ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การประมง)

ปริญญา

วิทยาศาสตร์การประมง | ชีววิทยาประมง

สาขา | **ภาควิชา**

เรื่อง การใช้แบคทีเรียกลุ่มสร้างสปอร์ในการควบคุมแบคทีเรียก่อโรค *Vibrio harveyi* ในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*)

Application of Spore-forming Bacteria for Controlling Pathogenic Bacteria *Vibrio harveyi* in *Litopenaeus vannamei* Culture

นามผู้วิจัย นางสาวปาจรีย์ จือเหลียง

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

(รองศาสตราจารย์ชลอ ลิ้มสุวรรณ, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์นิติ ชูเชิด, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์วัชริยา ภูรีวิโรจน์กุล, ปร.ด.)

หัวหน้าภาควิชา .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ณรงค์ วีระไวทยะ, M.Sc.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... **เดือน** ..... **พ.ศ.** .....

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การใช้แบคทีเรียกลุ่มสร้างสปอร์ในการควบคุมแบคทีเรียก่อโรค *Vibrio harveyi* ในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*)

Application of Spore-forming Bacteria for Controlling Pathogenic Bacteria *Vibrio harveyi* in *Litopenaeus vannamei* Culture

โดย

นางสาวปาจรีย์ จือเหลียง

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การประมง)
พ.ศ. 2554

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปาจรีย์ จือเหลียง 2554: การใช้แบคทีเรียกลุ่มสร้างสปอร์ในการควบคุมแบคทีเรียก่อโรค *Vibrio harveyi* ในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การประมง) สาขาวิทยาศาสตร์การประมง ภาควิชาชีววิทยาประมง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์ชลอ ลิ้มสุวรรณ, Ph.D. 89 หน้า

การศึกษาผลของแบคทีเรียสร้างสปอร์ในการควบคุมแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* และอัตรารอดในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) โดยแยกแบคทีเรียจากผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกได้ 5 ชนิดได้แก่ *Brevibacillus parabrevis, Bacillus velezensis, B. amyloliquifaciens, B. subtilis, B. megaterium* และนำมาทดสอบความสามารถในการต่อต้านแบคทีเรีย *V. harveyi* โดยการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียแต่ละชนิดทั้ง 5 ชนิดและ *Bacillus* รวมทุกชนิดสามารถยับยั้งเชื้อ *V. harveyi* ได้ดีภายใน 48 ชั่วโมง การแข่งขันการใช้สารอาหารระหว่างแบคทีเรีย *Bacillus* sp. แต่ละชนิดที่แยกได้และการรวมกันของแบคทีเรียสร้างสปอร์ในการเลี้ยงรวมกับ *V. harveyi* ซึ่งทำการศึกษาในห้องปฏิบัติการโดยเลี้ยง *Bacillus* sp. แต่ละชนิดและการรวมกันของแบคทีเรียสร้างสปอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth ที่เติมเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของเชื้อ *Bacillus* และ*V. harveyi* ที่ 10^6 CFU/มิลลิลิตร ทั้งในการเลี้ยงเดี่ยวและการเลี้ยงร่วม จากนั้นตรวจนับจำนวนของ *Bacillus* และ *V. harveyi* ที่ 0, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง เมื่อเวลาผ่านไป 120 ชั่วโมงของการเลี้ยงร่วมกันพบว่า การรวมกันของแบคทีเรียสร้างสปอร์ *B. velezensis, B. amyloiquifaciens*, *B. subtilis*, *B. megaterium* และ *Brevibacillus parabrevis* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *V. harveyi* ได้เท่ากับ 98.42, 87.37, 86.58, 85.79, 72.37 และ 71.58 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ผลของโพรไบโอติกแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* spp. ต่ออัตรารอดและการเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไมขนาดน้ำหนัก 7-8 กรัม โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มควบคุม (เลี้ยงด้วยอาหารปกติ) และกลุ่มทดลองซึ่งให้อาหารสำเร็จรูปที่ผสมผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกในอัตราส่วนโพรไบโอติก 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมเลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน พบว่าอัตรารอดตายของกุ้งในกลุ่มทดลองมีค่า 75.00 ± 1.92 % ซึ่งสูงกว่ากลุ่มควบคุม 63.33 ± 2.72 % อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แต่น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งในกลุ่มทดลอง 21.55 ± 1.98 กรัม มีค่าไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 23.70 ± 1.57 กรัม และผลของโพรไบโอติกในการควบคุมแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ที่ทำการศึกษาในฟาร์มกุ้งหลังระยะเวลาเลี้ยงกุ้ง 90 วัน บ่อกุ้งที่ให้อาหารผสมโพรไบโอติก สามารถลด *Vibrio* spp. ในเลือดกุ้งจาก10^4 CFU/มิลลิลิตร เป็น 10^2 CFU/มิลลิลิตร ขณะที่ในกลุ่มทดลองที่ให้อาหารปกติมีปริมาณเชื้อ *Vibrio* spp. ในเลือดกุ้งเท่ากับ 10^4 CFU/มิลลิลิตร ส่วนน้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งในบ่อทดลองและบ่อควบคุมมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่าเท่ากับ 16.14 ± 1.58 กรัม และ 15.41 ± 0.80 กรัม ตามลำดับ เช่นเดียวกับอัตรารอดตายของกุ้งขาวในบ่อทดลองซึ่งเท่ากับ 81.73 เปอร์เซ็นต์ และบ่อควบคุมเท่ากับ 80.40 เปอร์เซ็นต์

_____ _____ ___ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Pajaree Jueliang 2011: Application of Spore-forming Bacteria for Controlling Pathogenic Bacteria *Vibrio harveyi* in *Litopenaeus vannamei* Culture. Master of Science (Fisheries Science), Major Field: Fisheries Science, Department of Fishery Biology. Thesis Advisor: Associate Professor Chalor Limsuwan, Ph.D. 89 pages.

Effect of spore-forming bacteria for controlling *Vibrio harveyi* and survival rate of *Litopenaeus vannamei,* was carried out by re-isolated the *Bacillus* from the product. Five strains of *Bacillus* spp. were isolated and identified as follows; *Brevibacillus parabrevis, Bacillus velezensis, B. amyloliquifaciens, B. subtilis, B. megaterium*. Individual strain and product was used to test against pathogenic bacteria (*Vibrio harveyi*) on agar plate, using agar plate diffusion method. The results showed that each stain of spore-forming bacteria as well as a product could inhibit *V. harveyi* within 48 hours. Competitive growth between individual strain of *Bacillus* sp. and combination of spore-forming bacteria with *V. harveyi* was studied *in vitro*. Each species of *Bacillus* and combination of spore-forming bacteria were culture in Nutrient Broth supplemented with 1.5% NaCl. The initial concentration of experiment *Bacillus* spp. and *V. harveyi* was 10^6 CFU/ml in both monoculture and co-culture. Total *Bacillus* and *Vibrio* counts were measured at 0, 24, 48, 72, 96 and 120 hours. The result at 120 hrs post inoculation showed that combination of spore-forming bacteria, *B. velezensis, B. amyloiquifaciens*, *B. subtilis*, *B. megaterium* and *Brevibacillus parabrevis* could decreased *V. harveyi* by 98.42, 87.37, 86.58, 85.79, 72.37 and 71.58 % respectively.

The effects of probiotic on survival and growth of juvenile *L. vannamei* (7-8 g) in laboratory conditions were also tested. Shrimp were divided into two groups. Control group was fed with the pelleted feed (no probiotic) and the treatment group fed with feed mixed with probiotic at rate of 5 g/kg of feed. At the end of 60-day culture period, the survival rate of shrimp in treatment group was 75.00 ± 1.92 % and significantly higher ($p<0.05$) than control group which was 63.33 ± 2.72 %. However, average weight of treatment and control group was not significantly different which was 21.55 ± 1.98 g and 23.70 ± 1.57 g, recpectively. And the effect of probiotic for control *Vibrio* spp. was also studied at commercial farm. The result showed that probiotic could reduce the *Vibrio* spp. count in shrimp haemolymph from 10^4 CFU/ml to 10^2 CFU/ml within 90 days while the count remained at 10^4 CFU/ml through out the 90 days culture period in the haemolymph of shrimp in the control ponds. After 90 days, average weight of shrimp in treatment ponds and control ponds were not significantly different which was 16.14 ± 1.58 g and 15.41 ± 0.80 g, respectively. Survival rate of shrimp in treatment and control ponds was also not different which was 81.73 % and 80.40%, recpectively.

_____ _____ ___ / ___ / ___

Student's signature Thesis Advisor's signature

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ชลอ ลิ้มสุวรรณ ประธานกรรมการที่ปรึกษา ที่ได้ช่วยเหลือในการวางแผนงานวิจัยในวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ตลอดจนการให้คำปรึกษาแนะนำและตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นิติ ชูเชิด และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วัชริยา ภูรีวิโรจน์กุล กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม รองศาสตราจารย์ ดร.วราห์ เทพาหุดี ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัจฉรี เรืองเดช และ ดร.พรเลิศ จันทร์รัชชกูล ที่กรุณาให้คำปรึกษาและตรวจแก้ไขทำให้วิทยานิพนธ์สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณคุณวิชิต สุรเนตร (วิชิตฟาร์ม) ที่อนุเคราะห์สถานที่ในการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบคุณบริษัท Novozymes Biological, Asia Pacific ที่สนับสนุนทุนในการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณพ่อ คุณแม่และครอบครัวที่คอยให้กำลังใจเสมอมา ขอขอบคุณสมาชิกศูนย์วิจัยธุรกิจเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือและให้กำลังใจตลอดการทำงาน

ปาจรีย์ จือเหลียง

กุมภาพันธ์ 2554

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	28
ผลและวิจารณ์ผล	39
สรุปผล	67
ข้อเสนอแนะ	68
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	69
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	89

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แบคทีเรียกลุ่มวิบริโอที่ก่อโรคในคนและสัตว์	7
2	ชนิดของโพรไบโอติกที่ใช้ในการการเพาะเลี้ยงกุ้ง	17
3	ชนิดของโพรไบโอติกที่ใช้ในการควบคุมคุณภาพน้ำ	24
4	แบคทีเรียที่สามารถจำแนกชนิดได้ในผลิตภัณฑ์ PondSafe โดยใช้ชุด API 50 CHB	39
5	ขนาดของ clear zone ของการรวมกันของแบคทีเรียกลุ่มสร้างสปอร์, *Brevibacillus parabrevis*, *Bacillus velezensis*, *Bacillus amyloliguifaciens*, *Bacillus subtilis* และ *Bacillus megaterium* ต่อการยับยั้งเชื้อ *Vibrio harveyi* ที่ 48 ชั่วโมง	43
6	ปริมาณของเชื้อ *Vibrio harveyi* (V), เมื่อเลี่ยงเดี่ยวและเลี้ยงร่วมกับ *Brevibacillus parabrevis* (B1), *Bacillus velezensis* (B2), *Bacillus amyloliguifaciens* (B3), *Bacillus subtilis* (B4), *Bacillus megaterium* (B5) และการรวมกันของแบคทีเรียกลุ่มสร้างสปอร์ (P) (CFU/มิลลิลิตร)	46
7	เปอร์เซ็นต์ของเชื้อ *Vibrio harveyi* ที่ลดลง เมื่อเลี้ยงร่วมกับ *Brevibacillus parabrevis*, *Bacillus velezensis*, *Bacillus amyloliguifaciens*, *Bacillus subtilis* *Bacillus megaterium* และการรวมกันของแบคทีเรียกลุ่มสร้างสปอร์	47
8	ปริมาณของเชื้อ *Brevibacillus parabrevis* (B1), *Bacillus velezensis* (B2), *Bacillus amyloliguifaciens* (B3), *Bacillus subtilis* (B4), *Bacillus megaterium* (B5) และการรวมกันของแบคทีเรียกลุ่มสร้างสปอร์ (P) เมื่อเลี้ยงร่วมกับ *Vibrio harveyi* (V) (CFU/มิลลิลิตร)	48
9	ปริมาณของเชื้อเชื้อ *Brevibacillus parabrevis* (B1), *Bacillus velezensis* (B2), *Bacillus amyloliguifaciens* (B3), *Bacillus subtilis* (B4), *Bacillus megaterium* (B5) และการรวมกันของแบคทีเรียกลุ่มสร้างสปอร์ (P) เมื่อเลี้ยงเดี่ยวเป็นกลุ่มควบคุม (CFU/มิลลิลิตร)	49
10	อัตรารอดและผลผลิตทั้งหมดของกุ้งขาวแวนนาไมในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองหลังระยะเวลาเลี้ยงนาน 60 วัน	54

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
11	ปริมาณแบคทีเรียรวมและ *Vibrio* spp. ในลำไส้กุ้งขาวแวนนาไมในกลุ่มที่ให้อาหารผสมโพรไบโอติกและกลุ่มที่ให้อาหารไม่ผสมโพรไบโอติกหลังระยะเวลาการเลี้ยงนาน 60 วัน	56
12	คุณภาพน้ำระหว่างการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมของกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง	59
13	ปริมาณแบคทีเรียรวมเฉลี่ยและเชื้อ *Vibrio* spp. ที่พบในเลือดกุ้งขาวแวนนาไมในกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมในบ่อเลี้ยงกุ้ง	60
14	น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาวแวนนาไมในบ่อเลี้ยงกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม	63
15	อัตรารอดและผลผลิตทั้งหมดของกุ้งขาวแวนนาไมในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองหลังจากการเลี้ยงนาน 90 วัน	66

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	การศึกษาผลของแบคทีเรียกลุ่มสร้างสปอร์ต่ออัตรารอดและการเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไมในห้องปฏิบัติการ ณ ศูนย์วิจัยธุรกิจเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน	37
2	การศึกษาผลของแบคทีเรียกลุ่มสร้างสปอร์ต่อปริมาณ *Vibrio* spp. และผลต่ออัตรารอด การเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไมในบ่อเลี้ยงกุ้ง ณ ฟาร์มเอกชน อำเภอนายายอาม จังหวัดจันทบุรี	37
3	ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ PondSafe	38
4	อาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar: Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose agar (ซ้าย) และอาหารเลี้ยงเชื้อ NA: Nutrient Agar (ขวา)	38
5	แบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ที่พบในผลิตภัณฑ์ PondSafe ที่ศึกษาด้วยการย้อมแกรม	40
6	การเกิด inhibition effect ของการรวมกันของแบคทีเรียสร้างสปอร์ทั้ง 5 สายพันธุ์ (ซ้าย) และ *Brevibacillus parabrevis* (ขวา) ต่อเชื้อ *Vibrio harveyi*	42
7	การเกิด clear zone ของการรวมกันของแบคทีเรียสร้างสปอร์ทั้ง 5 สายพันธุ์ต่อเชื้อ *Vibrio harveyi*	42
8	ปริมาณของการรวมกันของแบคทีเรียสร้างสปอร์และ*Vibrio harveyi* (CFU/ มิลลิลิตร) ในการเลี้ยงเดี่ยวและเลี้ยงร่วมกันที่ระยะเวลา 0, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง	50
9	ปริมาณเชื้อ *Bacillus velezensis* และ *Vibrio harveyi* (CFU/ มิลลิลิตร) ในการเลี้ยงเดี่ยวและเลี้ยงร่วมกันที่ระยะเวลา 0, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง	50
10	ปริมาณเชื้อ *Bacillus amyloliguifaciens* และ *Vibrio harveyi* (CFU/ มิลลิลิตร) ในการเลี้ยงเดี่ยวและเลี้ยงร่วมกันที่ระยะเวลา 0, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง	51
11	ปริมาณเชื้อ *Bacillus subtilis* และ *Vibrio harveyi* (CFU/ มิลลิลิตร) ในการเลี้ยงเดี่ยวและเลี้ยงร่วมกันที่ระยะเวลา 0, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง	51

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
12	ปริมาณเชื้อ *Bacillus megaterium* และ *Vibrio harveyi* (CFU/ มิลลิลิตร) ในการเลี้ยงเดี่ยวและเลี้ยงร่วมกันที่ระยะเวลา 0, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง	52
13	ปริมาณเชื้อ *Brevibacillus parabrevis* และ *Vibrio harveyi* (CFU/ มิลลิลิตร) ในการเลี้ยงเดี่ยวและเลี้ยงร่วมกันที่ระยะเวลา 0, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง	52
14	น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาวในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองตลอดระยะเวลาการเลี้ยง 60 วัน	54
15	อัตรารอดตายของกุ้งขาวที่เลี้ยงในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองตลอดระยะเวลาการเลี้ยง 60 วัน	55
16	ผนังลำไส้กุ้งขาวในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope: SEM)	57
17	ปริมาณเชื้อ *Vibrio* spp. ที่พบในเลือดกุ้งขาวแวนนาไมในบ่อเลี้ยงกุ้งกลุ่มทดลอง	61
18	ปริมาณเชื้อ *Vibrio* spp. ที่พบในเลือดกุ้งขาวแวนนาไมในบ่อเลี้ยงกุ้งกลุ่มควบคุม	61
19	ปริมาณแบคทีเรียรวมที่พบในเลือดกุ้งขาวแวนนาไมในบ่อเลี้ยงกุ้งกลุ่มทดลอง	62
20	ปริมาณแบคทีเรียรวมที่พบในเลือดกุ้งขาวแวนนาไมในบ่อเลี้ยงกุ้งกลุ่มควบคุม	62
21	น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาวแวนนาไมในบ่อเลี้ยงกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง	65

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การใช้แบคทีเรียกลุ่มสร้างสปอร์ในการควบคุมแบคทีเรียก่อโรค *Vibrio harveyi* ในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*)

Application of Spore-forming Bacteria for Controlling Pathogenic Bacteria *Vibrio harveyi* in *Litopenaeus vannamei* Culture

คำนำ

อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งของประเทศไทยสามารถทำเงินเข้าประเทศปีละหลายหมื่นล้านบาท จากรายงานพบว่าประเทศไทยก้าวสู่การเป็นผู้นำทั้งด้านการผลิตและการส่งออกสินค้ากุ้งและผลิตภัณฑ์มาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2534 ซึ่งหากนับจนถึงปัจจุบันอุตสาหกรรมกุ้งสร้างรายได้ให้แก่ประเทศมีมูลค่ารวมมากกว่า 2,000,000 ล้านบาท โดยมีมูลค่าการส่งออกสินค้ากุ้งและผลิตภัณฑ์อยู่ที่ 75,000 – 100,000 ล้านบาทต่อปี ซึ่งตั้งแต่ปี พ.ศ. 2534 จนถึงปัจจุบันสามารถกล่าวโดยรวมได้ว่าประเทศไทยยังคงส่งออกเป็นอันดับหนึ่งของโลกเช่นเดียวกับภาคการผลิตของไทยที่ผลิตกุ้งได้เป็นลำดับที่ 1 คิดเป็นร้อยละ 22-26 ของผลผลิตกุ้งทั้งหมดของโลก ซึ่งประเทศไทยผลิตกุ้งในอยู่ที่ประมาณ 640,000 ตัน เพิ่มขึ้นจากปี พ.ศ. 2552 ร้อยละ 14 โดยมีสัดส่วนเป็นกุ้งขาวแวนนาไม 635,000 ตัน กุ้งกุลาดำ 5000 ตัน (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2553; วิสุทธิ์, 2554; สมศักดิ์, 2554) โดยส่วนใหญ่แล้วภาคการผลิตกุ้งขาวของไทยจะมาจากการเพาะเลี้ยงแบบพัฒนาที่เกษตรกรจะปล่อยลูกกุ้งลงเลี้ยงในอัตราความหนาแน่นสูงมีการให้อาหารสำเร็จรูปที่มีโปรตีนสูง จึงมักประสบปัญหาของสภาพบ่อที่ไม่เหมาะสมในการเลี้ยงกุ้ง เช่น มีของเสียสะสมในบ่อเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตามระยะเวลาการเลี้ยง ส่งผลทำให้คุณภาพน้ำแย่ลง กุ้งบางส่วนจะอ่อนแอและติดเชื้อในเวลาต่อมารวมทั้งมีกุ้งป่วยและตายทำให้ผลผลิตต่ำกว่าเป้าหมาย ซึ่งโรคที่มีสาเหตุมาจากสภาพแวดล้อมในบ่อไม่เหมาะสมส่วนใหญ่เกิดจากโรคติดเชื้อแบคทีเรียโดยเฉพาะกลุ่มแบคทีเรียวิบริโอ (*Vibrio* spp.) (Nash *et al*.,1992; Lightner, 1996) เมื่อกุ้งป่วยจะขึ้นมาอยู่ตามขอบบ่อหรือลอยตามผิวน้ำ กุ้งจะมีลักษณะตัวหลวม บางตัวบริเวณแผ่นปิดเหงือกจะบวม ตับและตับอ่อน (hepatopancreas) มักจะมีขนาดเล็กกว่าปกติ (ชลอ, 2543) เมื่อกุ้งที่มีการติดเชื้อแบคทีเรียในลักษณะดังกล่าวนี้ ไม่สามารถจะทำการรักษาได้ด้วยการใช้ยาปฏิชีวนะเนื่องจากกุ้งที่มีอาการป่วย เรื้อรังมานานจนถึงระยะที่กุ้งไม่กินอาหาร การรักษาจึงไม่ได้ผล อีกทั้งการใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาเมื่อเกิดโรคระบาดที่มีการใช้ยาเป็นเวลานานโดยไม่มีการควบคุมปริมาณและชนิดของยาอย่างถูกต้องในระดับเหมาะสมกับการรักษาโรค ส่งผลให้จุลินทรีย์ก่อโรคเกิดการดื้อยา นอกจากนี้การ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ให้สารปฏิชีวนะเป็นเวลานานโดยไม่มีระยะงดให้เป็นเวลานานเพียงพอ อาจก่อให้เกิดสารตกค้างในเนื้อกุ้งขาวได้ ผู้ที่บริโภคกุ้งเหล่านี้เข้าไปจะมีการสะสมสารปฏิชีวนะในร่างกายผู้บริโภค ซึ่งสารบางชนิดเมื่อเข้าไปสู่ร่างกายแล้วอาจถูกเปลี่ยนไปเป็นสารที่มีความเป็นพิษสูงกว่าสารตั้งต้น หรืออาจเป็นสารก่อมะเร็ง (วลัยพร, 2544) นอกจากนี้ยังทำให้ผลผลิตกุ้งที่มีสารตกค้างไม่เป็นที่ต้องการของผู้ซื้อ หรือทำให้ประเทศผู้ซื้อนำมาเป็นเงื่อนไขในการกีดกันทางการค้าได้

