and human health. *Pharmacological Research* 55: 207–216.
- Rehman, Z. U., Alam, I., Kamau, A. A., Bajic, V. B. and Leiknes, T. 2018. Genome sequence analysis of *Zooshikella ganghwensis* strain VG4 and its potential for the synthesis of antimicrobial metabolites. *Biotechnology Reports* 19: e00278.
- Rungrassamee, W., Maibunkaew, S., Karoonuthaisiri, N. and Jiravanichpaisal, P. 2013. Application of bacterial lipopolysaccharide to improve survival of the black tiger shrimp

- after *Vibrio harveyi* exposure. *Developmental and Comparative Immunology* 41:257-262.
- Selvin, J., Priya, S. S., Kiran, G. S., Thangavelu, T. and Bai, N. S. 2009. Sponge-associated marine bacteria as indicators of heavy metal pollution. *Microbiological Research* 164: 352-363.
- Shaikh, Z. 2016. Biosynthesis of prodigiosin and its applications. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences* 11: 1-28.
- Silberhorn, A. M., Thiel, V. and Imhoff, J. F. 2008. Abundance and bioactivity of cultured sponge-associated bacteria from the mediterranean sea. *Microbial Ecology* 55: 94-106.
- Smith, V. J. and Söderhall, K. 1983. β -1, 3 glucan activation of crustacean hemocytes *in vitro* and *in vivo*. *Biology Bulletin* 164: 299-314.
- Sole, M., Francia, A., Rius, N. and Loren, J. G. 1997. The role of pH in the 'glucose effect' on prodigiosin production by non-proliferating cells of *Serratia marcescens*. *Letters in Applied Microbiology* 25: 81-84.
- Steel, R. G. D. and Torrie, J. A. 1980. Principles and procedures of statistics: A biometrical approach. Second ed. New York: McGraw-Hill International. 633p.
- Suantika, G., Situmorang, M. L., Khakim, A., Wibowo, I., Aditiawati, P., Suryanarayan, S., Nori, S., Kumar, S. and Putri, F. 2018. Effect of red seaweed *Kappaphycus alvarezii* on growth, survival, and disease resistance of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* against *Vibrio harveyi* in the nursery phase. *Journal of Aquaculture Research and Development* 9: 1-7.
- Sundaramoorthy, N., Yogesh, P. and Dhandapani, R. 2009. Production of prodigiosin from *Serratia marcescens* isolated from soil. *Indian Journal of Science and Technology* 2: 32-34.
- Suzer, C., Çoban, D., Kamaci, H. O., Saka, S., Firat, K., Otgucuoğlu, O. and Küçükşari, H. 2008. *Lactobacillus* spp. bacteria as probiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) larvae: Effects on growth performance and digestive enzyme activities. *Aquaculture* 280: 140-145.
- Tan, B., Mai, K., Ai, Q., Zhang, W., Liufu, Z. and Xu, W. 2008. Immune responses and resistance against *Vibrio parahaemolyticus* induced by probiotic bacterium *Arthrobacter* XE-7 in pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Juornal of the World Aquaculture Society* 39: 477-489.
- Tang, K. F. J., Han, J. E., Aranguren, L. F., White-Noble, B., Schmidt, M. M., Piamsomboon, P., Risdiana, E. and Hanggono, B. 2016. Dense populations of the microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in feces of *Penaeus vannamei* exhibiting white feces

- syndrome and pathways of their transmission to healthy shrimp. *Journal of Invertebrate Pathology* 140: 1-7.
- Thawornwiriyanun, P., Dechasakulwatana, C., Suntornsuk, L. and Suntornsuk, W. 2009. Carotenoid production from sponge-associated bacteria isolated in the gulf of Thailand. *Journal of Science Technology and Humanities* 7: 11-18.
- Tourtip, S., Wongtripop, S., Stentiford, G. D., Bateman, K. S., Sriurairatana, S., Chavadej, J., Sritunyalucksana, K. and Withyachumnarnkul, B. 2009. *Enterocytozoon hepatopenaei* sp. nov. (Microsporida: Enterocytozoonidae), a parasite of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Decapoda: Penaeidae): Fine structure and phylogenetic relationships. *Journal of Invertebrate Pathology* 102: 21–29.
- Tran, L., Nunan, L., Redman, R. M., Mohny, L. L., Pantoja, C. R., Fitzsimmons, K. and Lightner, D. V. 2013. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms* 105: 45-55.
- Trasviña-Arenas, C. H., Garcia-Triana, A., Peregrino-Uriarte, A. B. and Yepiz-Plascencia, G. 2013. White shrimp *Litopenaeus vannamei* catalase: Gene structure, expression and activity under hypoxia and reoxygenation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 164: 44–52.
- Vaidyanathan, J., Z. Bhatena-Langdana, R. V. Adivarekar, and M. Nerurkar. 2012. Production, partial characterization, and use of a red biochrome produced by *Serratia sakuensis* subsp. Nov strain KRED for dyeing natural fibers. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 166: 321-335.
- Vargas, F. D., Jiménez, A. R. and López, O. P. 2000. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 40: 173–289.
- Weisburg, W. G., Barns, S.M., Pelletier, D.A. and Lane, D.J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173: 697–703.
- Williams, R.P., Green, J.A. and Rappoport, D.A. 1955. Studies on pigmentation of *Serratia marcescens*. I. Spectral and paper chromatographic properties of Prodigiosin. *Journal of Bacteriology* 71: 115-120.