จากสาเหตุดังกล่าวข้างต้นจึงมีความพยายามลดการใช้สารปฏิชีวนะและสารเคมีในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม ปัจจุบันมีการเลี้ยงหลายวิธีที่หลีกเลี่ยงการใช้สารปฏิชีวนะและสารเคมี เช่น การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน กรดอินทรีย์ และยังมีการนำเอาจุลินทรีย์มาใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้งเพื่อควบคุมคุณภาพสิ่งแวดล้อมในบ่อกุ้ง หรือใช้จุลินทรีย์เป็นโพรไบโอติก (probiotic) (มณจันทร์, 2540) โดยจุลินทรีย์ที่เลือกมานั้นไม่ควรเป็นจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคในกุ้ง (non pathogenic) หรือมีโอกาสก่อให้เกิดโรค ไม่ควรเป็นจุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมแล้วได้สารพิษ เจริญได้ดีในสภาวะต่าง ๆ ในบ่อกุ้ง ทั้งที่มีค่าความเป็นกรดเป็นด่างสูง หรือต่ำ หรือที่มีค่าความเค็มที่เปลี่ยนแปลงไป ควรมีความสามารถยับยั้งการเจริญของสิ่งมีชีวิตที่ก่อให้เกิดโรคได้ อาจทำโดยการแย่งอาหารและที่อยู่ หรือยับยั้งโดยการหลั่งสารประเภทเอนไซม์ออกมาข้างนอกเซลล์ และควรที่จะมีความสามารถในการเปลี่ยนสารพิษให้เป็นสารที่มีพิษน้อยลงหรือไม่มีพิษ (วลัยพร, 2544) การนำแบคทีเรียในกลุ่มที่สร้างสปอร์มาใช้เป็นโพรไบโอติกนั้นมีข้อได้เปรียบกว่าการใช้จุลินทรีย์กลุ่มอื่นเนื่องจากสามารถเก็บรักษาได้นานขึ้นและสะดวกในการใช้งาน การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกให้ได้ผลสูงสุดเมื่อจุลินทรีย์ผ่านจากการกินเข้าสู่ภายในระบบทางเดินอาหารของร่างกายจะต้องรอดชีวิตและสามารถยึดเกาะกับเยื่อบุผิวภายในอวัยวะต่าง ๆ ตามบริเวณหรือจุดที่จำเพาะเจาะจงที่ได้คัดเลือกสายพันธุ์ พร้อม ๆ กับมีการแข่งขันการเจริญเติบโตกับพวกจุลินทรีย์ประจำถิ่น มีการเพิ่มปริมาณ และผลิตสารเคมีที่เป็นประโยชน์ได้ จากการศึกษาผลการใช้โพรไบโอติกผสมในอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำพบว่ามีการเจริญเติบโต และอัตราการรอดตายดีกว่าบ่อที่ไม่ใช้โพรไบโอติก และสามารถลดเชื้อ *Vibrio* spp. ได้ (วรรณพร, 2550)

สำหรับการศึกษาครั้งนี้เพื่อต้องการทราบคุณสมบัติของแบคทีเรียในกล่มที่สร้างสปอร์และสกุล *Bacillus* สายพันธุ์ต่างๆ ต่อการยับยั้งแบคทีเรีย *V. harveyi* และเปรียบเทียบอัตราการรอดตาย การเจริญเติบโต ทั้งในห้องปฏิบัติการและบ่อเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม ระหว่างบ่อที่กุ้งได้รับแบคทีเรียกล่มสร้างสปอร์และ *Bacillus* spp. และบ่อควบคุม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาผลของแบคทีเรียกลุ่มสร้างสปอร์และ *Bacillus* spp. ต่อการยั้บยังเชื้อ *Vibrio harveyi* และผลต่ออัตรารอด การเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไมในการเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

2. ศึกษาผลของแบคทีเรียกลุ่มสร้างสปอร์และ *Bacillus* spp. ต่อการลดปริมาณเชื้อ *Vibrio* spp. ในเลือดกุ้งขาวแวนนาไมและผลต่ออัตรารอด การเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไมในบ่อเลี้ยง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจเอกสาร

1. กุ้งขาวแวนนาไม

กุ้งขาวแปซิฟิก หรือกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) มีแหล่งกำเนิดมาจากฝั่งตะวันออกของมหาสมุทรแปซิฟิก (Holthuis, 1980) ในปี พ.ศ. 2539 มีเกษตรกรบางส่วนได้มีการลักลอบนำกุ้งชนิดนี้จากประเทศไต้หวันเข้ามาทดลองที่ประเทศไทยเลี้ยงในปี พ.ศ. 2540 ซึ่งการทดลองเลี้ยงในครั้งนั้นไม่ประสบความสำเร็จมาก จนกระทั่งในปี พ.ศ. 2545 กรมประมงได้อนุญาตให้นำเข้าพ่อแม่พันธุ์กุ้งขาวแวนนาไมที่ปลอดเชื้อ (Specific Pathogen Free, SPF) ตามระเบียบของกรมประมงเข้ามาทดลองเลี้ยงในประเทศไทย (มาลินี และสมยศ, 2548) เนื่องจากในขณะนั้นการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ประสบปัญหากุ้งโตช้าทำให้เกษตรกรจำนวนมากขาดทุน (ชลอ และ พรเลิศ, 2547) หลังจากนั้นในเวลาต่อมาเกษตรกรที่เลี้ยงกุ้งกุลาดำจึงเปลี่ยนมาเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมกันมากขึ้นจนถึงปัจจุบันนี้

2. การเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมแบบพัฒนา

เนื่องจากกุ้งขาวแวนนาไมเป็นกุ้งทะเลที่ผ่านการปรับปรุงพัฒนาสายพันธุ์มาแล้วจากประเทศสหรัฐอเมริกา ทำให้มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วและสามารถเลี้ยงได้ในอัตราความหนาแน่นสูง คาดคะเนผลผลิตและระยะเวลาในการเลี้ยงได้แน่นอนกว่ากุ้งกุลาดำรูปแบบของการเลี้ยงจะแตกต่างกันไปตามวัตถุประสงค์หรือเป้าหมายของการผลิตและความพร้อมของฟาร์ม สามารถแบ่งได้เป็น

1. ระบบพัฒนาหรือความหนาแน่นสูง (intensive system) ฟาร์มส่วนส่วนใหญ่ที่ใช้ระบบนี้จะมีพื้นที่บ่อประมาณ 3-6 ไร่ การเตรียมบ่อและการจัดการมีความละเอียดมากขึ้นมักจะมีบ่อพักน้ำคิดเป็นประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ของบ่อเลี้ยง มีอัตราการปล่อยลูกกุ้งอย่างหนาแน่นระหว่าง 60-90 ตัวต่อตารางเมตร มีการให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปและมีการให้อากาศอย่างเพียงพอที่สามารถรวบรวมตะกอนของเสียไว้กลางบ่อ ลักษณะการเลี้ยงแบบนี้จะให้ผลผลิตสูง (ชลอ และ พรเลิศ, 2547)

2. ระบบพัฒนาหรือความหนาแน่นสูงมาก (superintensive system) ระบบนี้เป็นการเลี้ยงในโรงเรือน (greenhouse) มีผลผลิตต่อปีสูงถึง 3.2-16 ตันต่อไร่หรืออาจสูงกว่านี้ แต่มีฟาร์มจำนวนน้อยในประเทศไทย ประเทศสหรัฐอเมริกา และในบางประเทศที่ทำได้ (Rosenberry, 2001) ตัวอย่างของ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ฟาร์มที่มีการพัฒนาและใช้เทคโนโลยีในการจัดการฟาร์ม คือ บริษัท Belize Aquaculture Ltd. (BAL) ในประเทศเบลิส และฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม OceanBoy Farms ที่มลรัฐฟลอริดา ประเทศสหรัฐอเมริกา ระบบนี้จะไม่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำแต่มีปริมาณเครื่องให้อากาศมาก การจัดการระบบน้ำหมุนเวียนป้องกันน้ำเสียโดยใช้ผลผลิตจากธรรมชาติ (McIntosh, 2000)

นอกจากนี้มีการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในบ่อที่ปูด้วยโพลีเอททิลีน (พีอี) (ชลอ และพรเลิศ, 2547) มีการศึกษาเปรียบเทียบการเลี้ยงกุ้งขาวในบ่อปูด้วยพีอีทั้งบ่อและบ่อดินภายในฟาร์มเดียวกัน และรวบรวมข้อแตกต่างที่เกิดขึ้น ดังนี้

1. บ่อที่ปูด้วยพีอีอุณหภูมิบริเวณผิวน้ำและบริเวณพื้นบ่อจะสูงกว่าบ่อดินประมาณ 0.5-1 องศาเซลเซียส ทุกวันจากการวัดอุณหภูมิตลอดทั้งปี

2. สีน้ำในบ่อพีอีหรือปริมาณแพลงก์ตอนจะมีมากกว่าบ่อดิน เนื่องจากบ่อพีอีจะไม่มีตะกอนดินจากพื้นบ่อมาก ดังนั้นเมื่อไม่มีตะกอนแขวนลอยมาบังแสง ทำให้แพลงก์ตอนเพิ่มจำนวนได้รวดเร็ว ในขณะที่บ่อดินจะมีตะกอนมากขึ้นตามระยะเวลาการเลี้ยงกุ้ง ทำให้โอกาสที่แพลงก์ตอนจะเพิ่มปริมาณเกิดช้ากว่าบ่อที่ปูพื้นบ่อด้วยพีอีโดยเฉพาะในช่วงตั้งแต่ 50 เป็นต้นไป พบว่าในบางพื้นที่บ่อดินจะมีตะกอนค่อนข้างมาก น้ำจะขุ่นเหมือนน้ำโคลนมีผลทำให้กุ้งเครียด ในขณะที่บ่อพีอีไม่พบปัญหาเหล่านี้

3. กุ้งขาวที่เลี้ยงในบ่อดินซึ่งมีตะกอนมาก สีน้ำขุ่น กุ้งจะมีสีซีดขาวขุ่น และถ้ามีตะกอนมากอย่างต่อเนื่องเป็นเวลานาน กุ้งจะเครียด ตอนกลางคืนอาจจะสังเกตเห็นว่ากุ้งบางตัวมีสีส้มอมแดงกุ้งที่มีลักษณะดังกล่าวจะมีการเจริญเติบโตช้าลง แต่ในบ่อที่ปูด้วยพีอีกุ้งมีสีเข้มกว่าเนื่องจากได้รับอาหารธรรมชาติ ได้แก่ พวกแพลงก์ตอน เมื่อนำไปต้มสุก สีของกุ้งจากบ่อพีอีจะแดงเข้มกว่ากุ้งจากบ่อดิน มีการรายงานถึงความแตกต่างของสีเปลือกกุ้งน่าจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณแพลงก์ตอนในบ่อ (อรอนงค์, 2547) ถ้าปริมาณแพลงก์ตอนเหมาะสม คือ มีสีเขียวอมน้ำตาล สีกุ้งจะเข้มกว่าบ่อที่น้ำขุ่นมีตะกอนมากและมีแพลงก์ตอนน้อย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. ปัญหาที่เกิดขึ้นในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมแบบพัฒนา

หลังจากกรมประมงอนุญาตให้มีการนำเข้ากุ้งขาวแวนนาไมปลอดเชื้อในระหว่างเดือนมีนาคม พ.ศ. 2545 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2546 ซึ่งเป็นช่วงที่กุ้งกุลาดำมีปัญหาเรื่องโตช้า ทำให้เกษตรการบางส่วนหันมาเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมที่ให้ผลผลิตดีกว่าการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ จำนวนเกษตรกรที่เลี้ยงกุ้งขาวจึงเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเนื่องจากสายพันธุ์ของกุ้งขาวแวนนาไมมีการปรับปรุงมาเป็นเวลานานและสามารถเลี้ยงได้ในอัตราความหนาแน่นที่สูงมากประมาณ 100,000 – 250,000 ตัวต่อไร่ และเนื่องจากการเลี้ยงในอัตราความหนาแน่นที่สูงมากในบางฟาร์ม การให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปที่องค์ประกอบของโปรตีนสูงทำให้เกิดการสะสมของของเสียบริเวณพื้นบ่อมากขึ้น คุณภาพน้ำแย่ลงตามระยะเวลาการเลี้ยง ส่งผลให้กุ้งสุขภาพอ่อนแอง่ายต่อการเป็นโรค ซึ่งปัญหาเรื่องโรคสามารถเกิดขึ้นในทุกพื้นที่และมีแนวโน้มที่จะเกิดมากขึ้น และเนื่องจากปัจจุบันมีการใช้พ่อแม่พันธุ์ที่ผลิตขึ้นเองภายในประเทศมากขึ้น จึงทำให้บางรอบการเลี้ยงการเจริญเติบโตลดลงเมื่อเทียบกับระยะแรกที่มีการนำพ่อแม่พันธุ์ปลอดเชื้อเข้ามา การปล่อยลูกกุ้งที่หนาแน่นและการเจริญเติบโตที่เริ่มลดลง ใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงนานขึ้นประกอบกับความแปรปรวนของสภาพดินฟ้าอากาศที่มากขึ้นทุกปี ทำให้การเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมยากขึ้น และปัจจุบันมีโรคใหม่ๆเกิดเพิ่มขึ้นในเกือบทุกพื้นที่ที่มีการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (ชลอ, 2549)

ปัญหาและการแพร่กระจายของจุลินทรีย์ก่อโรคต่อการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมแบบพัฒนา

แบคทีเรียกลุ่มวิบริโอ

แบคทีเรียกลุ่มนี้มีความสำคัญในการก่อโรคสัตว์น้ำเป็นอันดับหนึ่ง แบคทีเรียกลุ่มวิบริโอมักพบปนเปื้อนอยู่ในสัตว์ทะเล เช่น กุ้ง หอย ปูและปลา เป็นต้น นอกจากนั้นยังเป็นสาเหตุในการก่อโรควิบริโอซิส (vibriosis) ในกุ้ง ปลา หอย และปูที่เพาะเลี้ยงในฟาร์ม (Rheinheimer, 1992; Meunpol *et al.*, 2003) ประเทศฟิลิปปินส์มีการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำอย่างแพร่หลายตั้งแต่ปี ค.ศ. 1980 และมีผลผลิตลดลงในช่วงกลางปี ค.ศ. 1990 เพราะมีการระบาดของแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอ (Tendencia and de la Peña, 2001) และยังก่อให้เกิดโรคในคนและสัตว์อีกหลายโรคดังแสดงในตารางที่ 1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 1 แบคทีเรียกลุ่มวิบริโอที่ก่อโรคในคนและสัตว์

แบคทีเรีย	โรคในคน	โรคในสัตว์
V. cholera	โรคอุจจาระร่วงอย่างรุนแรง (Wittman and Flick, 1995)	ก่อโรคในกุ้ง (Gopal *et al*., 2005)
V. parahaemolyticus	โรคอาหารเป็นพิษ (Wittman and Flick, 1995)	-
V. vulnificus	ติดเชื้อที่กระแสเลือด	โรคเสี้ยนดำและโรคจุดดำในกุ้งกุลาดำ (ชลอ, 2535)
V. alginolyticus	โรคติดเชื้อบาดแผล หูและตาในผู้ที่มีประวัติสัมผัสน้ำทะเล (Braude *et al*., 1986)	ก่อโรคในกุ้ง (Costa *et al*., 1998)
V. flunivialis	โรคกระเพาะและลำไส้อักเสบในคน (Braude *et al*., 1986)	-
V. mimicus	ก่อโรคในคน (Braude *et al*., 1986)	
V. anguillarum	-	ก่อโรคในปลา และหอยเป๋าฮื้อ (Coyne and Harding, 2007)
V. harveyi	-	โรคกุ้งเรืองแสง (ชลอ, 2543)

ที่มา: ดัดแปลงจาก สุบัณฑิตและคณะ (2548); สุบัณฑิตและวีรพงศ์ (2552)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมเป็นอาชีพหลักที่สร้างรายได้ให้กับเกษตรกรและการส่งออกอาหารเป็นอย่างมาก แม้ว่าปริมาณการส่งออกกุ้งจะเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องแต่ยังมีปัญหาการแพร่กระจายของโรคสัตว์น้ำที่มีสาเหตุมาจาก แบคทีเรียและไวรัส ตลอดเวลา และโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียที่มักสร้างปัญหาและพบได้บ่อย เช่น โรควิบริโอซิสที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มนี้โดยส่วนใหญ่พบในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำด้วยน้ำกร่อยหรือน้ำเค็ม

โรคติดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* (Vibriosis) ในบ่อดิน

ปัญหาของการเกิดโรคจากแบคทีเรียส่วนใหญ่มาจากการจัดการระหว่างการเลี้ยง สามารถแก้ไขได้โดยการปรับปรุงสิ่งแวดล้อมทั้งภายในและนอกบ่อ ส่วนใหญ่แล้วเกิดจากการเลือกพื้นที่ไม่เหมาะสม ปล่อยกุ้งหนาแน่น ให้อาหารมากเกินไป ขาดการดูแลคุณสมบัติน้ำและสุขภาพกุ้ง โรคแบคทีเรียที่พบในกุ้งมักจะมีสาเหตุมาจากเชื้อ *Vibrio* ได้แก่ *V. harveyi, V. penaecida, V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* (Nash *et al.*, 1992; Ishimaru *et al.*, 1995; Lightner, 1996) โดยความรุนแรงของเชื้อแบคทีเรียจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และลักษณะของเชื้อนั้นๆ รวมถึงความทนต่อความเค็ม (Vattanaviboon and Mongkolsuk, 2001) เชื้อ *Vibrio* สามารถพบได้ทั่วไปในแหล่งน้ำเค็มและน้ำกร่อย เป็นสาเหตุของโรคกุ้งเกือบทุกชนิดที่พบในประเทศไทย *Vibrio* เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม microflora พบได้ทั่วไปในธรรมชาติและบ่อเลี้ยงกุ้ง เป็นแบคทีเรียพวกฉวยโอกาส (opportunistic microorganism) (Sindermann, 1990) จะฉวยโอกาสทันทีเมื่อกุ้งอ่อนแอทำให้กุ้งเป็นโรค (Flegel *et al*., 1992) และอาจพบร่วมกับเชื้อโรคชนิดอื่นๆ แต่บางครั้งก็เป็นสาเหตุของโรคเอง (Costa *et al.*, 1998; Goarant *et al.*, 2000; Harris and Owens, 1999)

ในห้องปฏิบัติการสามารถทำให้กุ้งป่วยเป็นโรควิบริโอซิสได้ โดยการฉีด แช่ หรือกินอาหารที่ปนเปื้อนเชื้อ (Gomez-Gil *et al.* , 1998; Saulnier *et al.* , 2000; Alday-Sanz *et al.*, 2002) ส่วนกุ้งในธรรมชาติและที่เลี้ยงในบ่อจะได้รับเชื้อแบคทีเรียโดยผ่านทางน้ำ บาดแผล หรือกินอาหารที่มีเชื้ออยู่ การเกิดโรควิบริโอซิสในกุ้งกุลาดำจะใกล้เคียงกับกุ้งขาว แต่อัตราการตายในโรงเพาะฟักประมาณ 60-75 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ในบ่อดินประมาณ 20-50 เปอร์เซ็นต์ สาเหตุการตายที่สูงนี้ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่อาจเกิดจากการจัดการที่ไม่เหมาะสม (หน่วยวิจัยเพื่อความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพกุ้ง, 2546) สำหรับกุ้งขาวแวนนาไมโรคที่เกิดจากเชื้อ *Vibrio* สามารถเรียกได้อีกชื่อคือ “Sindroma gaviota” ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายกับการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวในประเทศเอกวาดอร์ในช่วงปี ค.ศ. 1989 และ 1990

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

(Mohney *et al.,* 1991) โดยทั่วไปแล้วแบคทีเรียในกลุ่มนี้สามารถพบได้ในทางเดินอาหาร (Moss *et al.,* 2000) ตับ และตับอ่อนและน้ำเลือดของกุ้งที่เป็นปกติ (Gomez-Gil *et al.,* 1998) เมื่อกุ้งอยู่ในสภาวะที่เครียด เช่น เกิดการติดเชื้อจากจุลชีพต่างๆ ปริมาณของแอมโมเนียในน้ำเพิ่มขึ้น อุณหภูมิที่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วและความเค็มที่สูงเกินไป เป็นต้น ก็สามารถก่อให้เกิดโรคได้เช่นกัน (Mohney *et al.,* 1994) โดยแบคทีเรียจะไปทำลายเนื้อเยื่อหรือเชื้อแพร่กระจายไปในระบบต่าง ๆ ทั่วร่างกาย เมื่อมีการติดเชื้อบริเวณเปลือก ทำให้ปรากฏเป็นแผลสีดำหรือน้ำตาลที่บริเวณนั้น เรียกว่าโรคจุดดำหรือน้ำตาล (black or brown spot disease) นอกจากนี้พบว่าถ้ามีการติดเชื้ออย่างรุนแรงอาจทำให้เกิดการตายถึง 70 เปอร์เซ็นต์และกุ้งที่ป่วยจะถูกกุ้งที่แข็งแรงกว่ากิน สำหรับอาการอื่นๆ ที่สามารถพบได้คือ กุ้งที่เป็นโรคติดเชื้อแบคทีเรียจะมีการว่ายน้ำผิดปกติบางส่วนพบที่พื้นก้นบ่อ สีตัวเข้มขึ้น อาจพบอาการของโรคที่ทำให้กล้ามเนื้อตาย (muscle necrosis) และอาการกล้ามเนื้อเกร็งเป็นตะคริว (cramped muscle syndrome) ร่วมด้วย (Brock and Main, 1994)

ลักษณะอาการทั่วไปของโรคนั้นพบว่ากุ้งป่วยที่มีการติดเชื้อแบคทีเรียมักจะพบตลอดระยะเวลาของการเลี้ยง ซึ่งอาจจะไม่มีอาการผิดปกติภายนอกเด่นชัด จนถึงกุ้งตัวสีแดงหรือกุ้งป่วยมีสีเข้มกว่าปกติ นอกจากนั้นการติดเชื้อแบคทีเรียที่พบบ่อยๆ ในช่วงของการเลี้ยงเดือนท้ายๆ กุ้งที่ป่วยด้วยการติดเชื้อแบคทีเรีย โดยเฉพาะในกลุ่มวิบริโอซึ่งมีด้วยกันหลายชนิด อาการของกุ้งที่ป่วยที่ขึ้นมาอยู่ตามขอบบ่อ หรือลอยตามผิวน้ำ มีตั้งแต่กุ้งตัวสกปรก มีตะกอนตามผิวตัว กุ้งตัวสีส้ม จับดูตัวหลวมตามลำตัวสกปรก หางมักจะกร่อน บางลักษณะจะพบว่าตามลำตัวจะมีจุดดำขนาดเล็กที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย บริเวณแผ่นปิดเหงือกจะบวม หรือตามเปลือกจะมีจุดขาวๆ ทั่วไป ลักษณะของกุ้งป่วยที่กล่าวไปแล้วนั้น เมื่อนำมาเพาะเชื้อจากตับและตับอ่อน หรือจากน้ำเลือด จะมีเชื้อแบคทีเรียเป็นจำนวนมาก ตับและตับอ่อนมักจะมีขนาดเล็กลงกว่าปกติ และในบ่อที่มีปริมาณแพลงก์ตอนหนาแน่นมากๆ แล้วมีการติดเชื้อ *Vibrio* spp. จะสังเกตอาการบ่งชี้ได้ยาก ทำให้เกษตรกรผู้เลี้ยงไม่ทราบจนกว่าจะจับกุ้ง เมื่อกุ้งที่มีการติดเชื้อแบคทีเรียในลักษณะที่กล่าวมาแล้วทั้งหมด ไม่สามารถที่จะทำการรักษาโดยใช้ยาปฏิชีวนะได้ เนื่องจากกุ้งในลักษณะอาการเหล่านี้มีการป่วยมาเป็นเวลานาน จนถึงระยะที่กุ้งไม่กินอาหารดังนั้นการรักษาจึงไม่ได้ผล (ชลอ, 2543) ถ้าเป็นกุ้งที่ยังมีขนาดเล็กอายุ 30-60 วัน อาจรักษาได้แต่ต้องเป็นยาที่กรมประมงและคณะกรรมการอาหารและยาอนุญาตให้ใช้ได้กับสัตว์น้ำที่นำมาบริโภค และจะต้องไม่มียาตกค้าง ซึ่งการใช้ยาจะต้องทำควบคู่ไปกับการจัดการบ่อบ่อด้วยจึงจะได้ผล

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โรควิบริโอซิสสามารถพบได้ทุกช่วงเวลาของการเลี้ยง (Pitogo *et al*., 1990; Lightner, 1988, 1996) ในระยะแรกพบการติดเชื้อ *Vibrio* ในโรงเพาะฟัก แต่หลังจากการเลี้ยงอย่างหนาแน่นในบ่อดิน จะพบกุ้งป่วยเป็นโรคได้ทุกช่วงอายุ สำหรับความเสี่ยงของการเกิดโรคขึ้นอยู่กับความเครียดที่กุ้งได้รับ แต่ในกรณีที่เชื้อแบคทีเรียมีความรุนแรงสูง สามารถทำให้เกิดโรคได้ (Pitogo and Pena, 1998)

โรคแบคทีเรียเรืองแสง (Luminescent disease)

โรคแบคทีเรียเรืองแสงเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างเป็นแท่ง ขนาดยาว 1.2-4 ไมโครเมตร กว้าง 0.3-1.0 ไมโครเมตร เคลื่อนที่โดยอาศัย lateral flagella เป็นพวก halophile เป็นทั้ง aerobic และ anaerobic bacteria ให้ผลการทดสอบทางชีวเคมีของ oxidase test catalase test และ nitrate reductase เป็น positive เจริญบน TCBS (Thiosulphate Citrate Bile Salt Sucrose) ได้โคโลนีสีเขียว เจริญได้ในอาหารที่มีเกลือ 1-6 เปอร์เซ็นต์ เป็นแบคทีเรียเรืองแสง (luminous bacteria) การเรืองแสงเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ luciferase (Prosser *et al*., 1996) ที่กระตุ้นปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของ aldehyde และ flavin mononucleotide ($FMNH_2$) ในรูป reduced ให้ได้น้ำ กรดอินทรีย์ และ flavin mononucleotide และปลดปล่อยพลังงานออกมาในรูปพลังงานเรืองแสง ซึ่งมีความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร มีสีเขียวแกมเหลืองออกมา (Ziegler and Baldwin, 1981) ดังสมการ

$$RCHO + O_2 + FMNH_2 \xrightarrow{\text{Luciferase}} RCOOH + FMN + H_2O + light$$

(ความยาวคลื่น 490 nm) (Schmetterer *et al*., 1986)

หมายเหตุ: RCHO คือ อัลดีไฮด์คาร์บอนอะตอมต่อกันเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 7-9 คาร์บอนอะตอม (straight-aliphatic moiety)

เชื้อนี้เจริญได้ดีที่ความเค็มระหว่าง 10-40 ส่วนในพันส่วน (ppt) คุณสมบัติพิเศษของเชื้อ คือ สามารถเจริญเติบโตได้ดีในช่วงพีเอช (pH) กว้าง คือ 6-9 และอุณหภูมิ 20-50 องศาเซลเซียส มีความสามารถปรับตัวค่อนข้างดีได้ทุกสภาพการเลี้ยง ในน้ำที่มีปริมาณสารอินทรีย์มาก *V. harveyi* จะเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว (ชลอ และพรเลิศ, 2547) และทำให้เกิดปัญหาทั้งในบ่อเลี้ยงและโรงเพาะฟัก ลูกกุ้งที่ทำให้เกิดการตายของลูกกุ้งอย่างรุนแรง (สุบงกช, 2540; Abrahama and Palaniappan, 2003) โรคเรืองแสงในบ่อดินจะพบได้ตั้งแต่ปล่อยลูกกุ้ง 2 สัปดาห์ จนถึงกุ้งใหญ่ แต่ที่พบมากเมื่อกุ้งอายุ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประมาณ 30 – 60 วันลักษณะทั่วไปของโรคจะพบกุ้งป่วยขึ้นมาอยู่ที่บริเวณขอบบ่อ หรือว่ายอยู่ที่ผิวน้ำ ซึ่งทำให้มองการเรืองแสงที่ส่วนหัวได้อย่างชัดเจนในเวลากลางคืน เมื่อนำกุ้งป่วยมาตรวจสอบโดยนำส่วนของตับและตับอ่อน หรือนำเลือดกุ้งมาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์จะพบแบคทีเรียท่อนสั้นเคลื่อนที่ได้จำนวนมาก และเมื่อทำการเพาะเชื้อในอาหาร TCBS จะได้โคโลนีของเชื้อแบคทีเรียเป็นสีเขียว กุ้งเริ่มอ่อนแอและตายในที่สุด (กุลวรา, 2534; ชลอ, 2543)

โรคนี้จะพบมากในช่วงที่มีการปล่อยลูกกุ้งอย่างหนาแน่นประมาณเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนมีนาคมในช่วงที่อากาศร้อนและบริเวณที่น้ำมีความเค็มสูงบ่อที่มีการให้อาหารมากในช่วงเดือนแรกทำให้มีการสะสมของสารอินทรีย์ในบริเวณพื้นบ่อมาก ทำให้มีขี้แดดเคลือบตามแนวหว่านอาหารส่งผลให้ปริมาณแบคทีเรียเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว จะสังเกตได้ว่าเมื่อพื้นบ่อมีปริมาณสารอินทรีย์ที่สะสมมาจากการเลี้ยงในรอบที่ผ่านมามากในระยะช่วงแรกของการเลี้ยงจะเกิดขี้แดด สีน้ำล้มบ่อยหรือแม้แต่การให้อาหารมากเกินไป ทำให้น้ำมีปริมาณแพลงก์ตอนเพิ่มมากขึ้น สีน้ำเข้มจัดและพีเอชสูงในตอนบ่าย การเปลี่ยนแปลงของคุณสมบัติของน้ำมีผลทำให้กุ้งอ่อนแอต่อเชื้อแบคทีเรียได้ง่ายและตายในที่สุด

การควบคุมโรควิบริโอซิส (Vibriosis)

การควบคุมโรควิบริโอซิสทำได้โดยการเตรียมบ่อที่ดีก่อนการเลี้ยงกุ้งในแต่ละรอบและการจัดการในระหว่างการเลี้ยงที่ดีเพื่อลดความเครียดที่จะเกิดแก่กุ้งภายในบ่อเลี้ยง (Lightner, 1996) การควบคุมปริมาณแพลงก์ตอนให้อยู่ในระดับที่เหมาะสมเพื่อการป้องกันการเกิดสาหร่ายหรือขี้แดดที่พื้นบ่อในระหว่างการเลี้ยงในช่วงแรกและต้องควบคุมการให้อาหารอย่าให้มีเหลือตกค้างเพราะจะเป็นการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียได้ง่าย การเปลี่ยนถ่ายน้ำจะลดจำนวนของเสียภายในบ่อได้ การป้องกันที่ดีโดยการปล่อยลูกกุ้งในปริมาณที่เหมาะสมและมีการเตรียมบ่อที่ดีควรมีการตากบ่อหลังการเลี้ยงในแต่ละรุ่นและปรับสภาพดินในบ่อด้วยการใส่วัสดุปูนอย่างเหมาะสมจะช่วยลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียได้ (Anderson *et al.,* 1988)

การใช้ยาในการป้องกันและรักษาโรคในระยะที่กุ้งเริ่มแสดงอาการผิดปกติแต่ยังไม่ป่วยมากจำเป็นจะต้องทำควบคู่กับการปรับปรุงคุณภาพน้ำและพื้นบ่อด้วยจึงจะได้ผล การใช้ยาในการป้องกันและรักษาจะได้ผลน้อยมาก ถ้าไม่สามารถควบคุมคุณภาพน้ำและพื้นบ่อให้สะอาดได้ ยาต้านจุลชีพที่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ใช้จะต้องเป็นยาที่สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาอนุญาตให้ใช้เท่านั้น และต้องปฏิบัติตามคำแนะนำของกรมประมงโดยเคร่งครัดเพื่อป้องกันปัญหายาตกค้าง (ชลอ และ พรเลิศ, 2547)

4. บทบาทของจุลินทรีย์ในบ่อเลี้ยงกุ้ง

จุลินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีบทบาทสำคัญต่อระบบนิเวศภายในบ่อเลี้ยง โดยเฉพาะแบคทีเรียที่มีหน้าที่ในการหมุนเวียนสารอินทรีย์ในวัฏจักรต่างๆ เช่น วัฏจักรไนโตรเจน เพื่อให้เกิดความสมดุลในระบบการเลี้ยงกุ้ง ซึ่งการเลี้ยงกุ้งขาวนั้นจะใช้อาหารเม็ดสำเร็จรูปที่มีส่วนประกอบของโปรตีนสูงและกุ้งสามารถนำสารอาหารเหล่านี้มาใช้เพื่อการเจริญเติบโตและกระบวนการเมแทบอลิซึมเพียงบางส่วนเท่านั้น จึงยังเหลือสารอาหารตกค้างอยู่ในบ่อเลี้ยงทำให้เกิดการสะสมของสารอินทรีย์ในน้ำและดินตะกอนพื้นบ่อ โดยอาหารกุ้งจะประกอบด้วยโปรตีนมากที่สุด คือ 35-45 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ คาร์โบไฮเดรตประมาณ 30-40 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 6-9 เปอร์เซ็นต์ และเส้นใยอาหาร 3.5 เปอร์เซ็นต์ (มะลิ, 2531) ซึ่งสารอาหารที่เหลือตกค้างจะถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ให้มีปริมาณที่ลดลงและไม่เกิดการสะสมในบ่อเลี้ยงกุ้งมากเกิน (โดยประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ของสารจะถูกย่อยสลาย และอีก 40 เปอร์เซ็นต์ ถูกเปลี่ยนเป็นองค์ประกอบของเซลล์แบคทีเรีย) ไปจนส่งผลกระทบต่อคุณภาพน้ำและการเจริญเติบโตของกุ้งในบ่อเลี้ยงได้ โดยกระบวนการย่อยสลายสารต่างๆ ของแบคทีเรีย เช่น การย่อยสลายโปรตีนของแบคทีเรียต้องอาศัยการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส โดยกระบวนการย่อยสลายนี้สามารถเกิดขึ้นได้ทั้งในสภาพที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ซึ่งพบว่าแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนในสภาพที่มีออกซิเจน ได้แก่ *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. และ *Proteus* sp. เป็นต้น และแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายโปรตีนได้ในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน ได้แก่ *Clostridium* sp. ซึ่งสารประกอบที่เกิดจากกระบวนการย่อยสลายจะมีกลิ่นเหม็นเน่า เช่น ไฮโดรเจนซัลไฟด์ เป็นต้น (บัญญัติ, 2534; ลักขณา, 2535; สุบัณฑิตและวีรพงษ์, 2552) และการย่อยคาร์โบไฮเดตรจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลสที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น เอนไซม์ชนิดนี้จะสลายพันธะα-(1,4) glycosidic ทำให้โมเลกุลแป้งสั้นลง การย่อยสลายแป้งอย่างสมบูรณ์ของจุลินทรีย์จะได้น้ำตาล D-glucose เพียงชนิดเดียว โดยแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์อะไมเลสส่วนใหญ่อยู่ในสกุล *Bacillus* เช่น *B. stearothermophilus, B. subtilis* และ *B. licheniformis* เป็นต้น (เรืองลักขณา, 2533; ขจีนาฏและคณะ, 2540) ส่วนการย่อยสลายไขมันแบคทีเรียต้องอาศัยการทำงานของเอนไซม์ไลเปส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สร้างออกมาภายนอกเซลล์ โดยเอนไซม์ไลเปสจะทำลายพันธะของกลีเซอรอลในโมเลกุลของไขมันทำให้ไขมันมีขนาดเล็ก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ลง จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายไขมันได้แก่ *Chromobacterium* spp. และ *Bacillus lichoformis* เป็นต้น (สุรีย์, 2533; เรืองลักขณา, 2533; ขจีนาฏและคณะ, 2540)

จุลินทรีย์ในบ่อเลี้ยงกุ้งมีทั้งกลุ่มที่เป็น autotrophs และ heterotrophs แต่ชนิดที่มีความสำคัญในการย่อยสลายสารอินทรีย์คือพวก heterotrophs เนื่องจากเป็นจุลินทรีย์ที่ต้องอาศัยสารอินทรีย์เป็นแหล่งพลังงานและคาร์บอน จึงทำให้จุลินทรีย์กลุ่มนี้มีความสำคัญที่ทำให้เกิดการย่อยสลายสารอินทรีย์ให้เป็นสารอนินทรีย์ จากการศึกษาของ Rico-Mora *et al.* (1998) ที่เลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่สามารถเจริญได้ดีในแหล่งที่มีสารอินทรีย์ในปริมาณต่ำ และนำแบคทีเรียนั้นลงไปในการเลี้ยงไดอะตอม (diatom) ผลที่เกิดขึ้นคือ แบคทีเรียที่แยกได้นั้นสามารถที่จะแข่งขันกับ *V. alginolyticus* ในการใช้ประโยชน์จากสิ่งขับถ่าย (exudates) ของไดอะตอมได้ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาถึงปริมาณจุลินทรีย์รวมทั้งหมดในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบพัฒนาพบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง $3.33x10^3$ - $3.19x10^6$ CFU/มิลลิลิตร และปริมาณเชื้อ *Vibrio* spp. มีการเปลี่ยนแปลงอยู่ระหว่าง $0.65x10^2$ - $1.22x10^4$ CFU/มิลลิลิตร (กุลวรา, 2534) ส่วน *Bacillus* sp. ที่พบมากที่สุดคือ *B. pumilus, B. subtilis, B. cereus* และ *B. licheniformis* (Ivanova *et al*., 1992) และพบว่าที่ความหนาแน่นของการเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่แตกต่างกัน คือ 100, 150 และ 200 ตัวต่อตารางเมตร จะมีปริมาณจุลินทรีย์อยู่ในน้ำที่แตกต่างกันตามอัตราความหนาแน่นของกุ้งเท่ากับ $8.3x10^3$ - $2.1x10^5$, $3.0x10^3$ - $3.5x10^5$ และ $9.0x10^3$ - $4.1x10^5$ CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนปริมาณ *Vibrio* spp. พบอยู่ในช่วง $4.0x10^2$ - $6.8x10^3$, $6.0x10^2$ - $5.3 x10^3$ และ $2.6x10^2$ - $5.4 x10^3$ CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ โดยช่วงเริ่มต้นของการเลี้ยงปริมาณจุลินทรีย์รวมและเชื้อ *Vibrio* spp. ในน้ำจะมีปริมาณน้อยกว่าในช่วงสุดท้ายของการเลี้ยง (สิทธิ และคณะ, 2532)

5. แบคทีเรียกลุ่มสร้างสปอร์

โดยส่วนใหญ่การจัดจำกลุ่มแบคทีเรียจะเป็นการจัดแบ่งตามหนังสือ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology ฉบับที่ 8 ของ Buddingh (1974) โดยจัดแบ่งแบคทีเรียออกเป็น 19 กลุ่ม แม้ปัจจุบันนี้จะมีการเปลี่ยนแปลงกลุ่มได้บ้างเพราะปัจจุบันมีการใช้เทคนิคทางด้านพันธุกรรมและเทคนิคในระดับชีวโมเลกุลเข้าใช้ในการจัดกลุ่มมากขึ้น ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มสร้างสปอร์ (endospore-forming rode and cocci) ที่จัดตามหนังสือ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology มี อยู่ 1 แฟมิลี คือ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Family Bacillaceae

รูปร่างเซลล์เป็นแท่ง สร้างเอนโดสปอร์ซึ่งต่างจาก vegetative cell โดยเอนโดสปอร์สะท้อนแสงมากกว่าและติดสีย้อมยากกว่า ทนความร้อนและสารเคมีอื่นๆ ได้ดีกว่า vegetative cell และในเอนโดสปอร์มีสาร dipicolinic acid อยู่ 5-10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง สปอร์อาจอยู่ที่ตรงกลางเซลล์ค่อนไปทางปลายหรือปลายเซลล์ก็ได้ ส่วนใหญ่ติดสีแกรมบวก มีทั้งพวก aerobe facultative หรือ anaerobe

แบคทีเรียสกุล *Bacillus* มีรูปร่างเป็นแท่งตรงหรือเกือบตรง ส่วนใหญ่เคลื่อนที่โดยใช้ lateral flagella สร้างเอนโดสปอร์ มี 1 อัน ต่อ 1 เซลล์ ติดสีแกรมบวก หรืออาจจะเป็นบวกเมื่ออายุยังน้อย ดำรงชีวิตแบบ chemoorganothrop metabolism สามารถเจริญได้ในสภาพแวดล้อมที่มีออกซิเจนต่ำและอยู่ได้ในช่วงพีเอชประมาณ 8-11 และสร้างเอกโซเอนไซม์ (exoenzyme) ในการย่อยสารอินทรีย์ได้หลายชนิด เช่น เอนไซม์โปรติเอส (protease) ย่อยสารจำพวกโปรตีน เอนไซม์อะไมเลส (amylase) ย่อยสารจำพวกเซลลูโลส และเอนไซม์ไซลาเนส (xylanase) ย่อยผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ (นงลักษณ์ และปรีชา, 2535) แต่การใช้แบคทีเรียเพื่อเป็นโพรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำและกุ้งขาวแวนนาไมในปัจจุบันนี้ มีรายงานเฉพาะแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* เท่านั้น

6. โพรไบโอติก (Probiotic)

คำว่าโพรไบโอติก (probiotic) มีนิยามมากมาย ซึ่ง Elie Metchnikoff เป็นคนแรกที่สนใจและศึกษาเกี่ยวกับโพรไบโอติกเพื่อเพิ่มแบคทีเรียแลคติกในลำไส้คนและยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค รวมทั้งให้คำจำกัดความของโพรไบโอติกว่า จุลินทรีย์ที่กินเข้าสู่ร่างกายเพื่อส่งเสริมสุขภาพ ต่อมา Parker (1974) ให้คำจำกัดความว่า สิ่งมีชีวิตและสารเคมีที่มีผลต่อการสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ และในประเทศไทยมีการเริ่มใช้โพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์ไม่เกิน 20 ปี ความหมายของโพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์จึงหมายถึง จุลินทรีย์ โดยเฉพาะแบคทีเรียหรือผลของแบคทีเรียที่เติมเข้าไปในระบบการเลี้ยงสัตว์แล้วมีผลช่วยให้สัตว์สุขภาพดีขึ้น (ภวัต, 2544; สุบัณฑิตและวีรพงศ์, 2552; Lilley and Stillwell, 1965; FAO/WHO, 2001; Balcazar *et al.*, 2006) โพรไบโอติกที่ดีนั้นจะต้องเป็นจุลินทรีย์ที่ก่อประโยชน์ สามารถเพิ่มการเจริญเติบโตต่อสัตว์น้ำ ไม่ก่อให้เกิดโรค เป็นเซลล์ของสิ่งมีชีวิตที่เพิ่ม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จำนวน เจริญและทำงานได้ดีในระบบทางเดินอาหาร รวมทั้งมีความคงทนต่อการเก็บรักษา เช่น *Bacillus* spp., *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Enterococcus* spp. และ *Streptococcus* spp. เป็นต้น