- Williamson, N. R., Simonsen, H. T., Ahmed, R. A. A., Goldet, G., Slater, H., Woodley, L., Leeper, F. J. and Salmond, G. P. C. 2005. Biosynthesis of the red antibiotic, prodigiosin, in *Serratia*: identification of a novel 2-methyl-3-n-amylypyrrole (MAP) assembly pathway, definition of the terminal condensing enzyme, and implications for undecylprodigiosin biosynthesis in *Streptomyces*. *Molecular Microbiology* 56(4): 971–989.
- Xu, W. J., Pan, L. Q., Zhao, D. H. and Huang, J. 2012. Preliminary investigation into the contribution of bioflocs on protein nutrition of *Litopenaeus vannamei* fed with different dietary protein levels in zero-water exchange culture tanks. *Aquaculture* 350-353: 147–153.
- Yaemsooksawat, N., Jintasataporn, O., Areechon, N., Puntuma-o-pas, S. and Thongtuak, C. 2009. Effect of dietary protein level on growth and immunity of *Litopenaeus vannamei*, Boone 1931. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 31: 15-20.
- Yi, H., Chang, Y. H., Oh, H. W., Bae, K. S. and Chun, J. 2003. *Zooshikella ganhwensis* gen. nov., sp. nov., isolated from tidal flat sediments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53: 1013–1018
- Zheng, X., Duan, Y., Dong, H. and Zhang, J. 2018. Effects of dietary *Lactobacillus plantarum* on growth performance, digestive enzymes and gut morphology of *Litopenaeus vannamei*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 10: 504-510.
- Zuo, Z. H., Shang, B. J., Shao, Y. C., Li, W. Y. and Sun, J. S. 2019. Screening of intestinal probiotics and the effects of feeding probiotics on the growth, immune, digestive enzyme activity and intestinal flora of *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology* 86: 160–168.

ภาคผนวก

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

1.1 Tryptic soy agar (TSA) ผสมเกลือแคง 1.5 เปอร์เซ็นต์

ชั่งอาหาร TSA 40 กรัม ผสมกับเกลือแคง 15 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7.3 ± 0.2 นำไปต้มให้วุ้นละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วจึงฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นรอกให้อุณหภูมิลดลงจนถึง 45-50 องศาเซลเซียส แล้วจึงนำไปเทในจานเพาะเชื้อ ทิ้งไว้ให้แห้ง และนำไปใช้งานต่อไป

1.2 Tryptic Soy Broth (TSB) ผสมเกลือแคง 1.5 เปอร์เซ็นต์

ชั่ง TSB 30 กรัม ผสมเกลือแคง 15 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7.3 ± 0.2 แล้วฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ก่อนนำไปใช้

1.3 Marine agar

ชั่ง Marine agar 55.20 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7.6 ± 0.2 นำไปต้มให้วุ้นละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นรอกให้อุณหภูมิลดลงจนถึง 45-50 องศาเซลเซียส แล้วจึงนำไปเทในจานเพาะเชื้อ ทิ้งไว้ให้แห้งและนำไปใช้งานต่อไป

1.4 Maine broth

ชั่ง Marine broth 40.20 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7.6 ± 0.2 นำไปต้มให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ก่อนนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ก่อนนำไปใช้

2. การเตรียมสารเคมี

2.1 สารเคมีสำหรับการยีนย่นชนิดของแบคทีเรียด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction

1. TBE electrophoresis buffer (10X stock solution)

Tris base	108.0 กรัม
Boric acid	55.0 กรัม
0.5 M EDTA pH 8.0	40 มิลลิลิตร
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	1 ลิตร

ละลาย Tris base ลงในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร คนจนสารละลายหมดแล้วเติม Boric acid คนจนสารละลายหมด ก่อนจะเติม 0.5 M EDTA pH 8.0 ลงไป จากนั้นเติมน้ำลงไปอีกเล็กน้อย ปรับค่าความเป็นกรดต่างให้ได้ 8.0 แล้วเติมน้ำกลั่นลงไปให้ครบ 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2. สารละลาย lysis buffer pH 8.0

สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ (NaCl 100 mM) โดยชั่งโซเดียมคลอไรด์ 0.5844 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

Tris-HCL ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (Tris-HCL 10 mM) ชั่ง Tris-HCL 0.1576 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

EDTA ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ (EDTA 1 mM) ชั่ง EDTA 0.0372 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดต่างให้ได้ 8

Triton X 100 ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ คูณสารละลาย Triton X 100 มา 1 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

นำสารทุกตัวที่เตรียมได้ในข้างต้นมาผสมให้เข้ากัน ก่อนนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3. Ethidium bromide solution 1000 X stock solution, 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

Ethidium bromide	50 มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

ละลาย Ethidium bromide 50 มิลลิกรัม ลงในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเตรียมเป็น working solution โดยนำ stock solution มาเจือจางในอัตราส่วน 1:1,000 จะได้ Ethidium bromide working solution 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4. Agarose gel ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์

Agarose gel	1.5 กรัม
0.5X TBE electrophoresis buffer	100 มิลลิลิตร

ละลาย Agarose gel ใน 0.5X TBE electrophoresis buffer นำไปต้มให้วุ้นละลายเป็นเนื้อเดียวกันด้วยไมโครเวฟ ประมาณ 1-2 นาที รอให้อุณหภูมิลดลงประมาณ 45-50 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปเทลงในถาดเจลที่มีซี่หวี รอจนแข็งตัวจึงนำไปใช้งาน

2.2 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ห้องค์ประกอบเลือดปลา

1. สารเคมีสำหรับตรวจนับจำนวนเม็ดเลือดกึ่ง

Trypan blue: ความเข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์ ชั่ง trypanblue 0.15 กรัม ใส่ลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 100 มิลลิลิตร คนให้ละลายโดยใช้ magnetic stirrer นาน 6-12 ชั่วโมง และกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 แบ่งใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวก์หลอดละ 450 ไมโครลิตร

2. สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในเลือด

Trichloroacetic acid: ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยชั่ง Trichloroacetic acid มา 3 กรัม ละลายในน้ำกลั่น Double Distilled Water (DDW) ฆ่าเชื้อ แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

Color reagent: ชั่ง Thiourea 1.5 กรัม ละลายลงใน Glacial acetic acid 940 มิลลิลิตร จากนั้นเติม O-toluidine 60 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชาและนำไปแช่ในตู้เย็น

Benzoic acid solution: เตรียมโดยชั่ง Benzoic acid 0.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น DDW ฆ่าเชื้อปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร

Standard glucose: ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดย ชั่ง glucose 100 มิลลิกรัม ละลายใน Benzoic acid solution ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ในตู้เย็น

3. สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในน้ำเลือด

Bovine serum albumin (BSA): ชั่ง BSA 0.01 กรัม ละลายในน้ำกลั่น DDW ฆ่าเชื้อ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (จะได้สารละลาย BSA เข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

Folin reagent: เจือจางสารละลาย folin reagent เข้มข้นด้วยน้ำกลั่น DDW ฆ่าเชื้อ ในอัตราส่วน 1:10

Alkaline copper ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)

(a) สารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต 0.5 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยชั่งคอปเปอร์ซัลเฟต 0.015 กรัม ละลายในน้ำกลั่น DDW ฆ่าเชื้อ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร

(b) สารละลายโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต 1 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยชั่งโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต 0.03 กรัม ละลายในน้ำกลั่น DDW ฆ่าเชื้อ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร

(c) สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) 1 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยตม่น้ำกลั่น DDW ปริมาตร 100 มิลลิลิตร วางทิ้งไว้ให้เย็น เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 กรัม จากนั้นเติมโซเดียมคาร์บอเนต 1 กรัม คนจนสารละลายเข้ากันดี นำสารละลายในข้อ (a) (b) และ (c) ผสมกันในอัตราส่วน 1:1:50

4. สารเคมีสำหรับการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส

Cacodylate buffer (CAC buffer): เตรียมโดยชั่ง Cacodylic acid sodium salt trihydrate ($\text{C}_6\text{H}_6\text{A}_3\text{NaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 1.07 กรัม ละลายในน้ำกลั่น DDW ฆ่าเชื้อ ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เติมแคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2) 0.37 กรัม คนจนสารละลายหมดแล้วเติมแมกนีเซียมคลอไรด์ (MgCl_2) 5.08 กรัม ปรับค่าความเป็นกรดต่างให้ได้ 7.0 จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ใส่ขวดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

Trypsin: เตรียมโดยชั่ง trypsin 0.001 กรัม ละลายใน CAC buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

L-3, 4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA): ชั่ง L-DOPA 0.003 กรัม ละลายใน CAC buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ห่อด้วยกระดาษฟลอยด์อย่าให้โดนแสง