การประยุกต์ใช้โพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำนั้นเริ่มมีการใช้กันอย่างกว้างขวาง แต่ยังน้อยกว่าการนำมาประยุกต์ใช้กับมนุษย์และสัตว์บก (Fuller, 1992; Mulder *et al*., 1997; Gatesoupe, 1999; Gomez-Gil *et al*., 2000; Verschuere *et al*., 2000; Irianto and Austin, 2002; Rinkinen *et al*., 2003) การเติมจุลินทรีย์กลุ่มโพรไบโอติกที่เป็นแบคทีเรียที่ทราบคุณสมบัติและผ่านการตรวจสอบคุณภาพก่อนนำมาใช้ ดังนั้นการใช้โพรไบโอติกเพื่อให้เกิดประสิทธิภาพตามที่ต้องการนั้นขึ้นอยู่กับการเข้าใจธรรมชาติของโพรไบโอติกที่นำมาใช้ร่วมกับสภาวะหรือรูปแบบการเลี้ยงกุ้งในแต่ละพื้นที่ว่าต้องการใช้เพื่อจุดประสงค์ใด ซึ่งแบคทีเรียที่นิยมนำมาใช้กันอย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งนั้น คือ แบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* และแบคทีเรียกลุ่มแลกติก (Lactic acid bacteria) โดยมีการเติมแบคทีเรียกลุ่มนี้ลงไปในอาหารเพื่อให้ระบบทางเดินอาหารหรือร่างกายของกุ้งทำงานได้อย่างปกติซึ่งจะทำหน้าที่เป็นตัวปรับสภาพหรือเป็นตัวต่อต้านจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการและทำหน้าที่รักษาระบบสิ่งแวดล้อมในบ่อเลี้ยงให้มีสภาพปกติ โดยจุลินทรีย์เหล่านี้อาจอยู่ในรูปของเซลล์แห้งจากกระบวนการระเหิดแห้ง (freeze-dried cells) หรืออยู่ในรูปผลิตภัณฑ์หมัก ซึ่งโพรไบโอติกไม่ได้จำกัดการใช้เฉพาะในทางเดินอาหารเท่านั้น โพรไบโอติกยังมีบทบาทในการรักษาคุณภาพน้ำ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระบบการเลี้ยงแบบปิดทั้งในการเลี้ยงกุ้งขาวและกุ้งกุลาดำแบบพัฒนา ที่จุลินทรีย์ที่มีอยู่ธรรมชาติมักจะมีปริมาณไม่พอกับปริมาณของเสียที่เพิ่มขึ้น จึงจำเป็นที่ต้องเติมโพรไบโอติกลงไปเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำและบริเวณพื้นบ่อ ทำให้ระบบการเลี้ยงมีความสมดุลมากขึ้น นอกจากวัตถุประสงค์เพื่อรักษาสุขภาพกุ้งและรักษาคุณภาพน้ำแล้วนั้นโพรไบโอติกยังสามารถเป็นอาหารของกุ้งและสัตว์หน้าดินรวมทั้งสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กในบ่ออีกด้วย (องอาจ, 2545) คุณสมบัติของเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นโพรไบโอติกควรเป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารเพื่อฆ่าหรือยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อโรคได้และสามารถใช้สารอาหารได้ดีกว่าแบคทีเรียก่อโรคหรือมีความสามารถในการเกาะยึดลำไส้ได้และทำให้กุ้งที่เลี้ยงในบ่อแข็งแรงมีความต้านทานโรค (อัครเดช, 2545)

แนวคิดในการใช้โพรไบโอติก (concept of probiotic) ในทางเดินอาหารสัตว์ โดยเฉพาะในลำไส้เล็ก ไส้ติ่ง และลำไส้ใหญ่ มีจุลินทรีย์อาศัยอยู่หลายชนิด จุลินทรีย์แต่ละชนิดก็ต่างดำเนินกิจกรรมเพื่อการเจริญเติบโตและขยายจำนวน โดยใช้สารอาหารจากอาหารที่สัตว์กินและสร้างผลผลิตจำเพาะของจุลินทรีย์แต่ละชนิดออกมา สัดส่วนของชนิดจุลินทรีย์และผลผลิตที่แต่ละชนิดสร้างขึ้นมาจะส่งผล

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กระทบต่อความคงอยู่ของจุลินทรีย์ชนิดอื่นและสุขภาพของสัตว์ (host) ซึ่งมีทั้งประโยชน์และโทษ ในสภาพการเลี้ยงสัตว์ทั่วไป มักจะทำให้สัตว์เกิดความเครียด จากดินฟ้าอากาศ การเลี้ยงรวมกันอย่างหนาแน่น การใช้ยา วัคซีน การเปลี่ยนอาหาร การขนย้าย หรือความเครียดอื่นๆ ล้วนส่งผลให้จุลินทรีย์ในท่อทางเดินอาหารเปลี่ยนแปลงไปในทิศทางที่เพิ่มปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นโทษพร้อมๆ กับการลดปริมาณจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ลง ผลก็คือ สัตว์จะโตช้า กินอาหารลดลง ท้องร่วง หรือภูมิต้านทานลดลง การเติมโพรไบโอติกซึ่งส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติค (lactic acids forming bacteria หรือ LAB) ลงในอาหารในปริมาณที่มากพอ จะทำให้เกิดผลดีต่อสมรรถนะการผลิตและสุขภาพของสัตว์ โดยโพรไบโอติกเหล่านี้จะมีบทบาทในการ

1. ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ที่เป็นโทษ โดยการแย่งที่เกาะหรือแย่งอาหารหรือทำให้สภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม อันเป็นการช่วยลดสารพิษที่เชื้อจุลินทรีย์เหล่านั้นผลิตขึ้น

2. ผลิตสารต้านการเจริญเติบโตและตั้งถิ่นฐานของจุลินทรีย์ที่เป็นโทษ

3. ผลิตเอนไซม์ที่มีผลในการทำลายสารพิษในอาหารหรือที่เชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นโทษผลิตขึ้น

4. กระตุ้นให้เกิดภูมิต้านทานต่อโรคของสัตว์

5. ผลิตเอนไซม์ช่วยย่อยอาหารเพิ่มเติมให้แก่สัตว์

จากบทบาทเหล่านี้การเติมโพรไบโอติกลงในอาหารสัตว์จึงมีผลคล้ายกับการเติมยาปฏิชีวนะในแง่ของการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่เป็นโทษ และกระตุ้นการเจริญเติบโตของสัตว์ และเนื่องจากโพรไบโอติกเป็นแบคทีเรียที่ได้จากธรรมชาติ จึงไม่มีผลข้างเคียงในการสร้างการดื้อยาในเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นโทษ และปลอดจากการเหลือสารพิษตกค้างในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ จึงมีแนวโน้มว่าโพรไบโอติกจะเป็นวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่ทดแทนยาปฏิชีวนะต่อไปในอนาคต

สาเหตุอีกข้อหนึ่งที่ทำให้นิยมใช้โพรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งคือ คุณสมบัติในการกระตุ้นการกินอาหาร โดยพบว่าความต้องการอาหารจะมากขึ้นกว่าไม่มีการใช้โพรไบโอติก ซึ่งสามารถสังเกตเห็นความเปลี่ยนแปลงได้ชัดเจนจากปริมาณกุ้งที่เข้ามากินอาหารในยอมากขึ้นกว่าปกติ รวมทั้งขี้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กุ้งจะยาวและใหญ่กว่าให้อาหารโดยไม่มีโพรไบโอติก นั่นย่อมแสดงว่ากุ้งได้รับอาหารมากขึ้นการใช้โพรไบโอติกเพื่อช่วยสร้างจุลชีพประจำถิ่นที่เป็นประโยชน์โดยเฉพาะอย่างยิ่งหากสัตว์ถูกเลี้ยงในสภาพแวดล้อมที่สกปรกมาก โพรไบโอติกอาจช่วยแก้ปัญหาแรกเริ่มของประสิทธิภาพการดูดซึมอาหารเข้าไปใช้ประโยชน์ของสัตว์น้ำ และสร้างความสมบูรณ์เพื่อให้เกิดการเจริญเติบโตที่รวดเร็ว ข้อบ่งชี้ทั่วไปทำให้เห็นประโยชน์ของโพรไบโอติกในการช่วยสร้างจุลชีพประจำถิ่นที่เป็นประโยชน์ขึ้นในระบบทางเดินอาหารของกุ้ง หรือในการสร้างความสมดุลขึ้นมาใหม่อีกครั้งในสัตว์น้ำที่มีความเครียดสูง

ชนิดของโพรไบโอติกที่นำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์กุ้งจะมีคุณสมบัติแตกต่างกันไป ทั้งการบำบัดของเสียที่เกิดในการเพาะเลี้ยงกุ้ง การส่งเริมการเจริญเติบโตของกุ้งทั้งความสามารถในการยับยั้งการแบคทีเรียก่อโรค ซึ่งในตารางที่ 2 ได้แสดงชนิดของโพรไบโอติกที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้ง

ตารางที่ 2 ชนิดของโพรไบโอติกที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้ง

ชนิดโพรไบโอติก	สัตว์น้ำ	วิธีการใช้	เอกสารอ้างอิง
Bacillus spp. S11	กุ้งกุลาดำ	เติมในอาหาร	Rengpipat *et al.* (1998)
Lactobacillus spp.	กุ้งกุลาดำ	เติมในอาหาร	Phianphak *et al.* (1999)
Saccharomyces cerevisiae, Phaffia rhodozyma, S. exiguus	กุ้งขาว	เติมในอาหาร	Scholz *et al.* (1999)
Vibrio spp., *V. hepatarius*, *Bacillus spp.*	กุ้งขาว	เติมในอาหาร	Balcazar (2003)

ที่มา: ดัดแปลงจากสุบัณฑิตและวีรพงศ์ (2552); Balcazar *et al.* (2006)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

7. การทำงานของโพรไบโอติก

ถึงแม้ว่าการใช้โพรไบโอติกจะมีใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมาเป็นเวลานานกว่า 10 ปีมาแล้วก็ตาม แต่สิ่งที่พบว่ายังเป็นข้อโต้แย้งกันอยู่เสมอคือกลไกการออกฤทธิ์ของโพรไบโอติก จึงได้มีการศึกษากลไกการทำงานในการทดลองต่างๆ ซึ่งผลการทดลองที่ได้จากสัตว์บก ได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในสัตว์น้ำ โดยเฉพาะในกลุ่มของแบคทีเรีย lactic acid bacteria ที่สามารถกดการเจริญของเชื้อที่ก่อโรคในรากพืชได้แก่ fluorescent *Pseudomonas* spp. ถึงแม้ว่าจะเป็นการศึกษาที่ค่อนข้างเฉพาะทางในสาขาพืช แต่การทำงานของจุลชีพในสิ่งแวดล้อมต่างๆ มักจะมีความคล้ายคลึงกัน ได้มีการศึกษาภายในตัวสัตว์ทดลองเกี่ยวกับการใช้โพรไบโอติก รวมทั้งความสามารถในการเพิ่มจำนวนและรักษาระดับในร่างกายสิ่งมีชีวิต การผลิตสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้ออื่นในลำไส้ และการที่จุลินทรีย์สามารถที่จะมีชีวิตอยู่ในลำไส้ของเจ้าบ้านโดยที่ไม่ถูกย่อย Prieur *et al.* (1990) ได้ทดลองเกี่ยวกับการเลือกนำเข้าไปในเซลล์ และการย่อยของจุลินทรีย์ในหอยแมลงภู่ *Mytilus edulis* การเลือกจุลินทรีย์ที่นำมาใช้เป็นโพรไบโอติกนั้นถ้าจะจุลินทรีย์ถูกกินเข้าไปแล้วไม่สามารถที่จะเพิ่มจำนวนได้ในลำไส้ การใช้โพรไบโอติกนั้นต้องใส่ไปในปริมาณมากในลำไส้ซึ่งก็ไม่มีความเป็นไปได้ในการที่จะนำเชื้อนั้นมาเป็นโพรไบโอติก กลไกการทำงานที่สำคัญของโพรไบโอติก คือต้องมีความสามารถในการเพิ่มจำนวน และเจริญเติบโตในบริเวณที่ต้องการ การทำงานของโพรไบโอติกนั้นมีหลายอย่างเช่นการสร้างสารที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญ การแข่งขันในการใช้สารเคมีและพลังงานแข่งขันในการยึดเกาะ การเพิ่มการตอบสนองระบบภูมิคุ้มกัน การมีส่วนทำให้คุณภาพน้ำดีขึ้น การแก่งแย่งธาตุอาหารกับต่อแพลงก์ตอนพืช การเป็นแหล่งธาตุอาหาร การผลิตเอนไซม์ในการย่อย โดยสรุปแล้วการทำงานของโพรไบโอติกมีดังนี้

1. การผลิตสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโต

กลุ่มของจุลินทรีย์มักจะปล่อยสารเคมีออกมา โดยสารเคมีนั้นจะมีฤทธิ์เป็นสารฆ่าแบคทีเรีย (bactericidal) หรือควบคุมแบคทีเรีย (bacteriostatic) ซึ่งคุณสมบัตินี้สามารถที่จะเกิดการแข่งขันในการใช้สารเคมี หรือพลังงาน (Lemos *et al.*, 1991) การที่มีแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญในลำไส้ของเจ้าบ้าน หรือบนพื้นผิว หรือบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จะเป็นการป้องกันการเจริญของเชื้ออื่น การผลิตสารที่มีคุณสมบัติในการต้านทานเชื้อแบคทีเรียจะขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง ซึ่งบางครั้งมีปัจจัยเดียว หรืออาจเกิดจากหลายๆ ปัจจัยร่วมกันในการผลิตสารปฏิชีวนะ (antibiotics) (Williams and

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Vickers, 1986) สารต้านทานแบคทีเรีย (bacteriocins) (Bruno and Montville, 1993; Vandenbergh, 1993) ไลโซไซม์ (lysozymes) โปรติเอส (proteases) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) และการปรับค่าพีเอช โดยการผลิตกรดอินทรีย์ (organic acids) (Sugita *et al.*, 1997) แบคทีเรียกลุ่ม lactic acid bacteria สามารถผลิตสารหลายชนิด เช่น สารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น (Vandenbergh, 1993) มีการศึกษาหลายรายงานเกี่ยวกับปฏิกิริยาในการยับยั้งการเจริญโดยแบคทีเรียในกลุ่ม lactic acid bacteria ซึ่งเกิดปฏิกิริยาโดยสาร bacteriocins แต่ไม่ได้มีผลต่อแบคทีเรียในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก (Stoffels *et al.*, 1992) อย่างไรก็ตามเชื้อที่ทำให้เกิดโรคในการเลี้ยงสัตว์น้ำส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมลบซึ่งก็จะมีความเป็นไปได้ในการนำเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม lactic acid bacteria ในการเป็นโพรไบโอติก (Ring and Gatesoupe, 1998) แบคทีเรียในกลุ่ม lactic acid bacteria เมื่อเจริญอยู่ในลำไส้ของปลานั้น จะไม่เป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในปลา และมีการผลิตสาร bacteriocins เพื่อช่วยทำให้สุขภาพของปลาดีขึ้นโดยการไปมีผลยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอื่น นอกจากสาร bacteriocins และสารปฏิชีวนะที่ถูกแบคทีเรียสร้างขึ้นแล้วยังมีสารอื่นอีก ซึ่ง Nair *et al.* (1985) พบว่าแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในทะเลสามารถที่จะผลิตเอนไซม์ bacteriolytic ที่สามารถต้านทานต่อเชื้อ *V. parahaemolyticus*

การทดสอบเบื้องต้นเพื่อคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียชนิดอื่นมีวิธีการหลายวิธีที่ใช้ในการทดสอบเบื้องต้น สามารถแบ่งเป็น 2 วิธีใหญ่ คือ ทางตรงและทางอ้อม แต่ทั้งสองวิธีก็ขึ้นอยู่กับการแพร่ของสารยับยั้งผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งหรืออาหารกึ่งแข็งเพื่อยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ใช้เป็นดัชนีด้วยเช่นกัน

วิธีทางอ้อม (Indirect method or deferred autogonism)

ได้แก่ วิธีที่เรียกว่า Spot-on-the-lawn ผู้ที่คิดค้นวิธีนี้คือ Gratia (1946) อ้างโดย De Vuyst and vandamme (1994) วิธีนี้ทดลองโดยการนำเอาสารที่ต้านจุลินทรีย์ที่แบคทีเรียผลิตขึ้นมาหยดให้เป็นจุดๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแบคทีเรียทดสอบผสมอยู่แล้วบ่มทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง แล้วสังเกตวงใสของการยับยั้งสารต้านจุลชีพที่นำมาทดลอง และอีกวิธี คือ Flip-streak method ของ Kékessy & Piguet อ้างโดย De Vuyst and vandamme (1994) โดยการนำแบคทีเรียที่สร้างสารต้านจุลชีพมา streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อตามแนวยาวของเส้นผ่านศูนย์กลางของจานเพาะเชื้อ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นำเชื้อทดสอบมาขีดบนอาหารในแนวขวางหรือแนวตั้งฉากกับแนวขีดแรก บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จึงตรวจสอบการยับยั้งของเชื้อ (จินตลา, 2544)

วิธีทางตรง (Direct method)

วิธีนี้แบคทีเรียที่ใช้เป็นดัชนีและแบคทีเรียที่สร้างสารยับยั้งจะมีการเติมควบคู่กันไปเรียกว่า Well-diffusion method เริ่มจากการแยกเซลล์แบคทีเรียทีที่สร้างสารต้านจุลชีพออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวก่อนด้วยวิธีการกรองหรือปั่นเหวี่ยง (centrifuged) นำของเหลวที่ได้ไปแยกเอากรดหรือสารในกลุ่ม dialyzable compound ออกด้วยวิธี dialysis หรือทำให้ของเหลวที่ได้เป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ จากนั้นจึงนำของเหลวที่ได้ไปทดสอบผลการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบโดยการเติมลงในหลุมไว้บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีแบคทีเรียทดสอบผสมอยู่ ตรวจผลโดยดูจากบริเวณส่วนใสที่เกิดขึ้น หรืออาจใช้วิธีเติมลงไปในสารแขวนลอยของแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบแล้วตรวจผลโดยการวัดค่าความขุ่นด้วยเครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์หรือนับจำนวนแบคทีเรียทดสอบที่เหลืออยู่โดยการเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ (พงษ์เทพ, 2546)

2. การย่อยสารอาหารขนาดใหญ่ให้เป็นสารอาหารขนาดเล็ก

โพรไบโอติกสามารถช่วยให้กุ้งดูดซึมอาหารได้ดียิ่งขึ้นส่วนใหญ่แบคทีเรียโพรไบโอติกสามารถหลั่งเอนไซม์ออกมาจากเซลล์ (extracellular enzyme) เช่น อะไมเลส (amylase) ที่ย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต โปรติเอส (protease) และ ไลเปส (lipase) ที่ย่อยโปรตีนและไขมัน จากโครงสร้างที่ซับซ้อนให้ได้หน่วยที่เล็กลงโดยคุณสมบัติของโพรไบโอติกที่ช่วยย่อยสารอาหารในระบบต่างๆ เช่น *Bacillus* sp. ที่ช่วยในการย่อยสลายโปรตีนและเกิดกระบวนการ mineralization ที่เปลี่ยนสารอินทรีย์ที่ไม่ละลายน้ำให้อยู่ในรูปที่ละลายน้ำทำให้สิ่งมีชีวิตนำสารเหล่านี้ไปใช้ได้ (Venkateswara Rao, 2010)

3. การแข่งขันในการใช้แร่ธาตุ

จุลินทรีย์ทุกชนิดนั้นต้องการแร่ธาตุในการเจริญเติบโต (Reid *et al.*, 1993) โดยเฉพาะเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคส่วนใหญ่จะมีความต้องการไอออนสูง Pybus *et al.* (1994) ได้ทำการทดสอบ *V. anguillarum* 30 สายพันธุ์ ในการเป็นโพรไบโอติกต่อเชื้อที่ทำให้เกิดโรคในปลาแซลมอน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

คือ *V. ordalii* โดยดูคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ พบว่าสายพันธุ์ *V. anguillarum* VL4335 สามารถที่จะยับยั้งการเจริญของ *V. ordalii* ได้ แต่ปฏิกิริยานี้จะถูกยับยั้งเมื่อมีการใส่ไอออนของเกลือไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นสิ่งที่แสดงให้เห็นว่าการหยุดการเจริญเติบโตนั้นเกิดขึ้นเนื่องจากการขาดไอออน

4. การแข่งขันในการยึดเกาะ

กลไกหนึ่งที่จะเป็นไปได้ในการป้องกันการเจริญของเชื้อที่ก่อให้เกิดโรค คือการแข่งขันในการยึดเกาะบนผิวทางเดินอาหารหรือบนเนื้อเยื่อของเจ้าบ้าน ซึ่งเป็นที่ทราบกันแล้วว่าความสามารถในการยึดเกาะบนเมือก หรือบนพื้นผิวจำเป็นต่อแบคทีเรียที่จะเจริญในลำไส้ของสัตว์น้ำ (Olsson *et al.*, 1992; Onarheim and Raa, 1990; Westerdahl *et al.*, 1991) เมื่อแบคทีเรียมีการยึดเกาะบนพื้นผิวของเนื้อเยื่อจะเป็นการเริ่มระยะแรกของการติดเชื้อ (Krovacek *et al.*, 1987) การแข่งขันในการยึดเกาะกับเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคจึงนับว่าเป็นกลไกการทำงานแรกของโพรไบโอติก (Montes and Pugh, 1993) ในการใช้โพรไบโอติกในมนุษย์ สายพันธุ์ที่สามารถแข่งขันในการยึดเกาะนั้นถือว่าเป็นสายพันธุ์ที่จะพิจารณาในการนำมาใช้เป็นโพรไบโอติกเป็นอันดับแรก (Salminen *et al.*, 1997) การยึดเกาะนั้นไม่จำเป็นที่จะต้องมีความจำเพาะ อาจขึ้นอยู่กับปัจจัยกายภาพทางเคมีหรือมีความจำเพาะเจาะจง รวมถึงโมเลกุลที่ทำหน้าที่ในการยึดเกาะบนพื้นผิวของแบคทีเรีย และโมเลกุลบริเวณที่เป็นตัวรับ (receptor molecules) บนผิวเซลล์ การยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อที่ทำให้เกิดโรคบนผิวของเซลล์ในมนุษย์ และในสัตว์อื่น ได้มีการทดลองในห้องปฏิบัติการโดยนักวิจัยจำนวนมาก (Bernet *et al.*, 1994; Blomberg *et al.*, 1993) แต่การศึกษาในสัตว์น้ำนั้นกลไกของโพรไบโอติกในการแข่งขันในการยึดเกาะนั้นยังไม่มีการวิจัยเพื่อพิสูจน์สมมุติฐานนี้

การยึดเกาะของเชื้อที่เป็นโพรไบโอติกบนผนังลำไส้ หรือเนื้อเยื่อไม่ได้เป็นเพียงกลไกเดียวในการทำงานของโพรไบโอติก นอกเหนือจากการยึดเกาะแล้วยังต้องมีความสามารถในการเพิ่มจำนวนด้วย เนื่องจากในผนังลำไส้ของสัตว์น้ำจะมีการป้องกันตัวมันเองโดยการหลั่งสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5. คุณสมบัติในการปรับปรุงคุณภาพน้ำของโพรไบโอติก