5. สารเคมีสำหรับการศึกษากระบวนการจับกินถึงแปลกล้อม

L-cysteine

สารละลาย 3 เปอร์เซ็นต์ L-cysteine เตรียมโดยการชั่ง สาร L-cysteine ปริมาณ 3 กรัม ละลายใน K – 199 และปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร กรองผ่านหัวกรอง 0.22 ไมโครเมตร ใส่ขวดฆ่าเชื้อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (เตรียมแล้วใช้ทันที)

K-199

(a) เตรียมสารละลาย M-199 โดยละลาย M 1-99 1 ซองในน้ำกลั่น DDW ฆ่าเชื้อ เดิม NaHCO_3 ปริมาณ 2.2 กรัม ปรับค่าความเป็นกรดต่างให้ได้ 7.4 แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 500 มิลลิลิตร กรองผ่านหัวกรองขนาด 0.20 ไมโครเมตร ใส่ขวดฆ่าเชื้อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

(b) เตรียมสารละลาย Salt mixture ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยชั่งสารดังต่อไปนี้

- KCl ปริมาณ 0.4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น DDW ฆ่าเชื้อ
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ปริมาณ 3 กรัม ละลายในน้ำกลั่น DDW ฆ่าเชื้อ
- $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ปริมาณ 3.3 กรัม ละลายในน้ำกลั่น DDW ฆ่าเชื้อ
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ปริมาณ 0.05 กรัม ละลายในน้ำกลั่น DDW ฆ่าเชื้อ

นำสารละลายทั้ง 4 มาผสมเข้าด้วยกันและปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

(c) เตรียมสารละลาย $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยชั่งสาร $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ปริมาณ 0.9 กรัม ละลายในน้ำกลั่น DDW ฆ่าเชื้อ ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

(d) สารละลาย NaCl ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยชั่ง NaCl ปริมาณ 11 กรัม ละลายในน้ำกลั่น DDW ฆ่าเชื้อ ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

(e) สารละลาย L-glutamine ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยชั่ง L-glutamine ปริมาณ 0.15 กรัม ละลายในน้ำกลั่น DDW ฆ่าเชื้อ ปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตร

(f) HEPES ชั่ง HEPES 0.238 กรัมต่อสารละลาย M-199 100 มิลลิลิตร

นำสารในข้อ (a) (b) (c) (d) (e) และ (f) ผสมตามตารางการเตรียม K-199 จากนั้นปรับค่าความเป็นกรดต่างให้ได้ 7.4 แล้วปรับปริมาตรให้ครบตามปริมาตรที่ต้องการ กรองผ่านหัวกรอง 0.22 ไมโครเมตร ใส่ขวดฆ่าเชื้อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ปริมาตร (มิลลิลิตร) สารละลาย	100	200	500
	1. M-199 (มิลลิลิตร)	50	100
2. Salt mixture (มิลลิลิตร)	10	20	50
3. CaCl ₂ ·2H ₂ O (มิลลิลิตร)	10	20	50
4. NaCl (มิลลิลิตร)	10	20	50
5. L-glutamine (มิลลิลิตร)	1	2	5
6. HEPES (กรัม)	0.238	0.476	1.19
7. น้ำกลั่น (DDW, มิลลิลิตร)	19	38	95

6. สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ไลโซไซม์

สารละลาย Phosphate-Citrate buffer solution pH 5.8

Solution A: ชั่งไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na₂HPO₄) 7.098 กรัม ละลายในน้ำกลั่น DDW คนให้สารละลายจนหมดจากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 500 มิลลิลิตร

Solution B: ชั่งกรดซิตริก (Citric acid) 10.507 กรัม ละลายในน้ำกลั่น DDW คนให้สารละลายจนหมดจากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 500 มิลลิลิตร

จากนั้นผสม Solution A และ Solution B ในอัตราส่วน 3:1 คนให้เข้ากันปรับค่าความเป็นกรดต่างให้ได้ 5.8 หากต่ำกว่า 5.8 ให้ใช้ Solution A ปรับให้ค่าความเป็นกรดต่างสูงขึ้น หากสูงกว่า 5.8 ให้ใช้ Solution B ปรับให้ค่าความเป็นกรดต่างลดลง จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที (เตรียมก่อนใช้)

สารละลายแบคทีเรีย *Micrococcus lysodeikticus* 0.075 เปอร์เซ็นต์: ชั่งผงแบคทีเรียไมโครคอกคัส (*M. lysodeikticus*) 0.0375 กรัม ละลายในสารละลาย Phosphate-Citrate buffer solution พีเอช 5.8 คนให้ละลาย แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 50 มิลลิลิตร (เตรียมก่อนใช้)