คุณภาพน้ำในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คือ คุณสมบัติโดยรวมทั้งในด้านกายภาพ เคมีและชีวภาพของน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้ง เพื่อความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและสุขภาพของกุ้ง โดยสารประกอบไนโตรเจน เช่น แอมโมเนีย ไนไตรท์และไนเตรท ที่เพิ่มสูงขึ้นจะมีความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำ ซึ่งแอมโมเนียเป็นสารประกอบที่เกิดจากการปล่อยของเสียของกุ้งและการย่อยสลายของอาหารกุ้งที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบหลัก แอมโมเนียจะมีอยู่ 2 รูป คือ แอมโมเนีย (NH_3) ซึ่งเป็นพิษต่อสัตว์น้ำ และ แอมโมเนียมไอออน (NH_4^+) ซึ่งไม่เป็นพิษต่อสัตว์น้ำ แอมโมเนียเป็นพิษต่อกุ้งเพราะสามารถซึมผ่านผนังเซลล์ของกุ้งได้ กลไกของการเกิดความเป็นพิษอย่างเฉียบพลันของแอมโมเนียต่อกุ้งพบว่า เมื่อแอมโมเนียในน้ำเพิ่มขึ้นเป็น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร จะทำให้ปริมาณออกซิเจนในเลือดลดลงเหลือเพียง 1 ใน 7 ของสภาวะปกติ (Brockway, 1950; Hampson, 1976; Boyd, 1979)

ไนไตรท์มีความเป็นพิษน้อยกว่าแอมโมเนีย โดยความเป็นพิษของของไนไตรท์ขึ้นอยู่กับความเค็ม คือ ความเป็นพิษของไนไตรท์จะเพิ่มขึ้นเมื่อระดับความเค็มลดลง ไนไตรท์จะมีความเป็นพิษเมื่ออยู่ในรูป un-ionized และ nonpolar (NO_2^-)

ไนเตรทเป็นสารอนินทรีย์ไนโตรเจนที่พืชและแพลงก์ตอนพืชนำไปใช้ได้ ความเป็นพิษของไนเตรทในบ่อเลี้ยงกุ้งยังไม่แน่ชัด เพราะกุ้งสามารถเจริญเติบโตได้ตามปกติในน้ำที่มีไนเตรทสูง 300 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ไนเตรทสามารถถูกรีดิวซ์ไปเป็นแอมโมเนียและไนไตรท์ที่เป็นพิษต่อสัตว์กุ้งได้ (บรรจง, 2542)

การใช้โพรไบโอติกในการปรับปรุงคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งมีการศึกษาอย่างแพร่หลายซึ่งมักใช้แบคทีเรียสกุล *Bacillus* ในการปรับปรุงคุณภาพน้ำ *Bacillus* spp. เป็นแบคทีเรียแกรมบวก สามารถที่จะเปลี่ยนสารอินทรีย์ให้กลายเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ได้มากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ โดยดูจากเปอร์เซ็นต์ที่สามารถเปลี่ยนสารอินทรีย์ที่มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบในบริเวณที่แบคทีเรียอาศัยอยู่ (Stanier *et al*., 1963; Balcazar, *et al.*, 2006) ซึ่งเป็นเหตุผลว่าในบ่อที่มีปริมาณแบคทีเรียแกรมบวกสูงจะพบว่ามีปริมาณสารอินทรีย์ต่ำในระหว่างการเลี้ยง และเกิดการเพิ่มจำนวนของแพลงก์ตอนพืชเนื่องมาจากการเพิ่มขึ้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (Scura, 1995) นอกจากนี้มีการศึกษาผลของ *B. subtilis, B. megaterium, B. firmus, B. lentus* และ *B. marinus* ต่อการย่อยสลายสารอินทรีย์ในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบพัฒนา ที่มีอาหารเหลือและสิ่งขับถ่ายตกค้างอยู่ในบ่อมากมีผลให้คุณภาพน้ำแย่ลง พบว่า

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

แบคทีเรียเหล่านี้มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายขี้กุ้งและสารอินทรีย์ในบ่อเลี้ยงได้ดี และทำให้กุ้งมีอัตรารอดสูงกว่าบ่อที่ไม่เติมแบคทีเรีย (ชลิต, 2535; รัตนวดี, 2535; เปรมสุดา, 2539; Dalmin *et al*., 2001) และมีหลายงานวิจัยที่แสดงถึงผลของแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ในการปรับปรุงคุณภาพน้ำระหว่างการเลี้ยงกุ้งขาวและการอนุบาลลูกกุ้ง ที่พบว่ากลุ่มทดลองที่มีปริมาณแอมโมเนีย ไนไตรท์ และไนเตรท ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (มนฑกานต์, 2552; มนฑกานต์ และคณะ, 2552; Lakshmanan and Soundarapandian, 2008; Rajinikanth *et al.,* 2010) และในระหว่างการเลี้ยงถ้ามีแบคทีเรียแกรมบวกในปริมาณที่สูงจะช่วยลดปริมาณของสารอินทรีย์คาร์บอนที่อยู่ในรูปสารแขวนลอยและรูปที่ละลายน้ำได้ (Balcazar *et al*., 2006)

ถึงแม้ว่าจะมีการศึกษาถึงการใช้ประโยชน์จากแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *Bacillus, Nitrobacter, Pseudomonas, Enterobacter, Cellulomonas* และ *Rhodopseudomonas* spp. ในการเลี้ยงกุ้ง (Rengpipat *et al.*, 1998a) หรือในปลาดุก (Chiayuvareesajja and Boyd, 1993) แต่ก็ยังไม่สามารถที่จะยืนยันความสามารถในการปรับปรุงคุณภาพน้ำของเชื้อโพรไบโอติกในบ่อเลี้ยงกุ้งยังไม่ชัดเจนมากพอ เนื่องจากการปรับคุณภาพน้ำอยู่ในระดับต่ำ ซึ่งไม่รวมถึงกระบวนการ nitrification แบคทีเรียหลายชนิดเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม nitrifying bacteria ซึ่งสามารถควบคุมปริมาณแอมโมเนียในน้ำได้ แบคทีเรียในกลุ่มนี้สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยา oxidation ของแอมโมเนียให้กลายเป็นไนไตรท์และเป็นไนเตรทในที่สุด การใช้ nitrifying bacteria มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณแอมโมเนียได้ดี (Carmignani and Bennett, 1977) Perfettini and Bianchi (1990) ได้ทดลองใช้เซลล์แช่แข็งกับน้ำทะเลในระบบปิดพบว่ากระบวนการ nitrification เกิดเร็วขึ้น 30 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำเลี้ยงในระบบหมุนเวียนกึ่งปิด (semiclosed water recirculation system) เมื่อมีการใช้แบคทีเรียกลุ่ม nitrifying พบว่าสามารถลดปริมาณแอมโมเนียจาก 3–4 สัปดาห์ เป็น 10 วัน การเลี้ยงแบคทีเรียในกลุ่ม nitrifying สามารถที่จะเติมลงในบ่อ หรือในถังเลี้ยงที่พบว่ามีปริมาณแอมโมเนียหรือไนไตรท์ในระดับที่สูง ซึ่งแอมโมเนียและไนไตรท์นั้นเป็นสารพิษซึ่งเป็นปัญหาที่พบในการเลี้ยงปลา (Lewis and Morris, 1986) เช่น ในบ่อเลี้ยงปลา channel catfish (Tucker *et al.*, 1989)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 3 ชนิดของโพรไบโอติกเพื่อควบคุมคุณภาพน้ำในการเลี้ยงกุ้ง

ชนิดโพรไบโอติก	สัตว์น้ำ	เอกสารอ้างอิง
Bacillus sp.	กุ้งกุลาดำ	Moriarty (1998)
Vibrio P62 และ *Bacillus* P64	กุ้งขาว	Gullian *et al*. (2004)
Pseudomonas sp. และ *V. fluvialis*	กุ้งกุลาดำ	Alavandi *et al.* (2004)
Bacillus spp.	ลูกกุ้งขาวและกุ้งขาว	มนฑกานต์ (2552)

8. การทดลองการใช้โพรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้ง

มินตรา (2551) ได้ทำการแยกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จากลำไส้ของกุ้งขาวแวนนาไมจากฟาร์มเลี้ยงกุ้งในจังหวัดฉะเชิงเทราและนครปฐม จำนวน 80 ตัวอย่าง พบเชื้อ *Bacillus* 5 ชนิด คือ *B. licheniformis, B. cereus, B. coagulans, B. sphaericus* และ *B. subtilis* และนำมาศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งทะเล *V. harveyi* ด้วยวิธี cross streak พบว่าเชื้อสายพันธุ์ *B. licheniformis* สายพันธุ์ BLF และ *B. licheniformis* สายพันธุ์ BLS แสดงลักษณะการยับยั้งการเติบโตของ *V. harveyi* เชื้อ *B. cereus* สายพันธุ์ BCES และ *B. sphaericus* แสดงลักษณะการครอบครองพื้นที่ของ *V. harveyi* ส่วน *B. cereus* สายพันธุ์ BCEF, *B. coagulans* และ *B. subtilis* ไม่แสดงการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* และเมื่อนำ *Bacillus* spp. ที่แยกได้มาทำการทดสอบความสามารถในการลดปริมาณเชื้อ *V. harveyi* ในน้ำทะเลความเค็ม 20 ส่วนในพันส่วน พบว่าเชื้อ *B. licheniformis* สายพันธุ์ BLF, *B. licheniformis* สายพันธุ์ BLS, *B. cereus* สายพันธุ์ BCEF, *B. cereus* สายพันธุ์ BCES, *B. coagulans*, *B. sphaericus* และ *B. subtilis* สามารถลดปริมาณ *V. harveyi* ได้ เมื่อนำแบคทีเรีย *Bacillus* มาผสมกับอาหารให้ลูกกุ้งกุลาดำกินในอัตราส่วนต่างๆ กันพบว่าลูกกุ้งที่ได้รับโพรไบโอติกมีอัตราการรอดตายจากการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคโดย *V. harveyi* สูงและมีสุขภาพแข็งแรงการเจริญเติบโตดีกว่ากุ้งที่ไม่ได้รับโพรไบโอติก (ลิลา และคณะ, 2540; นิตยา, 2549; Phianphak, 1997)

สินธิ และ ลิลา (2541) นำผิวดินพื้นบ่อเลี้ยงกุ้งมาทำการแยกสายพันธุ์ *Bacillus* ได้ 6 สายพันธุ์ และนำมาผสมอาหารให้กุ้งกุลาดำกิน พบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารผสม *Bacillus* มีอัตราการรอดตายและการเจริญเติบโตสูงกว่ากลุ่มควบคุม ต่อมาวัชริยา และคณะ (2547) ได้ทำการศึกษาแบคทีเรียสกุล

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Bacillus ที่แยกได้จากลำไส้กุ้งกุลาดำ 3 ชนิด คือ *B. sphaericus, B. pumilus* และ *B. subtilis* เมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *V. harveyi* พบว่า *B. pumlius* สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *V. harveyi* และเมื่อทำการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope : TEM) พบว่า *Bacillus* ทั้ง 3 ชนิดสามารถที่จะทำลายผนังเซลล์ของ *V. harveyi* ได้และการที่กุ้งได้รับแบคทีเรีย *B. sphaericus* และ *B. subtilis* จะทำให้อัตราการเจริญเติบโตของกุ้งสูงกว่ากลุ่มควบคุม จากการศึกษาของ Rengpipat *et al*. (1998a) ใช้แบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ S11 เป็นโพรไบโอติกให้ไรสีน้ำตาล (*Artemia* sp.) กินแล้วนำมาเป็นอาหารสำหรับเลี้ยงลูกกุ้งกุลาดำพบว่า อัตราการรอดตายและอัตราการเจริญเติบโตดีกว่ากลุ่มควบคุม วรรณิภา (2539), Rengpipat *et al*. (2000) ได้ทำการทดลองพบว่าการรอดตายและการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำที่ให้อาหารผสม *Bacillus* S11 จะดีกว่ากุ้งที่ไม่ได้รับอาหารผสม *Bacillus* S11 โดย *Bacillus* S11 มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นและเพิ่มกระบวนการ phagocytosis จากการวัด percent phagocytosis และ phagocytic index (PI) ในเลือด prophenoloxidase และกระบวนการกำจัดแบคทีเรีย (antibacterial activities) ซึ่งจะเพิ่มตามอายุของกุ้ง แต่จะเพิ่มมากขึ้นโดยการใช้โพรไบโอติก หลังจากเลี้ยงกุ้ง 90 วัน โดยให้อาหารที่ผสมและไม่ผสม *Bacillus* S11 และทดสอบการติดเชื้อโดยใช้ *V. harveyi* หลังจากนั้น 10 วัน กุ้งที่ผสมโพรไบโอติกมีอัตราการรอดตายดีกว่ากลุ่มควบคุม Gullian *et al.* (2004) ได้แยกจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกจากตับและตับอ่อน และลำไส้ได้ 3 ชนิด คือ *Vibrio* P62, *Vibrio* P63 และ *Bacillus* P64 ซึ่งแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด สามารถยับยั้งการเติบโตของ *V. harveyi* (S2) ได้เป็นอย่างดี

จากการศึกษาของมณจันทร์ และกมลพร (2543) ถึงแบคทีเรียที่มีประโยชน์ของ *B. subtilis* และ *B. licheniformis* ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *V. harveyi* ที่เป็นสาเหตุโรคเรืองแสงในกุ้งกุลาดำ พบว่ามีศักยภาพในการยับยั้งที่ 72 ชั่วโมง และเมื่อนำลักษณะ *V. harveyi* ที่ทดสอบด้วย *B. subtilis* มาศึกษาความผิดปกติของเซลล์ด้วยจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องผ่านพบว่ารูปร่างของเซลล์เล็กกว่าปกติมาก *B. subtilis* จึงเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในบ่อเลี้ยงกุ้งเพื่อยับยั้งการเจริญของ *V. harveyi*

Phianphak *et al*. (1999) ได้ศึกษาในกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Lactobacillus* spp. ที่แยกได้จากทางเดินอาหารไก่ พบว่ากุ้งกุลาดำมีอัตรารอดตายและการเจริญเติบโตมากกว่ากลุ่มควบคุม เมื่อเลี้ยงครบ 100 วัน และเมื่อนำทั้ง 2 กลุ่มมาเหนี่ยวนำให้เกิดโรค โดยการแช่เชื้อ *V. harveyi* เป็นเวลา

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

10 วัน พบว่ากลุ่มที่ผสม *Lactobacillus* spp. มีอัตราการรอดตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีอัตรารอดตาย 26 เปอร์เซ็นต์

สมาน (2538) ได้ทดลองใช้ผลิตภัณฑ์แบคทีเรีย 2 ชนิด คือ ชนิดน้ำเข้มข้นที่มีแบคทีเรีย *B. polymyxa, B. megaterium* และ *B. subtilis* และชนิดผงที่มีแบคทีเรีย *B. subtilis, Nitrosomonas* sp. และ *Nitrobacter* sp. ในอัตรา 4 ลิตรต่อไร่ และ 1 กิโลกรัมต่อไร่ ตามลำดับ ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำขนาดน้ำหนัก 10 กรัม ในถังไฟเบอร์กลาสในอัตราความหนาแน่น 30 ตัวต่อตารางเมตร ด้วยอาหารเม็ดสำเร็จรูปเป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าอัตราการเจริญเติบโตและอัตรารอดตายของกุ้งกุลาดำไม่แตกต่างกันจากกลุ่มควบคุม เช่นเดียวกับที่สรรเสริญ และ ทวี (2539) ได้ทดลองใช้ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ *B. subtilis* ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำระยะโพสลาร์วา-22 ในบ่อดินขนาด 800 ตารางเมตร ในอัตราความหนาแน่น 50 ตัวต่อตารางเมตร ในอัตรา 1 กิโลกรัมต่อไร่ ก่อนปล่อยกุ้ง และในอัตรา 250-500 กรัมต่อไร่ ทุก ๆ 7-15 วัน ระหว่างการเลี้ยงกุ้ง ให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปเป็นเวลา 135 วัน พบว่ากุ้งมีการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายไม่แตกต่างจากบ่อที่ไม่ได้ใช้ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ แต่คุณสมบัติของน้ำโดยเฉพาะปริมาณแอมโมเนียและไนไตรท์ในบ่อที่เติมผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ต่ำกว่าบ่อที่ไม่เติมจุลินทรีย์ 32.18 และ 9.31 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

การศึกษาของวิจิตรา และ สมหมาย (2541) ที่ใช้แบคทีเรีย *B. subtilis* จำนวน 5 สายพันธุ์ควบคุมคุณภาพน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำและควบคุมโรคเรืองแสงที่เกิดจากแบคทีเรีย *V. harveyi* มาทดสอบในห้องปฏิบัติการ พบว่าน้ำจากก้นบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่เติม *B. subtilis* สายพันธุ์ ABS-D18 เข้มข้น 10^3 CFU/มิลลิลิตร เป็นเวลา 34 วัน มีปริมาณแอมโมเนีย ไนไตรท์ ไนเตรท และพีเอชไม่แตกต่างจากชุดควบคุมแต่ *B. subtilis* จำนวน 4 ใน 5 สายพันธุ์ สามารถควบคุมโรคเรืองแสงได้

จันทสิงห์ (2544) ได้ทดลองเลี้ยงกุ้งกุลาดำขนาดน้ำหนักเฉลี่ย 5.96 กรัม ในบ่อพลาสติกขนาด 130 ลิตร ในอัตราความหนาแน่น 20 ตัวต่อบ่อ ให้อาหารสำเร็จรูปที่เติมแบคทีเรีย *Bacillus S11* และเติมแบคทีเรีย *B. subtilis* และ *B. firmus* ในน้ำให้มีจำนวนไม่ต่ำกว่า 10^3 CFU/มิลลิลิตร ตลอดการเลี้ยง เปรียบเทียบกับกุ้งที่เลี้ยงโดยไม่เติมแบคทีเรียทั้งในอาหารและน้ำ พบว่าคุณภาพน้ำและอัตราการเจริญเติบโตของกุ้งใน 2 ชุดการทดลองไม่แตกต่างกัน แต่กุ้งในชุดทดลองที่เติมแบคทีเรียมีอัตราการรอดตายสูงกว่าชุดควบคุม และเมื่อนำไปทดลองเลี้ยงกุ้งระยะโพสลาร์วา-25 ในบ่อดินขนาด 900 ตารางเมตร ในอัตราความหนาแน่น 33 ตัวต่อตารางเมตร เป็นเวลา 100 วัน พบว่ากุ้งในชุดทดลองที่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เติมแบคทีเรียมีอัตราการเจริญเติบโตและผลผลิตสูงกว่ากุ้งในชุดควบคุมและมีค่าบีโอดี ปริมาณแอมโมเนียรวม ไนไตรท์ ไนเตรท และออร์โธฟอสเฟตของน้ำ และปริมาณสารอินทรีย์ในตะกอนดินต่ำกว่าชุดควบคุมตลอดการทดลอง

วารุณี (2549) ได้ทำการศึกษาผลของการใช้จุลินทรีย์กลุ่ม *Bacillus* sp. ต่อคุณภาพน้ำและผลผลิตกุ้งกุลาดำพบว่าในบ่อที่เติมจุลินทรีย์กลุ่ม *Bacillus* sp. มีปริมาณแอมโมเนียรวมและปริมาณไนไตรท์-ไนโตรเจนต่ำกว่าบ่อที่ไม่เติมจุลินทรีย์ส่วนปริมาณผลผลิตของบ่อที่มีการเติมจุลินทรีย์มีค่ามากกว่าบ่อที่ไม่เติมจุลินทรีย์แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้โพรไบโอติกในกลุ่ม *Lactobacillu*s spp. ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำโดยผสมในอาหารในปริมาณ 1 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ให้กุ้งกุลาดำกินติดต่อกันนาน 110 วันสามารถลดปริมาณแบคทีเรีย *Vibrio* รวมทั้งมีผลผลิตเฉลี่ย น้ำหนักเฉลี่ย อัตราการรอดตาย และอัตราการเจริญเติบโต มากกว่าบ่อที่ไม่มีการให้โพรไบโอติกผสมในอาหาร (วรรณพร, 2550)

9. ข้อดีและข้อเสียของการใช้โพรไบโอติก

ข้อดีของการใช้โพรไบโอติก

โพไบโอติกจะช่วยกำจัดเศษอาหารเหลือที่เป็นของเสีย รวมทั้งตะกอนสารอินทรีย์ที่แขวนลอยอยู่ในน้ำให้เป็นสารอนินทรีย์ที่สามารถละลายน้ำได้ และแบคทีเรียบางชนิดสามารถเปลี่ยนสารพิษให้อยู่ในรูปที่ไม่เป็นพิษต่อสัตว์น้ำได้ เช่น เปลี่ยนแอมโมเนียให้เป็นไนเตรท เปลี่ยนไฮโดรเจนซัลไฟด์ให้เป็นซัลเฟตได้ ซึ่งการใช้โพรไบโอติกสามารถช่วยให้สภาพแวดล้อมในบ่อเลี้ยงกุ้งมีความเหมาะสม ไม่มีการสะสมของเลนมากนักและยังช่วยลดและควบคุมปริมาณแบคทีเรียก่อโรคในกุ้ง เช่น *Vibrio* sp.