สารละลายมาตรฐานไลโซไซม์ (Hen egg white lysozyme): ชั่ง Hen egg white lysozyme 0.01 กรัม ละลายในสารละลาย Phosphate-Citrate buffer solution พีเอช 5.8 ปรับ

ปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย Hen egg white lysozyme ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (เตรียมก่อนใช้)

2.3 สารเคมีสำหรับการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์

1. สารเคมีสำหรับการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ทริปซิน

HCl 50 mM: เจือจางจาก HCl เข้มข้น โดยดูด HCl มา 0.102 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่น DDW ปรับปริมาตรให้ครบ 25 มิลลิลิตรจะได้ HCl ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์

Tris –HCl pH7.5: ชั่ง Tris มา 1.514 กรัมละลายในน้ำกลั่น DDW ปริมาตรพอประมาณ จากนั้นใช้ HCl ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปรับค่าความเป็นกรดต่างให้ได้ 7.5 และปรับปริมาตรให้ครบ 250 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1 mM Benzoyl-L-Arg-p-nitroanilide (BAPNA): ชั่ง BAPNA มา 0.0033 กรัม ละลายใน DMSO ประมาณ 100 ไมโครลิตร ก่อนจะละลายด้วยสารละลาย Tris –HCl pH 7.5 และปรับปริมาตรให้ครบ 7.5 มิลลิลิตรจะได้ Benzoyl-L-Arg-p-nitroanilide ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์

2. สารเคมีสำหรับการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคโมทริปซิน

1 mM Succinyl-Ala-Ala-Pro-phenylalanine-p-nitroanilid (SAPNA): ชั่ง SAPNA มา 0.002 กรัม ละลายใน DMSO ประมาณ 100 ไมโครลิตร ก่อนจะละลายด้วยสารละลาย Tris –HCl pH 7.5 และปรับปริมาตรให้ครบ 7.5 มิลลิลิตรจะได้ Succinyl-Ala-Ala-Pro-phenylalanine-p-nitroanilid ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์

3. สารเคมีสำหรับการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส

Soluble starch 1% : เตรียมโดยชั่ง Soluble starch มา 1 กรัมละลายใน Tris –HCl pH 7.5 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปอุ่นให้ร้อนเล็กน้อยและคนจนแป้งละลายหมด ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นก่อนนำไปใช้

3,5-dinitrosalicylic acid (DNS): เตรียมโดยชั่ง DNS มา 1 กรัมละลายในน้ำกลั่น DDW 40 มิลลิลิตร จากนั้นเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มอล (NaOH 1N)

ปริมาตร 40 มิลลิลิตร คนจน DNS ละลายหมด แล้วจึงเติม Potassium sodium tartrate ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 30 กรัม ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตรเก็บไว้อย่าให้โดนแสง

4. สารเคมีสำหรับการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

0.01 M Nitrophenylpalmitate: เตรียมโดยชั่ง Nitrophenyl มา 0.0264 กรัมละลายใน 2-propanol ปรับปริมาตรให้ครบ 7 มิลลิลิตร

0.1 M Sodium carbonate (Na_2CO_3): เตรียมโดยชั่งโซเดียมคาร์บอเนต 0.212 กรัม ละลายใน Tris-HCl pH 7.5 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

2.4 สารเคมีและวิธีการเตรียมตัวอย่างสำหรับการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตามวิธีการของ Bancroft (1967) และ Humason (1972)

สารเคมี

1. น้ำยาดองเดวิดสัน (Davidson s fixative)

100 เปอร์เซ็นต์ฟอรัมาลิน (formaldehyde 37-39%)	220 มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	115 มิลลิลิตร
Tap water	335 มิลลิลิตร

ผสมส่วนผสมต่างๆ ให้เข้ากันเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2. สีย้อมฮีมาทอกซิลิน (haematoxylin)

ฮีมาทอกซิลิน (haematoxylin crystal)	4 กรัม
โซเดียมไอโอเดท (sodium iodate)	0.8 กรัม
อลูมิเนียม (potassium aluminium sulfate, alum)	100 กรัม
กรดซิตริก (citric acid)	4 กรัม
คลอรัลไฮเดรท (chloral hydrate)	200 กรัม
น้ำกลั่น	2,000 มิลลิลิตร

ละลายอลูมิเนียมลงในน้ำกลั่น เติมฮีมาทอกซิลินผสมจนกระทั่งละลายหมดจึงเติมโซเดียมไอโอเดทผสมให้เข้ากันจากนั้นเติมกรดซิตริกและคลอรัลไฮเดรทจนกระทั่งเป็นเนื้อเดียวกันทิ้งไว้ 1 สัปดาห์ ก่อนนำมาใช้งาน