ข้อเสียของการใช้โพรไบโอติก

บ่อเลี้ยงกุ้งที่มีสารอินทรีย์ตกค้างมากๆ เนื่องจากมีการให้อาหารมากเกินไป เมื่อมีการเติมจุลินทรีย์ลงไปในปริมาณมาก จุลินทรีย์จะเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วการย่อยสลายสารอินทรีย์โดยจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ต้องใช้ออกซิเจน ทำให้ปริมาณออกซิเจนในบ่อลดลงโดยเฉพาะในเวลากลางคืนซึ่งเป็นผลให้กุ้งเกิดอาการเครียด อ่อนแอมีโอกาสติดเชื้อและป่วยเป็นโรคได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ผลของแบคทีเรียกลุ่มสร้างสปอร์แต่ละชนิดต่อการยับยังเชื้อ *Vibrio harveyi*

1.1 ตรวจสอบชนิดของแบคทีเรียสร้างสปอร์ได้ ในผลิตภัณฑ์ PondSafe

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้รับจากบริษัท Novozymes Biological, Inc. มาทำการแยกชนิดของแบคทีเรียสร้างสปอร์และนับปริมาณของแต่ละชนิดโดย

1.1.1 ชั่งผลิตภัณฑ์ปริมาณ 1 กรัม มาละลายในหลอดแก้วที่มีน้ำเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร จะได้สารละลายแบคทีเรียที่ต้องการในความเข้มข้น 10 เท่า

1.1.2 ใช้วิธีเจือจางลำดับส่วนโดยการเจือจางไปเรื่อยๆ ดูดสารสารละลายแบคทีเรียที่ความเข้มข้น 10 เท่า มา 1 มิลลิลิตร เจือจางลงในหลอดที่มีน้ำเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ทำซ้ำต่อไปเรื่อยจนครบ 10 หลอด

1.1.3 ดูดสารละลายเชื้อแบคทีเรียในหลอดที่ 9 และ 10 มา 0.1 มิลลิลิตร spread บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA (Plate count agar) ที่เติมเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง

1.1.4 เมื่อแยกโคโลนีที่แตกต่างกับของแบคทีเรียที่สามารถสร้างสปอร์ได้แล้วจะทำการศึกษาลักษณะและรูปร่างเซลล์ โดยวิธีการย้อมแกรมแล้วทำการบันทึกผล

1.1.5 การจำแนกชนิดแบคทีเรียสร้างสปอร์โดยใช้ชุด API 50 CBH

1.2 ผลของประสิทธิภาพของแบคทีเรียสร้างสปอร์ต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi*

การทดสอบคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียสร้างสปอร์ในการสร้างสารยับยั้งเชื้อก่อโรค *V. harvei* โดยวิธีการ cross streak (วัชริยา, 2549) เพื่อทดสอบคุณสมบัติของเชื้อที่แบคทีเรียสร้างสปอร์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

แต่ละชนิดว่ามีคุณสมบัติในการเกิด colonization หรือ inhibition ต่อเชื้อ *V. harveyi* ที่เป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรค

1.2.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียกลุ่มสร้างสปอร์ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* ในการทดสอบด้วยวิธีการ cross streak method

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแบคทีเรียสร้างสปอร์ที่ทราบชนิดแล้วบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่เติมเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

1.2.2 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ที่ใช้ในการทดสอบ cross streak method

เลี้ยงเชื้อ *V. harveyi* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

1.2.3 เลือกโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรียสร้างสปอร์ที่เลี้ยงไว้เมื่อครบ 24 ชั่วโมง จากข้อ 1.2.1 และ *V. harveyi* ในข้อ 1.2.2 มาทำ cross streak โดยจะแบ่งการทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง

- กลุ่มควบคุมจะ streak เชื้อแบคทีเรียแต่ละตัว (*V. harveyi*, แบคทีเรียสร้างสปอร์)
- กลุ่มทดลองจะนำแบคทีเรียสร้างสปอร์แต่ละชนิดมา cross กับเชื้อ *V. harveyi* ซึ่งจะตรวจผลการเกิด colonization และ inhibition ที่ 24, 48 และ 96 ชั่วโมง วิธีการทำ cross streak เริ่มจากนำเชื้อ *V. harveyi* มาขีดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่เติมเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นให้ขีดเส้นแบคทีเรียสร้างสปอร์แต่ละตัวลงไปในแนวตั้งฉากกับแนวเส้นเชื้อ *V. harveyi* และแต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ

1.2.4 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และตรวจผลที่ 24, 48 และ 96 ชั่วโมง แล้วทำการบันทึกผล

1.3 การทดสอบความสามารถในการสร้างสารต้านทานแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* ของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มสร้างสปอร์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การทดสอบในขั้นตอนนี้จะเลือกแบคทีเรียสร้างสปอร์ที่มีคุณสมบัติ Inhibition ต่อเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ในข้อ 1.2 มาทดสอบโดยวิธี agar well diffusion (Lertcanawanichakul and Sawangnop, 2008)

1.3.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียสร้างสปอร์ในการทดสอบความสามารถในการสร้างสารต้านทานแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi*

นำเชื้อแบคทีเรียสร้างสปอร์ที่ทราบชนิดแล้ว ทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในกุ้งขาวแวนนาไม คือ *V. harveyi* โดยทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสร้างสปอร์บนอาหาร NA ที่เติมเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาใช้ลูปเขี่ยเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเขี่ยโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร NA ที่เติมเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์มาเลี้ยงในอาหารเหลว NB (Nutrient Broth) ที่เติมเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงไว้ให้เชื้อเจริญที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง เมื่อครบ 96 ชั่วโมงเก็บเชื้อจากอาหารเหลวโดยนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส

1.3.2 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ที่ใช้ทดสอบความสามารถในการต้านทานของแบคทีเรียกลุ่มสร้างสปอร์

เลี้ยงเชื้อ *V. harveyi* บนอาหาร TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Sucrose) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาใช้ลูปเขี่ยเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเขี่ยโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ *V. harveyi* มาเลี้ยงในอาหารเหลว NB (Nutrient Broth) ที่เติมเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ไว้ให้เชื้อเจริญที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบ 24 ชั่วโมงเก็บเชื้อจากอาหารเหลวโดยวิธีที่กล่าวมาแล้วข้างต้น แล้วนำเชื้อที่ในอยู่รูป suspension bacteria ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร วัดค่า OD = 0.1 (10^8 CFU / มิลลิลิตร) เพื่อนำไปทดสอบ

1.3.3 นำสำลีพันก้านที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จุ่มลงใน suspension bacteria ของเชื้อ *V. harveyi* (จากข้อ 1.3.2) มา swab ให้ทั่วหน้าอาหาร NA ที่เติมเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.3.4 นำ plate ที่ swab เชื้อ *V. harveyi* แล้วมาเจาะรูด้วยปลายปิเปตแก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อมาเจาะรู จากนั้นเติม suspension bacteria ของเชื้อแบคทีเรียสร้างสปอร์แต่ละชนิดที่เตรียมไว้ในข้อ 1.3.1 มาหยอดลงไปในหลุม หลุมละ 40 ไมโครลิตร และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วอ่านผลโดยการดูบริเวณใส (clear zone) ที่เกิดขึ้นวัดขนาดของส่วนใส รายงานเป็นหน่วยมิลลิเมตร

1.4 การทดสอบความสามารถในการแข่งขันการใช้สารอาหารในการเจริญร่วมกันของเชื้อโพรไบโอติกและเชื้อก่อโรค (broth co-culture assay) ดัดแปลงจากวิธีการของ Hjelm *et al.* (2004)

1.4.1 เลี้ยงแบคทีเรียสร้างสปอร์แต่ละชนิด และเชื้อ *V. harveyi* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ที่เติมเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ และเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงเจือจางเชื้อแต่ละชนิดให้มีปริมาณเชื้อประมาณ 10^5 CFU/มิลลิลิตร นำเชื้อแต่ละชนิดปริมาณ 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองซึ่งมี NB ปริมาณ 5 มิลลิลิตร เขย่าหลอดทดลองที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง โดยแบ่งกลุ่มทดลองออกเป็น 13 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ ดังนี้

ชุดทดลองที่ 1 *V. harveyi*
ชุดทดลองที่ 2 แบคทีเรียสร้างสปอร์ชนิดที่ 1
ชุดทดลองที่ 3 แบคทีเรียสร้างสปอร์ชนิดที่ 2
ชุดทดลองที่ 4 แบคทีเรียสร้างสปอร์ชนิดที่ 3
ชุดทดลองที่ 5 แบคทีเรียสร้างสปอร์ชนิดที่ 4
ชุดทดลองที่ 6 แบคทีเรียสร้างสปอร์ชนิดที่ 5
ชุดทดลองที่ 7 แบคทีเรียสร้างสปอร์ชนิดที่ 1, 2 , 3, 4, 5
ชุดทดลองที่ 8 *V. harveyi* + แบคทีเรียสร้างสปอร์ชนิดที่ 1
ชุดทดลองที่ 9 *V. harveyi* + แบคทีเรียสร้างสปอร์ชนิดที่ 2
ชุดทดลองที่ 10 *V. harveyi* + แบคทีเรียสร้างสปอร์ชนิดที่ 3
ชุดทดลองที่ 11 *V. harveyi* + แบคทีเรียสร้างสปอร์ชนิดที่ 4
ชุดทดลองที่ 12 *V. harveyi* + แบคทีเรียสร้างสปอร์ชนิดที่ 5
ชุดทดลองที่ 13 *V. harveyi* + แบคทีเรียสร้างสปอร์ชนิดที่ 1, 2 , 3, 4, 5

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.4.2 ตรวจนับปริมาณเชื้อบนอาหาร TCBS และอาหาร NA ที่เติมเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลา 0, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง ด้วยวิธีการ spread plate ซึ่งปริมาณเชื้อบนอาหาร TCBS จะเป็นปริมาณเชื้อ *V. harveyi* ส่วนปริมาณของ *Bacillus* แต่ละชนิดคำนวณจาก ปริมาณเชื้อบน NA – ปริมาณเชื้อบน TCBS

1.4.3 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำจำนวนแบคทีเรียบนอาหาร TCBS และจำนวนเชื้อบน NA – ปริมาณเชื้อบน TCBS มาวิเคราะห์ความแตกต่างของจำนวนเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* และจำนวนเชื้อแบคทีเรียของสร้างสปอร์แต่ละชนิดโดยใช้วิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มทดลอง โดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (อนันต์ชัย, 2542) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ SPSS version 13.0

2. ผลของแบคทีเรียกลุ่มสร้างสปอร์ต่ออัตรารอดและการเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไมในห้องปฏิบัติการ

แบ่งชุดการทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม คือ
ชุดการทดลองที่ 1 เลี้ยงด้วยอาหารปกติ (กลุ่มควบคุม)
ชุดการทดลองที่ 2 ให้อาหารสำเร็จรูปที่ผสมผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์

2.1 การเตรียมถังและน้ำที่ใช้เลี้ยง

ทำการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมภายในห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยธุรกิจเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยใช้ถัง fiber glass ขนาดความจุ 500 ลิตรจำนวน 8 ถัง โดยในแต่ละชุดการทดลองจะมี 4 ถัง ก่อนเริ่มทำการทดลองจะฆ่าเชื้อในถังก่อนซึ่งจะใช้คลอรีนผงในการฆ่าเชื้อ น้ำเค็มที่ใช้เลี้ยงเตรียมที่ความเค็ม 25 ส่วนในพันส่วน เมื่อคลอรีนในถังเลี้ยงสลายตัวหมดแล้ว เติมน้ำเค็มที่เตรียมไว้ลงในถัง fiber glass ในปริมาตร 400 ลิตรจากนั้นต่อระบบการให้อากาศในถังเลี้ยง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ในระหว่างการเลี้ยงจะใช้ heater เพื่อเป็นตัวควบคุมอุณหภูมิของน้ำในถังให้อยู่ที่ 30 องศาเซลเซียส ตลอดระยะเวลาการเลี้ยง

2.2 การเตรียมอาหารและการให้อาหาร

ชุดการทดลองที่ 1 เลี้ยงด้วยอาหารปกติ (กลุ่มควบคุม) จะให้อาหารกุ้งสำเร็จรูปที่เคลือบด้วยน้ำมันปลาหมึกอย่างเดียว

ชุดการทดลองที่ 2 ให้อาหารสำเร็จรูปที่ผสมแบคทีเรียสร้างสปอร์ในอัตราส่วนแบคทีเรียสร้างสปอร์ 5 กรัมต่ออาหารกุ้งสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม*

ในการผสมอาหารกับผลิตภัณฑ์ใช้น้ำมันปลาหมึกเคลือบขณะผสมอาหารเพื่อให้เชื้อจุลินทรีย์ติดกับอาหารที่จะให้ทั้ง 2 ชุดการทดลองจะเริ่มให้อาหารที่ 3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว ให้อาหารที่ 4 มื้อต่อวัน

*** หมายเหตุ:** เนื่องจากข้อกำหนดในการขึ้นทะเบียนอาหารที่ให้มีการใช้จุลินทรีย์ผสมกับอาหารสัตว์นั้นต้องมีปริมาณจุลินทรีย์ไม่น้อยกว่า 10^5 CFU ต่ออาหาร 1 กรัม เป็นอย่างน้อย ซึ่งการทดลองในฟาร์มเลี้ยงกุ้งเอกชนจึงใช้อัตราส่วนผสมของจุลินทรีย์โพรไบโอติก 2 กรัมต่ออาหารกุ้ง 1 กิโลกรัม เพื่อทดแทนการสูญเสียของโพรไบโอติกที่ละลายไปกับน้ำก่อนกุ้งจะกินอาหาร ส่วนการทดลองการเลี้ยงกุ้งในห้องปฏิบัติการจะให้เพิ่มเป็นอัตราส่วนผสมโพรไบโอติก 5 กรัมต่ออาหารกุ้ง 1 กิโลกรัม เพราะเป็นการเลี้ยงกุ้งในช่วงหน้าหนาว (เดือนพฤศจิกายน-เดือนธันวาคม) กุ้งจะกินอาหารน้อยกว่าปกติจึงมีการเสริมโพรไบโอติกมากกว่าในบ่อเลี้ยง

2.3 นำกุ้งขาวแวนนาไมจากฟาร์มในจังหวัดจันทบุรี ที่ใช้ในการทดลองมาพักในถังพัก 7 วัน ก่อนเริ่มเลี้ยงจริง เมื่อครบกำหนดนำกุ้งมาชั่งน้ำหนัก และวัดความยาว โดยเลือกใช้กุ้งที่มีน้ำหนัก 7-8 กรัมในการทดลอง ในแต่ละถังจะปล่อยกุ้ง 30 ตัว ต่อถัง (60 ตัวต่อตารางเมตร)

2.4 เลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมทั้ง 2 ชุดการทดลองเป็นระยะเวลา 60 วัน โดยทำการชั่งน้ำหนัก นับอัตารอดและเปลี่ยนถ่ายน้ำทุก 10 วัน ซึ่งก่อนเปลี่ยนถ่ายน้ำจะวิเคราะห์สมบัติของน้ำ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.5 ประเมินประสิทธิภาพของการใช้แบคทีเรียสร้างสปอร์ในการยับยั้งเชื้อ *V. harveyi* ในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมโดยนำลำไส้กุ้งขาวแวนนาไมในแต่ละชุดการทดลองมาชั่งน้ำหนัก และนำลำไส้บดใน homogenizer ซึ่งใส่น้ำเกลือ 1.5% ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว แบ่งสารละลายที่ได้เป็น 2 ส่วน ส่วนแรกนำไปนับปริมาณแบคทีเรียสกุล *Vibrio* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS โดยวิธีการ spread plate บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนที่สองนำไปนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในลำไส้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่เติมเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยวิธีการ spread plate

2.6 นำลำไส้กุ้งไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope: SEM) เพื่อเปรียบเทียบชนิดของแบคทีเรียในลำไส้ของกุ้งที่ได้รับอาหารผสม *Bacillus* spp. และกลุ่มควบคุมที่ได้รับอาหารปกติ

2.7 การวิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำระหว่างการเลี้ยง

ในระหว่างการเลี้ยงเก็บตัวอย่างน้ำมาวิเคราะห์คุณภาพน้ำในห้องปฏิบัติการทุก 10 วัน โดยมีค่าพารามิเตอร์และวิธีการวิเคราะห์ดังนี้

- พีเอชวัดโดยใช้เครื่องวัดพีเอชรุ่น Ecoscan pH 5
- ปริมาณแอมโมเนียรวม (total ammonia-nitrogen) วัดโดยใช้วิธีphenol-hypochlorite method (APHA *et al*., 1995)
- ปริมาณไนไตรท์ (nitrite-nitrogen) วัดโดยใช้วิธีของ APHA *et al*. (1995)
- ความเป็นด่าง (total alkalinity) วัดโดยใช้วิธีtitration (APHA *et al*., 1995)

2.8 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นับจำนวนกุ้งที่เหลือในถังทดลองทุก 10 วัน นำมาคำนวณอัตรารอดตายและชั่งน้ำหนักกุ้งด้วยเครื่องชั่งดิจิตอล เพื่อหาค่าเฉลี่ยของน้ำหนักกุ้งแต่ละตัวนำมาคำนวณอัตราการการเจริญเติบโต วิเคราะห์ความแตกต่างของอัตรารอดและอัตราการเจริญเติบโตระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมโดยวิธี Independent –Samples T Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (อนันต์ชัย, 2542) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ SPSS version 13.0

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. ผลของแบคทีเรียกลุ่มสร้างสปอร์ต่อปริมาณ *Vibrio* spp. และผลต่ออัตรารอด การเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไมในบ่อเลี้ยง

ทำการศึกษาที่ฟาร์มเอกชน อำเภอนายายอาม จังหวัดจันทบุรี โดยเลือกบ่อที่ทำการศึกษาทั้งหมด 6 บ่อที่มีขนาดและสภาพแวดล้อมใกล้เคียงกัน มีอัตราการปล่อยลูกกุ้งเท่ากัน แต่ละบ่อมีพื้นที่ประมาณ 4 ไร่ แบ่งเป็น 2 ชุดการทดลอง คือ ในบ่อทดลองจำนวน 3 บ่อ จะให้แบคทีเรียกลุ่มสร้างสปอร์คลุกผสมอาหารในอัตราส่วน 2 กรัมต่ออาหารกุ้ง 1 กิโลกรัม และในบ่อควบคุมจำนวน 3 จะให้อาหารปกติ เริ่มให้อาหารผสมแบคทีเรียกลุ่มสร้างสปอร์หลังจากปล่อยลูกกุ้งลงเลี้ยงไปแล้ว 20 วัน และในกลุ่มทดลองนั้นจะให้อาหารผสมแบคทีเรียกลุ่มสร้างสปอร์โดยให้ติดต่อกัน 5 วันและหยุด 5 วันไปจนสิ้นสุดการทดลอง

3.1 ผลของแบคทีเรียสร้างสปอร์ต่อปริมาณ *Vibrio* spp. ในเลือดกุ้งขาวแวนนาไม

วัดปริมาณเชื้อ *Vibrio* spp. ในเลือดโดยใช้วิธีการ spread plate ซึ่งจะเก็บข้อมูลทุก 30, 60 และ 90 วัน ในแต่ละบ่อทดลองและบ่อควบคุมจะสุ่มกุ้งขึ้นมาบ่อละ 50 ตัว และทุกรอบที่เก็บข้อมูลจะชั่งวัดน้ำหนักเพื่อวัดอัตราการเจริญเติบโต ส่วนอัตรารอดจะคำนวณกลับจากปริมาณกุ้งที่จับได้เทียบกับจำนวนลูกกุ้งที่ปล่อยลงบ่อเลี้ยงดังนี้

$$\% \text{ อัตรารอด} = \frac{\text{จำนวนกุ้งที่จับได้}}{\text{จำนวนกุ้งที่ปล่อยเลี้ยงทั้งหมด}} \times 100$$

3.2 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่แบคทีเรีย น้ำหนักเฉลี่ย และผลผลิตกุ้งเมื่อครบ 90 วัน มาคำนวณค่าและวิเคราะห์ความแตกต่างของอัตรารอดและอัตราการเจริญเติบโตระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม โดยใช้วิธี Independent –Samples T Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (อนันต์ชัย, 2542) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ SPSS version 13.0

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สถานที่และระยะเวลาทำการวิจัย

1.สถานที่ทำการวิจัย

1. ศูนย์วิจัยธุรกิจเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพมหานคร

2. ฟาร์มเลี้ยงกุ้งเอกชน ตำบลช้างข้าม อำเภอนายายอาม จังหวัดจันทบุรี

2.ระยะเวลาทำการวิจัย

ระหว่างเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2552 – พฤศจิกายน พ.ศ. 2553

แหล่งทุนสนับสนุน

บริษัท Novozymes Biological, Asia Pacific

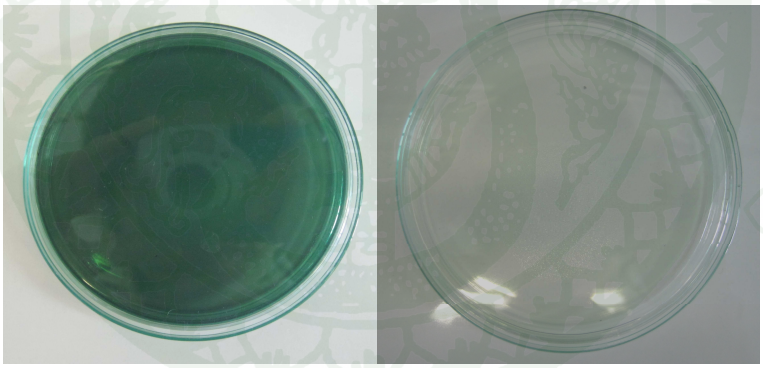
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 1 การศึกษาผลของแบคทีเรียกลุ่มสร้างสปอร์ต่ออัตรารอดและการเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไมในห้องปฏิบัติการ ณ ศูนย์วิจัยธุรกิจเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

ภาพที่ 2 การศึกษาผลของแบคทีเรียกลุ่มสร้างสปอร์ต่อปริมาณ *Vibrio* spp. และผลต่ออัตรารอด การเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไมในบ่อเลี้ยงกุ้ง ณ ฟาร์มเอกชน อำเภอนายายอาม จังหวัดจันทบุรี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 3 ผลิตภัณฑ์จุลิทรีย์ PondSafe



ภาพที่ 4 อาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar: Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar (ซ้าย) และอาหารเลี้ยงเชื้อ NA: Nutrient Agar (ขวา)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลและวิจารณ์ผล