3. สีย้อมอีโอซิน

อีโอซิน (eosin Y.CI 45380)	1 กรัม
เอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์	1,000 มิลลิลิตร
กรดอะซิติกเข้มข้น	5 มิลลิลิตร

ผสมสารทุกอย่างเข้าด้วยกัน

การเตรียมตัวอย่าง

ทำให้กึ่งสลดด้วยน้ำแข็งที่เย็นจัดจากนั้นผ่าเปิดเปลือกบริเวณหัวและออกอกกึ่งคิน้ำยาแดงเวดิสันให้ทั่วตับและตับอ่อนของกึ่ง ตัดตับและตับอ่อนที่ได้มาคงอยู่ในน้ำยาแดงเวดิสันเป็นเวลา 3 วัน เปลี่ยนเป็นเอทานอลความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 วัน และเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 วัน เพื่อรักษาสภาพของเนื้อเยื่อ หลังจากนั้นนำไปผ่านขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อตามวิธีการของ Humason (1979)

1. ตบแต่งตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ผ่านการคงแล้วให้มีขนาดพอเหมาะเพื่อสะดวกต่อการ embed และการตัด section

2. นำตัวอย่างไปผ่านขั้นตอน dehydration ด้วยเครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่	สารละลาย	เวลา (ชั่วโมง)
1.	แอลกอฮอล์ 50 เปอร์เซ็นต์	1
2.	แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์	1
3.	แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์	1
4.	แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	1
5.	แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	1
6.	แอลกอฮอล์บริสุทธิ์ (absolute alcohol)	1
7.	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์ (isopropyl alcohol)	1
8.	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์	1
9.	ไซลีน (xylene)	1
10.	ไซลีน	1

11. พาราพลาสต์ (paraplast) 1
12. พาราพลาสต์ 1

3. นำตัวอย่างที่ผ่านขั้นตอน dehydration ด้วยเครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติไป embed ด้วยพาราพลาสต์ จากนั้นนำ block ที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อง่ายต่อการตัด section

4. ตกแต่ง block ตัวอย่างที่ได้ให้มีขนาดพอเหมาะกับขนาดสไลด์ ก่อนนำไปตัด section ด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อ (microtome) ให้มีความหนาประมาณ 3-5 ไมครอน นำไปลอยในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส ใช้สไลด์ซ้อนตัวอย่างที่ตัดได้ นำไปอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง

5. นำสไลด์ที่อบแล้วไปย้อมด้วยสีฮีมาทอกซิลินและอีโอซินตามขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่	สารละลาย	เวลา (นาที)
1	ไซลีน	2
2.	ไซลีน	2
3.	ไซลีน	2
4.	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์	1
5.	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์	1
6.	แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	1
7.	แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์	1
8.	แอลกอฮอล์ 50 เปอร์เซ็นต์	1
9.	น้ำกลั่น	1
10.	ฮีมาทอกซิลิน	20
11.	น้ำประปา	1
12.	น้ำกลั่น	1
13.	แอลกอฮอล์ 50 เปอร์เซ็นต์	2
14.	อีโอซิน	4
15.	แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์	2

16.	แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	2
17.	แอมโซลูท แอลกอฮอล์	2
18.	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์	2
19.	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์	2
20.	ไซลีน	2
21.	ไซลีน	2
22.	ไซลีน	2

6. นำสไลด์ที่ผ่านการย้อมมาทำเป็นสไลด์ถาวรด้วยน้ำยาเปอร์เมนท์ (permount) แล้วนำไปศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2.5 สารเคมีและวิธีการวิเคราะห์ห้องประกอบทางเคมีและโพรติจีโอซินในอาหาร

1. การวิเคราะห์ความชื้น (ตามวิธีการของ AOAC, 1990)

- นำถ้วย (crucible) ไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 40 นาที และทำให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งและบันทึกน้ำหนักของถ้วยโดยละเอียด

- ชั่งตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ความชื้นใส่ถ้วยประมาณ 1 กรัม จดบันทึกน้ำหนักอย่างละเอียด

- นำตัวอย่างไปอบ ในตู้อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมง

- นำตัวอย่างที่อบแล้วใส่โถดูดความชื้นทิ้งไว้ให้เย็น บันทึกน้ำหนักของตัวอย่าง

- ทำซ้ำตามข้อ 1 ถึง 5 จนกระทั่งน้ำหนักที่ได้คงที่ โดยน้ำหนักที่หายไปคือน้ำหนักของความชื้น

คำนวณ % ความชื้นด้วยสมการ

$$\% \text{ ความชื้น} = \frac{(a - b)}{w} \times 100$$

เมื่อ a = น้ำหนักของอาหารและขวดชั่งก่อนอบแห้ง (กรัม)

b = น้ำหนักของอาหารและขวดชั่งหลังอบแห้ง (กรัม)

w = น้ำหนักของอาหารก่อนอบ (กรัม)

2. การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า (ตามวิธีการของ AOAC, 1990)

- ชั่งตัวอย่างประมาณ 2 กรัม ใส่ในถ้วยกระเบื้องเคลือบที่บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน
- นำตัวอย่างที่ชั่งแล้วไปเผาในเตาเผาที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา

3 ชั่วโมง จนเถ้าเป็นสีขาว

- นำถ้วยกระเบื้องที่ผ่านการเผาเข้าโถดูดความชื้น จนกระทั่งตัวอย่างเย็นลง นำออกมาชั่งน้ำหนักโดยละเอียด

คำนวณ % เถ้าด้วยสมการ

$$\% \text{ เถ้า} = \frac{(b - a) \times 100}{w}$$

เมื่อ a = น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องเคลือบ

b = น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องเคลือบกับน้ำหนักของเถ้าภายหลังการเผา

w = น้ำหนักของอาหารก่อนเผา

3. การวิเคราะห์หาโปรตีน (ตามวิธีการของ AOAC, 1990)

สารเคมี

กรดซัลฟูริก (sulfuric acid, H₂SO₄) เข้มข้น 93 - 98 เปอร์เซ็นต์

สารเร่งรวม (catalyst mixture): เตรียมโดย ชั่งคอปเปอร์ซัลเฟต (copper sulfate, CuSO₄) 7 กรัม กับโพแทสเซียมซัลเฟต (potassium sulfate, K₂SO₄) 100 กรัมผสมให้เข้ากัน

โซเดียมไฮดรอกไซด์ 45 เปอร์เซ็นต์ (sodium hydroxide, NaOH): เตรียมโดยละลาย 450 กรัมของโซเดียมไฮดรอกไซด์ ชนิดเกล็ดลงในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร

สารละลายกรดเกลือ (hydrochloric acid, HCl) 0.1 นอร์มอล: เตรียมโดย ละลายกรดเกลือ 9 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร

กรดบอริก (boric acid, H₃BO₃) 4 เปอร์เซ็นต์: เตรียมโดย ต้มน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ให้ร้อนแล้วใส่ผงกรดบอริกลงไป 40 กรัม ต้มจนละลายหมด ทิ้งไว้จนสารละลายเย็นลงแล้วจึงเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มิลลิลิตร

อินดิเคเตอร์รวม (mixed indicator): เตรียมโดยละลายเมทิลเรด (methyl red) 0.2 กรัม ในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร และละลายเมทิลีนบลู (methylene blue) 0.2 กรัม ในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายเมทิลเรด 2 ส่วน ผสมกับสารละลายเมทิลีนบลู 1 ส่วน เขย่าให้เข้ากัน

เมทิลออเรนจ์ อินดิเคเตอร์ (methyl orange indicator): เตรียมโดยละลายเมทิล-ออเรนจ์ 0.1 กรัม ในน้ำกลั่น ปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate, Na_2CO_3) 0.1 นอร์มอล: เตรียมโดย อบโซเดียมคาร์บอเนตที่อุณหภูมิ 260 - 270 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ซึ่งสารมา 1.325 กรัม เติมน้ำกลั่น ปริมาตรให้ได้ 250 มิลลิลิตร

ขั้นตอนการย่อย

ซึ่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักประมาณ 0.5 กรัม ใส่ลงบนกระดาษกรองที่ปราศจากสารในโตรเจนแล้วห่อตัวอย่างใส่ในขวดแก้ววิเคราะห์โปรตีน เติมน้ำกลั่น 3 กรัม เติมน้ำกลั่นฟลูออโรซิม 10 มิลลิลิตร นำไปย่อยด้วยชุดเครื่องย่อยโปรตีน ที่อุณหภูมิ 420 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จนกระทั่ง สารละลายในขวดแก้ววิเคราะห์ใส (สีเขียวอมรด) ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

ขั้นตอนการกลั่น

นำหลอดโปรตีนที่เย็นลงต่อเข้ากับเครื่องกลั่นที่มีขวดรูปชมพู่ซึ่งบรรจุกรดบอริก 40 มิลลิลิตร (ใส่อินดิเคเตอร์รวม 2-3 หยด) โดยให้ปลายของหลอดแก้วต่อจากกระบอกแก้วควมแน่นให้อยู่ในกรดบอริก ทำการเลือกกระดบการกลั่นที่ตั้งไว้ (โปรแกรม 1) ได้แก่ เติมน้ำกลั่นปริมาตร 20 มิลลิลิตร และเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยเครื่องกลั่นจะทำงานอัตโนมัติ เป็นระยะเวลา 5 นาทีต่อตัวอย่าง จะสังเกตเห็นสารละลายมีสีดำ จนกระทั่งไม่มีแก๊สแอมโมเนียออกมา นำขวดรูปชมพู่ออกจากเครื่องกลั่น