1. ผลของแบคทีเรียกลุ่มสร้างสปอร์แต่ละชนิดต่อการยับยั้งเชื้อ *Vibrio harveyi*

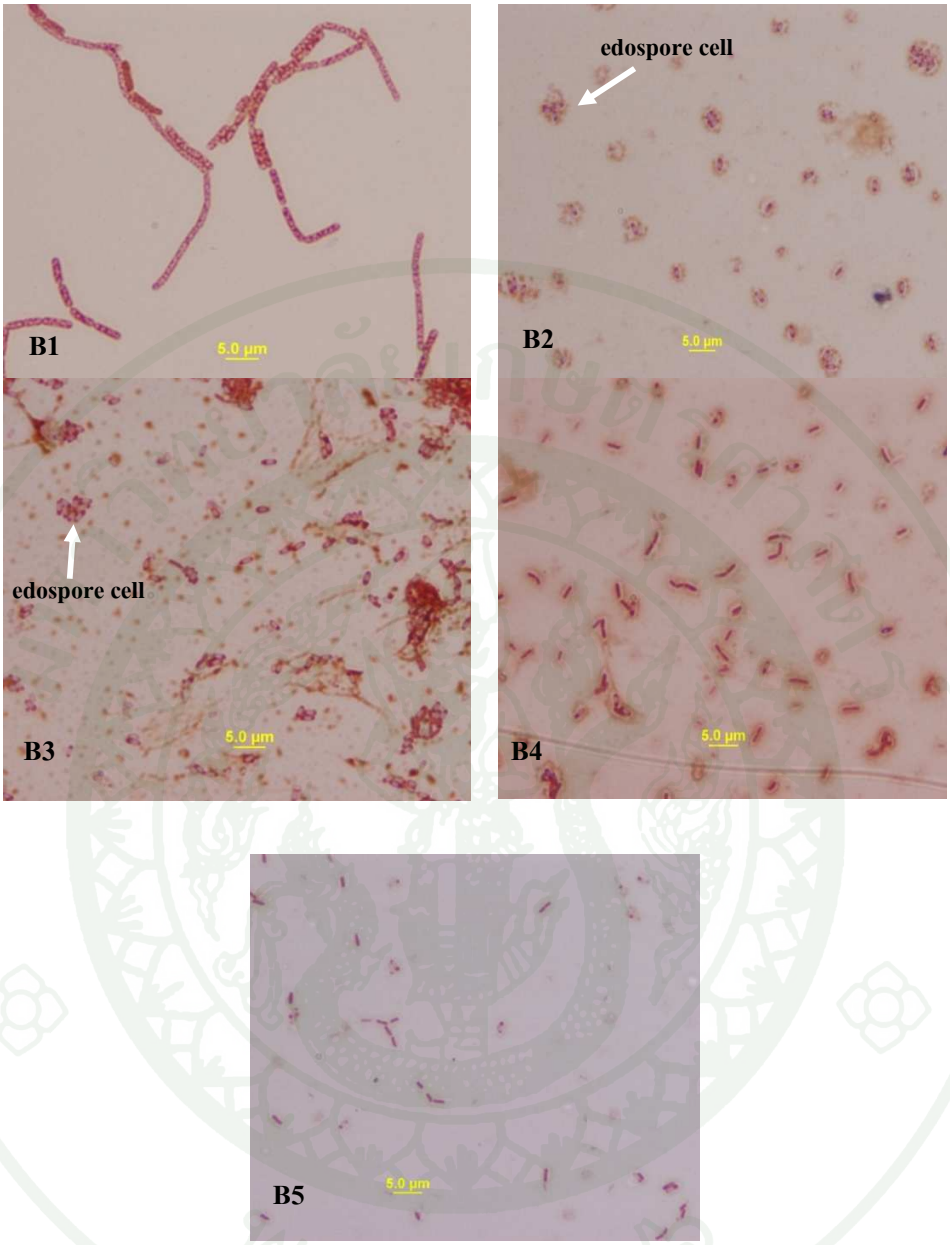
1.1 ตรวจสอบชนิดของแบคทีเรียที่สามารถสร้างสปอร์ได้ในผลิตภัณฑ์ PondSafe

จากตรวจสอบชนิดและปริมาณของแบคทีเรียที่สามารถสร้างสปอร์ได้ในผลิตภัณฑ์ PondSafe โดยใช้วิธีการเจือจางลำดับส่วนและ spread บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ที่เติมเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีจำนวนของแบคทีเรีย $14.33 \pm 3.78 \times 10^{10}$ CFU/กรัม ซึ่งอยู่ในระดับที่สูงมากเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณแบคทีเรียที่พบทั่วไปในผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกมักมีปริมาณใกล้เคียงกัน คือ 6.13×10^{2}- 8.57×10^{4} CFU/กรัม ซึ่งแตกต่างจากจากที่เขียนติดฉลากที่เขียนไว้ 10^{9}-10^{12} CFU/กรัม (สุบัณฑิตและวีรพงศ์, 2552) ซึ่งปริมาณแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีปริมาณที่ใกล้เคียงกับฉลาก ดังนั้นในการใช้โพรไบโอติกควรมีการทดลองก่อนใช้เพื่อป้องกันการสิ้นเปลืองต้นทุนโดยเฉพาะในการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมที่เป็นกุ้งที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ จากการตรวจสอบสามารถจำแนกความแตกต่างของโคโลนีได้ 5 ลักษณะ เมื่อนำแต่ละโคโลนีมาย้อมแกรม พบว่ามีแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ สามารถสร้างสปอร์ได้ (ภาพที่ 5) และเมื่อแยกชนิดแบคทีเรียโดยใช้ชุด API 50 CBH สามารถจำแนกได้ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แบคทีเรียที่สามารถจำแนกชนิดได้ในผลิตภัณฑ์ PondSafe โดยใช้ชุด API 50 CBH

แบคทีเรีย	สร้างสปอร์
Bacillus velezensis	√
B. amyloliquifaciens	√
B. subtilis	√
B. megaterium	√
Brevibacillus parabrevis	√

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 5 แบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ ที่พบในผลิตภัณฑ์ PondSafe ที่ศึกษาโดยการย้อมแกรม

B1: *Brevibacillus parabrevis*

B2: *Bacillus velezensis*

B3: *Bacillus amyloliquifaciens*

B4: *Bacillus subtilis*

B5: *Bacillus megaterium*

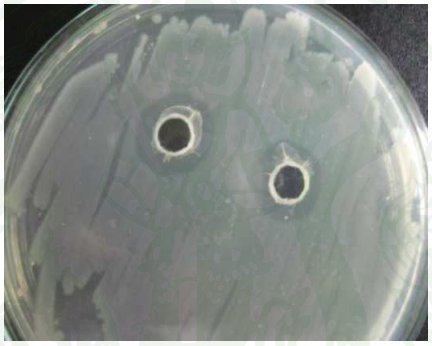
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.2 ผลของประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียสร้างสปอร์ต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* ในห้องปฏิบัติการ

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่สร้างสปอร์และแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* spp.ในการสร้างสารยับยั้งเชื้อก่อโรค *V. harvei* โดยวิธีการ cross streak (วัชริยา, 2549) เพื่อทดสอบคุณสมบัติของเชื้อ *Bacillus* sp. ว่ามีคุณสมบัติในการเกิด colonization หรือ inhibition ต่อเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* พบว่าหลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง *Bacillus* sp. แต่ละสายพันธุ์และการรวมกันทั้ง 5 สายพันธุ์ของแบคทีเรีย (*Brevibacillus parabrevis, Bacillus velezensis, B. amyloliquifaciens, B. subtilis, B. megaterium*) มีคุณสมบัติในการเกิดการยับยั้งของเชื้อ *V. harveyi* สังเกตได้จากการเกิดส่วนใสบริเวณที่เชื้อเจริญทับกัน โดยที่เชื้อในแต่ละสายพันธุ์มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อ *V. harveyi* แตกต่างกัน (ภาพที่ 6) ดังตารางที่ 5 และจากการเกิด inhibition effect แสดงให้เห็นว่าการรวมกันของแบคทีเรียกลุ่มสร้างสปอร์ (combination of spore forming bacteria) สามารถยับยั้งเชื้อ *V. harveyi* ได้สูงกว่า *Brevibacillus parabrevis* และ *Bacillus megaterium* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ทั้งนี้เนื่องจาก *Bacillus* spp. เป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ออกมาภายนอกเซลล์ได้เป็นจำนวนมากซึ่งสารดังกล่าวน่าจะเป็นสารในกลุ่ม antimicrobial (Moriarty, 1998) และในการศึกษาครั้งนี้พบว่า *Bacillus* sp. ทุกชนิดสามารถสร้างสาร antimicrobial ได้สูงสุดใน 48 ชั่วโมงซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Purivirojkul and Areechon (2007) ที่รายงานถึงการสร้างสาร antimicrobial ของ *Bacillus* spp. ซึ่งแยกชนิดได้จากลำไส้กุ้งกุลาดำที่สามารถยับยั้งเชื้อ *V. harveyi* ได้สูงสุดใน 48 ชั่วโมง เมื่อเทียบจากขนาดของ clear zone ที่เห็นส่วนใสของ *V. harveyi* ดังภาพที่ 7 โดยการทำ agar well diffusion (Lertcanawanichakul and Sawangnop, 2008)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 6 การเกิด inhibition effect ของการรวมกันของแบคทีเรียสร้างสปอร์ทั้ง 5 สายพันธุ์ (ซ้าย) และ *Brevibacillus parabrevis* (ขวา) ต่อเชื้อ *Vibrio harveyi*



ภาพที่ 7 การเกิด clear zone ของการรวมกันของแบคทีเรียสร้างสปอร์ทั้ง 5 สายพันธุ์ ต่อเชื้อ *Vibrio harveyi*

ขนาดของ clear zone ที่เกิดจากการยับยั้งโดยแบคทีเรียสร้างสปอร์ พบว่าแบคทีเรียสร้างสปอร์แต่ละสายพันธุ์ที่แยกชนิดได้และการรวมกันทั้ง 5 สายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *V. harveyi* ได้สูงสุดใน 48 ชั่วโมง ซึ่งการรวมกันของแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์นั้นมีขนาดของวง clear zone กว้างที่สุดคือ 13.00 ± 1.84 มิลลิเมตรและกว้างกว่า *Bacillus megaterium* และ *Brevibacillus parabrevis* และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังที่แสดงในตารางที่ 3 ซึ่งแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* ในกลุ่มนี้สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อจุลชีพได้ โดยแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มแรกคือ Cyclic oligopeptides เช่น Bacitracin มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ในแบคทีเรียแกรมบวก กลุ่มที่สองคือ Linear or Cyclic oligopeptides เช่น Tyrothricin, Gramicidins มีฤทธิ์รบกวนการทำหน้าที่ของ cell membrane ในแบคทีเรียแกรมบวก และ Polymixins มีฤทธิ์รบกวนการทำหน้าที่ของ cell membrane

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ในแบคทีเรียแกรมลบ กลุ่มที่สาม คือ Basic peptides เช่น Ediens ซึ่งจะไปยับยั้งการรวมกันของ small ribosome subunit ในแบคทีเรียแกรมลบ และกลุ่มสุดท้ายคือ Aminoglycoside antibiotic ซึ่งมีผลต่อการทำงานของไรโบโซม แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สามารถผลิตสาร antibiotic ได้ คือ bacitracins สารพวกนี้จะมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง peptidoglycan ซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ของแบคทีเรียอื่นได้ (สายสมร, 2524; Colin, 1989) และมีการศึกษาสาร extra-cellular metabolite พบว่า *B. amyloliquefaciens* และ *B. subtilis* สามารถสร้างสารในกลุ่ม cyclic-antibiotic ที่เป็น Iturin A ซึ่งเป็นสารโพลีเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อรา (Antifungal Agent) นอกจากนี้ *B. amyloliquefaciens* ยังผลิตเอ็นไซม์อีกหลายชนิด เช่น ไลเปส (Lipase), อะไมเลส (Amylase), ซูเครส (Sucrase), โปรติเอส (Protease) และ เปปติเดส (Peptidase) เป็นต้น (Arguelles-Arias *et al*., 2009) ซึ่งเอนไซม์ที่หลั่งออกมาเหล่านี้สามารถยับยั้งแบคทีเรียในกลุ่มแกรมลบได้ และขนาด clear zone ของการรวมกันของแบคทีเรียสร้างสปอร์ทั้ง 5 สายพันธุ์มีขนาดของส่วนใสที่กว้างกว่าขนาด clear zone ของแบคทีเรียสร้างสปอร์แต่ละสายพันธุ์ที่เป็นชนิดเดียว เพราะเอนไซม์แบคทีเรียสร้างสปอร์ทั้ง 5 สายพันธุ์ที่หลั่งออกมามีหลายชนิดจึงทำให้มีการยับยั้งการเจริญของ *V. harveyi* ได้มากกว่าที่เป็นสายพันธุ์เดียว

ตารางที่ 5 ขนาดของ clear zone ของการรวมกันของแบคทีเรียสร้างสปอร์, *Brevibacillus parabrevis, Bacillus velezensis*, *Bacillus amyloliquifaciens*, *Bacillus subtilis* และ *Bacillus megaterium* ต่อการยับยั้งเชื้อ *Vibrio harveyi* ที่ 48 ชั่วโมง

แบคทีเรีย	**ขนาดของ clear zone (มิลลิเมตร) ที่ 48 ชั่วโมง**
การรวมกันของแบคทีเรียสร้างสปอร์	13.00 ± 1.84^{a}
Bacillus subtilis	13.00 ± 0.00^{a}
Bacillus amyloliquifaciens	12.80 ± 0.71^{a}
Bacillus velezensis	11.15 ± 0.21^{ab}
Bacillus megaterium	10.35 ± 0.49^{b}
Brevibacillus parabrevis	9.65 ± 0.49^{b}

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานในแนวตั้งที่กำหนดด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p< 0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.3 การทดสอบความสามารถในการแข่งขันการใช้สารอาหารในการเจริญร่วมกันของเชื้อโพรไบโอติกและเชื้อ *V. harveyi* (broth co-culture assay)

การเจริญของเชื้อ *V. harveyi* พบว่ามีการเจริญสูงสุดที่ 24 ชั่วโมงทั้งในกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงเดี่ยวและกลุ่มที่เลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียกลุ่มที่สร้างสปอร์แต่ละชนิดและการรวมกันของแบคทีเรียสร้างสปอร์ พบว่า *V. harveyi* ในกลุ่มควบคุมเพิ่มจาก $1.50 \pm 0.02\times10^{6}$ CFU/มิลลิลิตร เป็น$1.77 \pm 0.002\times10^{8}$ CFU/มิลลิลิตร แต่การเพิ่มขึ้นของ *V. harveyi* ในกลุ่มทดลองนั้นอยู่ในระดับที่ต่ำกว่าในกลุ่มควบคุม คือ เพิ่มจาก 10^{6} CFU/มิลลิลิตร เป็น 10^{7} CFU/มิลลิลิตรดังที่แสดงในตารางที่ 6 และเมื่อเวลาผ่านไป 120 ชั่วโมง พบว่า *V. harveyi* ที่เลี้ยงร่วมกับการรวมกันของแบคทีเรียสร้างสปอร์ (VP) นั้นการเจริญของเชื้อ *V. harveyi* ลดลงมากที่สุดโดยนับปริมาณเชื้อเฉลี่ยได้เท่ากับ $3.33 \pm 0.16\times10^{2}$ CFU/มิลลิลิตร (ตารางที่ 6, ภาพที่ 8) และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเทียบกับ *V. harveyi* ในกลุ่มควบคุมที่มีการเจริญเท่ากับ $211.11 \pm 1.53\times10^{2}$ CFU/มิลลิลิตร หรือลดลง 98.42 % และเชื้อ *V. harveyi* ที่เลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียสร้างสปอร์แต่ละชนิดที่มีการเจริญลดลงรองลงมา คือ *Bacillus velezensis , B. amyloliquifaciens, B. subtilis, B. megateriumc* และ *Brevibacillus parabrevis* มีปริมาณเฉลี่ยเท่ากับ $26.66 \pm 1.03\times10^{2}$ CFU/มิลลิลิตร (ตารางที่ 6, ภาพที่ 9), $28.33 \times 1.16\text{x}10^{2}$ CFU/มิลลิลิตร (ตารางที่ 6, ภาพที่ 10), $30.00 \pm 1.41\times10^{2}$ CFU/มิลลิลิตร (ตารางที่ 6, ภาพที่ 11), $58.33 \pm 2.13\times10^{2}$ CFU/มิลลิลิตร (ตารางที่ 6, ภาพที่ 12) และ $60.00 \pm 1.41\times10^{2}$ CFU/มิลลิลิตร (ตารางที่ 6, ภาพที่ 13) ตามลำดับและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเทียบกับ *V. harveyi* ในกลุ่มควบคุม หรือลดลง 87.58, 86.58, 85.79, 72.37, 71.58 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 7) การลดลงของเชื้อ *V. harveyi* ในการเลี้ยงร่วมกันกับแบคทีเรียสร้างสปอร์แต่ละชนิดและการรวมกันของแบคทีเรียสร้างสปอร์ (*Brevibacillus parabrevis, B. velezensis*, *B. amyloliquifaciens*, *B. subtilis*, *B. megaterium*) อาจเป็นผลเนื่องมาจากกลไกการทำลายแบคทีเรียก่อโรค โดยการแย่งสารอาหารและหลั่งเอนไซม์ที่สามารถย่อยเมือกที่ล้อมรอบเซลล์แบคทีเรียแกรมลบที่ก่อโรคได้ ทำให้สารปฏิชีวนะที่แบคทีเรียสร้างสปอร์แต่ละชนิดที่แยกได้และการรวมกันทั้ง 5 สายพันธุ์สร้างขึ้นสามารถเข้าทำลายองค์ประกอบของเซลล์ทำให้แบคทีเรียก่อโรคหยุดการเจริญหรือถูกทำลายในที่สุด (Moriarty, 1998) จากการศึกษาของ Maketon and Masawhang (2000) พบว่า *Bacillus subtilis* AM-01, *B. licheniformis* AM-04 และ *Nitrosomonas* sp. AM-11 ที่สามารถยับยั้งการการเจริญของ *V. harveyi* ได้ดี นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Purivirojkul and Areechon (2007) ที่พบว่า *Bacillus* WL01 และ *Bacillus* W1106 สามารถยับยั้งการเจริญของ *V. harveyi* ได้ใน 48 ชั่วโมง จาก 4.70×10^{6} CFU/มิลลิลิตร ในกลุ่มควบคุม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ลดลงเหลือ 2.87×10^{6} และ2.93×10^{6} ตามลำดับ และเมื่อเวลาผ่านไป 120 ชั่วโมง เชื้อ *V. harveyi* ลดลงจาก 4.10×10^{5} CFU/มิลลิลิตร ในกลุ่มควบคุม อยู่ที่ 2.17×10^{4}และ 3.00×10^{4} CFU/มิลลิลิตร ซึ่งแบคทีเรีย *Bacillus* สามารถผลิตสารยับยั้ง สารแอนติไบโอติกหรือเอนไซม์ สำหรับยับยั้งหรือย่อยผนังเซลล์แบคทีเรียก่อโรคที่เป็นคุณสมบัติของแบคทีเรียโพรไบโอติก (Williams and Vicker, 1986; Bruno and Montiville, 1993)

ส่วนการเจริญของแบคทีเรียสร้างสปอร์ที่เลี้ยงร่วมกับเชื้อ *V. harveyi* พบว่าแบคทีเรียสร้างสปอร์แต่ละชนิดและการรวมกันของแบคทีเรียสร้างสปอร์เจริญสูงสุดใน 48 ชั่วโมง จาก 10^{6} CFU/มิลลิลิตร เป็น 10^{8} CFU/มิลลิลิตร (ตารางที่ 8) และเมื่อเวลาผ่านไป 120 ชั่วโมง การเจริญของแบคทีเรียสร้างสปอร์แต่ละชนิดและการรวมกันของแบคทีเรียสร้างสปอร์เมื่อเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *V. harveyi* ยังมีการเจริญอยู่ที่ 10^{7} CFU/มิลลิลิตร (ตารางที่ 8, ภาพที่ 8-13) ซึ่งมีการเจริญใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมที่ทำการเลี้ยงเดี่ยวเมื่อทำการนับปริมาณเฉลี่ย เท่ากับ 10^{7} CFU/มิลลิลิตร (ตารางที่ 9, ภาพที่ 8-13) เนื่องมาจากส่วนใหญ่ *Bacillus* spp. เป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างสปอร์ได้เมื่อทำการเลี้ยงร่วมกับ *V. harveyi* ซึ่งในระยะเวลา 120 ชั่วโมง อาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียอาจจะหมดไปแล้วแต่เนื่องจากมีสปอร์บางส่วนของ *Bacillus* sp. ที่ยังไม่เจริญออกจากสปอร์ เมื่อทำการนับจำนวนเซลล์ ด้วยการ spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar ที่เติมเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ทำให้สปอร์เหล่านี้จะเจริญออกจากสปอร์ได้เพราะได้รับอาหารจากการทำ spread plate จึงมีผลให้ปริมาณของเชื้อ *Bacillus* sp. ลดลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้นเมื่อเทียบกับปริมาณเริ่มต้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 6 ปริมาณของเชื้อ *Vibrio harveyi* (V) เมื่อเลี้ยงเดี่ยวและเลี้ยงร่วมกับ*Brevibacillus parabrevis* (B1)*, Bacillus velezensis* (B2), *Bacillus amyloliquifaciens* (B3), *Bacillus subtilis* (B4), *Bacillus megaterium* (B5) และการรวมกันของแบคทีเรียกลุ่มสร้างสปอร์ (P) (CFU/มิลลิลิตร)

แบคทีเรีย/ เวลา (ชั่วโมง)	ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($\times10^6$ CFU/มิลลิลิตร)					
	0 $\times10^6$	24 $\times10^6$	48$\times10^6$	72$\times10^6$	96$\times10^6$	120$\times10^2$
V	1.50±0.02^{a}	177.22±0.002^{d}	8.10±0.95^{c}	3.32±0.20^{a}	42.20±2.57^{b}	21.11±153.00^{b}
VB1	1.75±0.79^{ab}	576.66±0.16^{b}	5.40±1.14^{c}	4.68±0.73^{b}	6.66±1.03^{a}	60.00±14.1^{a}
VB2	1.90±0.49^{ab}	514.00±0.17^{b}	4.60±1.04^{c}	3.20±0.92^{a}	3.53±1.51^{a}	26.66±10.3^{a}
VB3	1.50±0.24^{a}	636.00±0.05^{b}	5.06±1.07^{bc}	2.31±0.75^{a}	2.16±1.16^{a}	28.33±11.6^{a}
VB4	2.92±0.12^{bc}	945.33±0.38^{c}	2.05±1.22^{a}	2.76±1.24^{a}	7.00±1.41^{a}	30.00±14.1^{a}
VB5	3.72±2.18^{c}	464.00±0.15^{b}	3.90±1.07^{b}	2.45±1.36^{a}	8.66±1.03^{a}	58.33±21.3^{a}
VP	1.51±0.08^{a}	150.46±0.05^{a}	1.86±0.56^{a}	2.15±1.04^{a}	1.50±0.54^{a}	3.33±0.16^{a}

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานในแนวตั้งที่กำหนดด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p< 0.05$)