ขั้นตอนการไตเตรท

นำสารที่ได้ไตเตรทด้วยกรดเกลือมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน จนถึงจุดยุติ (end point) สารละลายจะเปลี่ยนเป็นชมพูอ่อนบันทึกปริมาตรของกรดเกลือมาตรฐานเพื่อใช้ในการคำนวณโปรตีนต่อไป

การคำนวณ%โปรตีนด้วยสมการ

$$= \frac{1.4 (v_1 - v_2) N \times 6.25}{w}$$

เมื่อ V_1 = ปริมาตรของกรดมาตรฐานที่ใช้ไตเตรทตัวอย่าง

V_2 = ปริมาตรของกรดมาตรฐานที่ใช้ไตเตรทกับ Blank

N = เป็นความเข้มข้นของกรดเกลือ (นอร์มอล)

W = น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์

4. การวิเคราะห์ไขมันรวม

สารเคมี

- ปีโตรเลียมอีเทอร์ (Petroleum ether)

ขั้นตอนการวิเคราะห์

- อบด้วยสกัดไขมันที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น
- อบตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 คืน ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น
- ชั่งน้ำหนักด้วยสกัดไขมันพร้อมลูกแก้วให้ได้น้ำหนักคงที่ (w_1)
- ชั่งและบันทึกน้ำหนักตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ใส่ในกระดาศกรองประมาณ 1 กรัม (w_2) ห่อให้มิดชิด ใส่ลงในไส้กรอง (thimble) ที่เตรียมไว้
- เติมปีโตรเลียมอีเทอร์ปริมาตร 80 มิลลิลิตรต่อตัวอย่างในด้วยสกัดไขมัน
- ใส่ตัวอย่างพร้อมไส้กรอง ในด้วยสกัดไขมัน นำไปใส่ประกอบเข้าเครื่องวิเคราะห์ไขมัน (Soxtec CU 8000)
- เครื่องสกัดไขมันทำงานอัตโนมัติใช้ระยะเวลา 1 ชั่วโมง 10 นาที มีขั้นตอนดังนี้ boiling หรือต้มเดือด 20 นาที rinsing เพื่อชะสารออกจากตัวอย่าง 40 นาที และ solvent recovery เพื่อระเหย 10 นาที
- นำด้วยสกัดไขมันออกจากเครื่องสกัดไขมัน แล้วนำไปอบที่ 105 องศาเซลเซียส จนแห้งแล้วทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น
- นำด้วยสกัดไขมันหลังอบแห้งมาชั่งและบันทึกน้ำหนัก (w_3) นำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ไขมันตามสูตร

$$\% \text{ ไขมัน} = \frac{w_3 - w_1}{w_2} \times 100$$

เมื่อ

w_1 = น้ำหนักด้วยพร้อมลูกแก้ว

w_2 = น้ำหนักตัวอย่าง

w_3 = น้ำหนักด้วยพร้อมลูกแก้วและไขมันหลังอบ

5. การวิเคราะห์ปริมาณโพรงดิโอรินในอาหารตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Britton และคณะ (1995) และ Williams และคณะ (1955)

สารเคมี

- ไดเอทิลอีเทอร์ (Diethyl ether)
- อะซิโตน (Acetone)

วิธีการสกัดและวิเคราะห์

- ชั่งตัวอย่างอาหารมาปริมาณ 1 กรัม นำไปสกัดด้วยตัวทำละลายอะซิโตนพร้อมกับการบดอาหารให้ละเอียด สกัดซ้ำตามขั้นตอนเดิมจนกระทั่งตัวทำละลายที่ใช้ไม่มีสี
- นำสารละลายที่ได้มาใส่กรวยแยก เติมไดเอทิลอีเทอร์และน้ำกลั่นเขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งสารละลายแยกชั้น ไขส่วนที่เป็นน้ำทิ้ง เติมน้ำกลั่นอีกครั้ง เขย่าตั้งทิ้งไว้ ไขส่วนที่เป็นน้ำทิ้ง ทำซ้ำ 5-7 ครั้ง
- สารละลายที่ได้นำไปวิเคราะห์ปริมาณสารสีตามสูตรดังนี้

$$\text{Pigment content } (\mu\text{g/g}) = ((\text{OD} / 0.25) \times \text{extract volumn}) / \text{weigh of sample}$$

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นาย ธรานันท์ คงกะพันธ์

รหัสนักศึกษา 5810620016

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (วาริชศาสตร์)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2554

ทุนการศึกษา

ทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ทุนเรียนดีประจำปีการศึกษา 2558 จากคณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์