: V = *V. harveyi* ที่เลี้ยงเดี่ยวเป็นกลุ่มควบคุม

: VB1 = *V. harveyi* ที่เลี้ยงร่วมกับ *Brevibacillus parabrevis*

: VB2 = *V. harveyi* ที่เลี้ยงร่วมกับ *Bacillus velezensis*

: VB3 = *V. harveyi* ที่เลี้ยงร่วมกับ *B. amyloliquifaciens*

: VB4 = *V. harveyi* ที่เลี้ยงร่วมกับ *B. subtilis*

: VB5 = *V. harveyi* ที่เลี้ยงร่วมกับ *B. megaterium*

: VP = *V. harveyi* ที่เลี้ยงร่วมกับการรวมกันของแบคทีเรียสร้างสปอร์ทั้ง 5 ชนิด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 7 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อ *Vibrio harveyi* ที่ลดลง เมื่อเลี้ยงร่วมกับ *Brevibacillus parabrevis, Bacillus velezensis*, *Bacillus amyloliquifaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* และการรวมกันของแบคทีเรียสร้างสปอร์

แบคทีเรีย/ เวลา (ชั่วโมง)	0	24	48	72	96	120
V. harveyi (control)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Brevibacillus parabrevis	16.78	-67.46	-33.33	40.88	-84.21	-71.58
Bacillus velezensis	26.67	-71.00	-38.27	-3.74	-91.71	-87.37
B. amyloliquifaciens	0.33	-64.11	-37.45	-30.31	-94.87	-86.58
B. subtilis	94.67	-46.66	-74.69	-16.78	-83.42	-85.79
B. megaterium	148.00	-73.82	-51.85	-26.33	-79.47	-72.37
การรวมกันของแบคทีเรียสร้างสปอร์	1.00	-91.51	-76.95	-35.33	-96.45	-98.42

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 8 ปริมาณของเชื้อ *Brevibacillus parabrevis* (B1), *Bacillus velezensis* (B2), *Bacillus amyloliquifaciens* (B3), *Bacillus subtilis* (B4), *Bacillus megaterium* (B5) และการรวมกันของแบคทีเรียสร้างสปอร์ (P) เมื่อเลี้ยงร่วมกับ *Vibrio harveyi* (V) (CFU/มิลลิลิตร)

แบคทีเรีย/เวลา (ชั่วโมง)	ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($\times 10^6$ CFU/มิลลิลิตร)					
	0	24	48	72	96	120
B1V	6.19±5.36^{a}	10.30±5.30^{abc}	649.60±223.00^{a}	62.85±5.80^{a}	24.80±9.80^{a}	13.70±2.80^{b}
B2V	11.00±0.81^{c}	56.80±2.20^{bcd}	481.66±148.00^{a}	38.45±7.50^{a}	20.10±4.70^{c}	15.30±2.70^{b}
B3V	7.21±1.94^{b}	72.40±12.60^{a}	911.60±210.00^{b}	32.00±4.10^{c}	22.20±1.40^{bc}	15.70±3.40^{b}
B4V	10.60±0.92^{c}	86.40±50.80^{cd}	774.61±247.00^{b}	26.85±2.20^{b}	23.90±8.20^{a}	12.50±2.90^{b}
B5V	6.61±4.18^{a}	78.20±57.00^{ab}	754.43±40.00^{a}	26.82±3.50^{d}	20.40±4.00^{ab}	13.40±2.40^{b}
PV	13.46±0.29^{a}	107.00±22.30^{d}	120.81±29.00^{a}	32.06±5.90^{b}	20.90±6.20^{ab}	11.60±4.50^{a}

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานในแนวตั้งที่กำหนดด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

: B1V = *Brevibacillus parabrevis* ที่เลี้ยงร่วมกับ *V. harveyi*

: B2V = *Bacillus velezensis* ที่เลี้ยงร่วมกับ *V. harveyi*

: B3V = *B. amyloliquifaciens* ที่เลี้ยงร่วมกับ *V. harveyi*

: B4V = *B. subtilis* ที่เลี้ยงร่วมกับ *V. harveyi*

: B5V = *B. megaterium* ที่เลี้ยงร่วมกับ *V. harveyi*

: PV = การรวมกันของแบคทีเรียสร้างสปอร์ทั้ง 5 ชนิดที่เลี้ยงร่วมกับ *V. harveyi*

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 9 ปริมาณของเชื้อ *Brevibacillus parabrevis* (B1), *Bacillus velezensis* (B2), *Bacillus amyloliquifaciens* (B3), *Bacillus subtilis* (B4), *Bacillus megaterium* (B5) และการรวมกันของแบคทีเรียสร้างสปอร์ (P) เมื่อเลี้ยงเดี่ยวเป็นกลุ่มควบคุม (CFU/มิลลิลิตร)

แบคทีเรีย/	ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (× 10^7 CFU/มิลลิลิตร)					
เวลา (ชั่วโมง)	0	24	48	72	96	120
B1	0.18±0.04^{a}	21.25±8.01^{a}	13.09±2.94^{ab}	1.52±0.57^{b}	1.35±0.27^{a}	1.46±0.32^{a}
B2	3.09±1.67^{a}	24.12±7.05^{a}	11.61±2.56^{a}	2.01±0.70^{a}	2.18±0.71^{a}	1.34±0.19^{a}
B3	1.83±0.96^{a}	15.96±7.92^{a}	21.87±8.15^{c}	5.78±2.03^{a}	1.95±0.57^{a}	1.51±0.19^{a}
B4	3.24±1.38^{a}	27.20±4.15^{a}	22.59±3.97^{bc}	3.05±0.51^{a}	1.31±0.09^{a}	1.39±0.16^{a}
B5	0.19±0.07^{a}	18.12±4.50^{a}	10.92±3.98^{bc}	6.90±0.58^{a}	1.63±0.23^{a}	1.59±0.20^{a}
P	0.50±0.13^{a}	29.64±4.56^{a}	10.17±2.20^{d}	3.40±0.26^{a}	1.67±0.53^{a}	1.02±0.44^{a}

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานในแนวตั้งที่กำหนดด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p< 0.05$)

: B1V = *Brevibacillus parabrevis* ที่เลี้ยงเดี่ยว

: B2V = *Bacillus velezensis* ที่เลี้ยงเดี่ยว

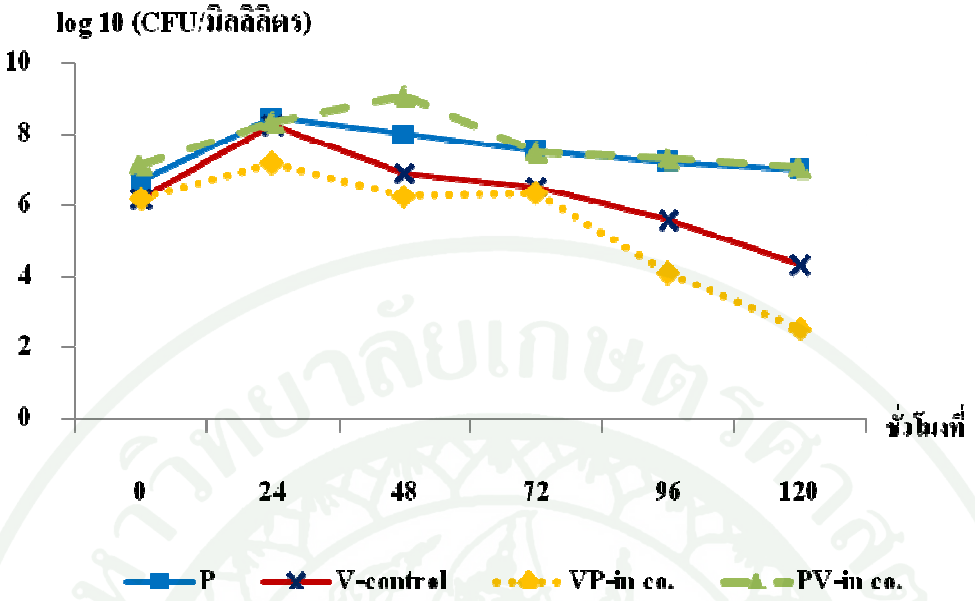
: B3V = *B. amyloliquifaciens* ที่เลี้ยงเดี่ยว

: B4V = *B. subtilis* ที่เลี้ยงเดี่ยว

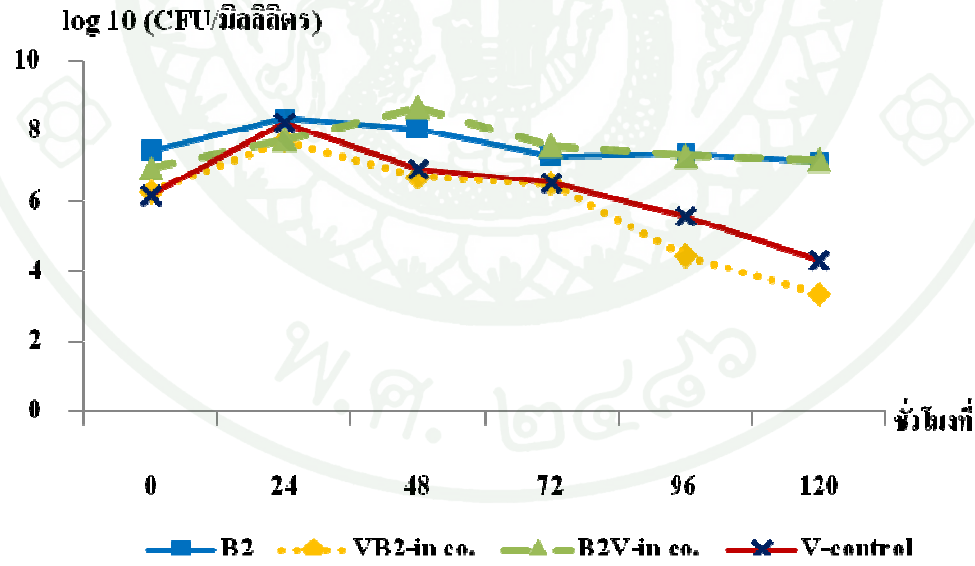
: B5V = *B. megaterium* ที่เลี้ยงเดี่ยว

: PV = การรวมกันของแบคทีเรียสร้างสปอร์ทั้ง 5 ชนิดที่เลี้ยงเดี่ยว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

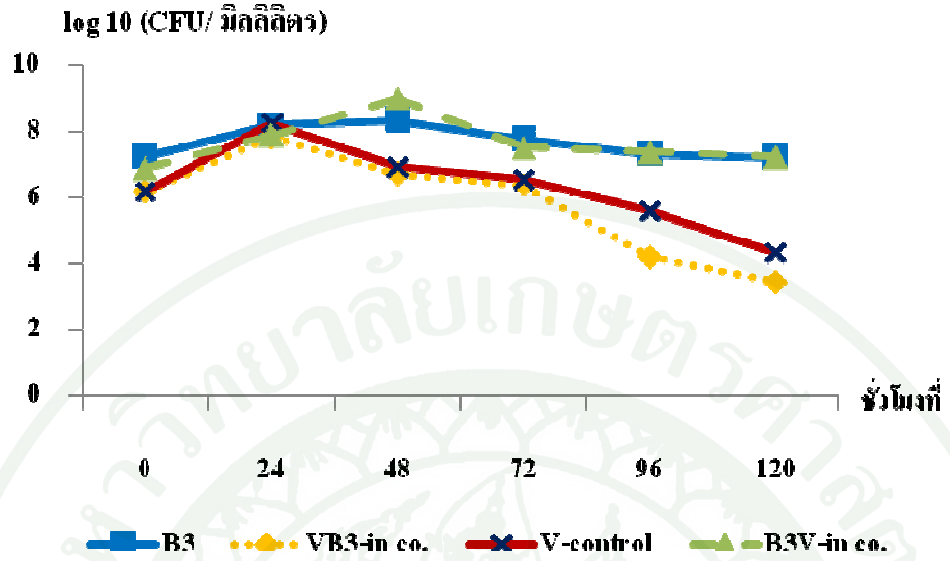


ภาพที่ 8 ปริมาณของการรวมกันของแบคทีเรียสร้างสปอร์ และ *Vibrio harveyi* (CFU/มิลลิลิตร) ในการเลี้ยงเดี่ยวและเลี้ยงร่วมกันที่ระยะเวลา 0, 24, 48, 72, 96, 120 ชั่วโมง

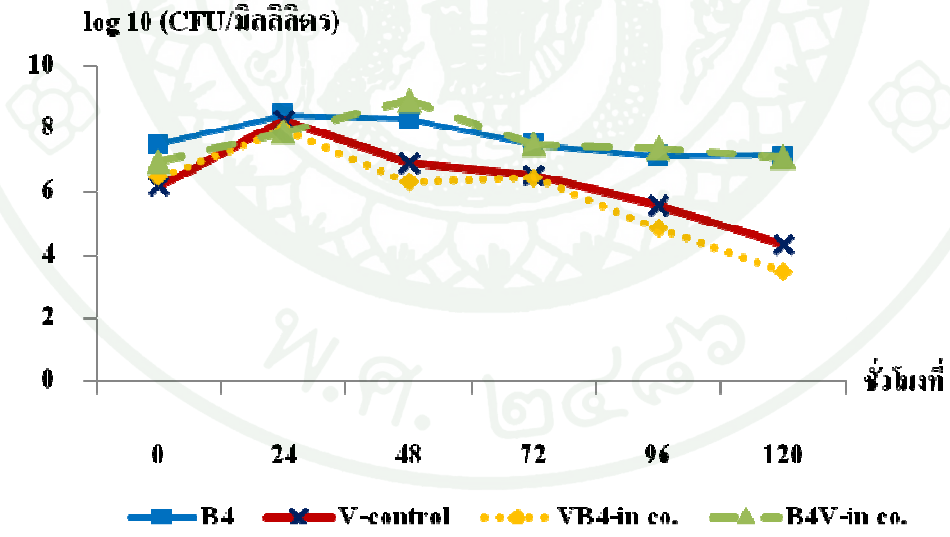


ภาพที่ 9 ปริมาณเชื้อ *Bacillus velezensis* และ *Vibrio harveyi* (CFU/มิลลิลิตร) ในการเลี้ยงเดี่ยวและเลี้ยงร่วมกันที่ระยะเวลา 0, 24, 48, 72, 96, 120 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

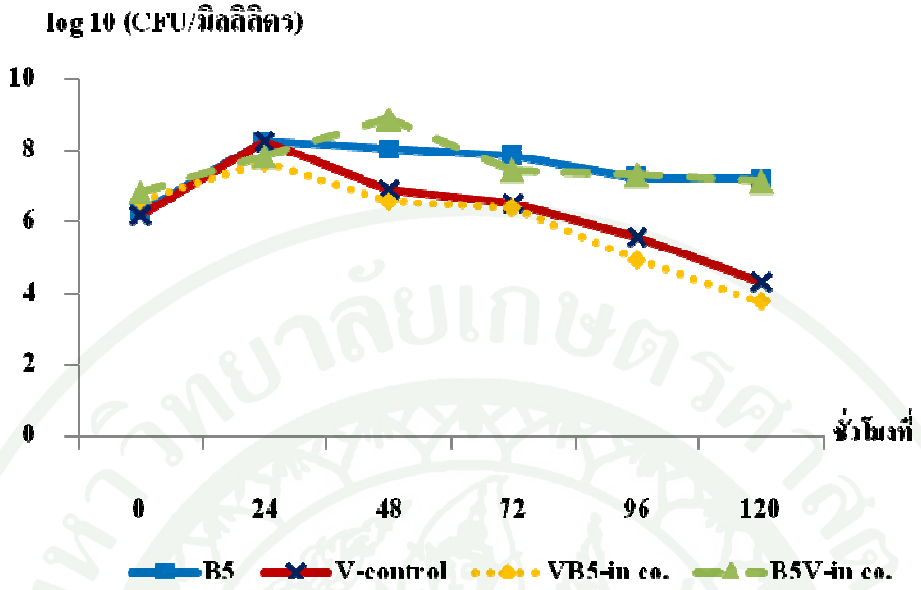


ภาพที่ 10 ปริมาณเชื้อ *Bacillus amyloliquifaciens* และ *Vibrio harveyi* (CFU/มิลลิลิตร) ในการเลี้ยงเดี่ยวและเลี้ยงร่วมกันที่ระยะเวลา 0, 24, 48, 72, 96, 120 ชั่วโมง

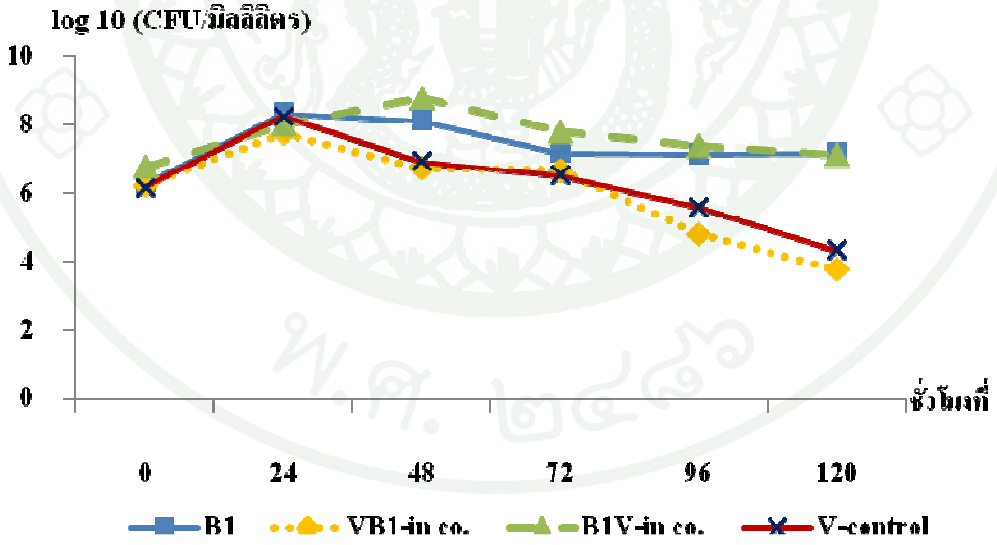


ภาพที่ 11 ปริมาณเชื้อ *Bacillus subtilis* และ *Vibrio harveyi* (CFU/มิลลิลิตร) ในการเลี้ยงเดี่ยวและเลี้ยงร่วมกันที่ระยะเวลา 0, 24, 48, 72, 96, 120 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 12 ปริมาณเชื้อ *Bacillus megaterium* และ *Vibrio harveyi* (CFU/มิลลิลิตร) ในการเลี้ยงเดี่ยวและเลี้ยงร่วมกันที่ระยะเวลา 0, 24, 48, 72, 96, 120 ชั่วโมง



ภาพที่ 13 ปริมาณเชื้อ *Brevibacillus parabrevis* และ *Vibrio harveyi* (CFU/มิลลิลิตร) ในการเลี้ยงเดี่ยวและเลี้ยงร่วมกันที่ระยะเวลา 0, 24, 48, 72, 96, 120 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. ผลของแบคทีเรียในกลุ่มสร้างสปอร์ต่ออัตรารอดและการเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไมในห้องปฏิบัติการ

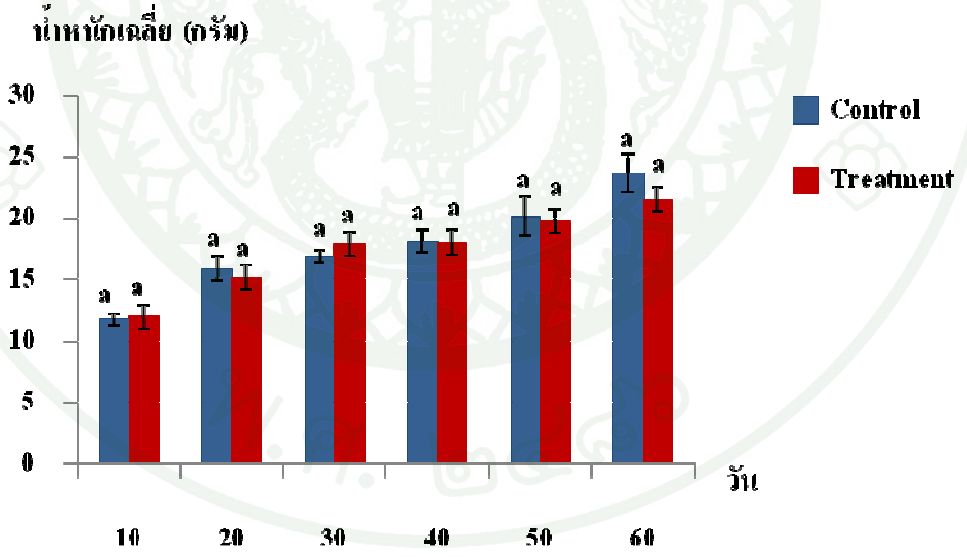
ผลของการศึกษาอัตรารอดตายและการเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไมระหว่างกลุ่มที่ใช้แบคทีเรียกลุ่มสร้างสปอร์ และกลุ่มที่ไม่ให้แบคทีเรียกลุ่มสร้างสปอร์ระหว่างการเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ พบว่าหลังจากเลี้ยงกุ้งจนครบ 60 วัน กุ้งในกลุ่มควบคุมมีน้ำหนักเฉลี่ย 23.70 ± 1.57 กรัม และไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) กับกุ้งในกลุ่มทดลองที่ให้แบคทีเรียกลุ่มสร้างสปอร์ผสมอาหารมีน้ำหนักเฉลี่ย 21.55 ± 1.98 กรัม (ภาพที่ 14) แต่เมื่อพิจารณาถึงอัตรารอดตายพบว่ากุ้งในกลุ่มทดลองมีอัตรารอดตายสูงกว่าในกลุ่มควบคุมและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (ตารางที่ 10, ภาพที่ 15) และเมื่อนำอัตรารอดตายมาคำนวณค่าผลผลิตรวมพบว่าในกลุ่มทดลองมีค่าเท่ากับ 1615.33 ± 137.85 กรัม ซึ่งสูงกว่าในกลุ่มควบคุมที่มีค่าเท่ากับ 1500 ± 109.79 กรัม ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Moriarty (1999) ที่รายงานถึงผลของการใช้ *Bacillus* spp. เป็นโพรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งเพื่อควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อ *Vibrio* spp. จำนวน 6 บ่อในฟาร์มเลี้ยงกุ้งประเทศฟิลิปปินส์ พบว่าอัตรารอดตายทั้ง 2 รอบการเลี้ยงที่ทำการศึกษานั้นกลุ่มทดลองมีอัตรารอดตายสูงกว่ากลุ่มควบคุม (73-100%, 67-91% ตามลำดับ) และในกลุ่มทดลองมีค่า ผลผลิตรวมสูงกว่าในกลุ่มทดลอง (5-8.6 และ 5-6.8 ตันต่อเฮกแตร์ตามลำดับ) อัตรารอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมในกลุ่มทดลองสูงกว่าในกลุ่มควบคุมนั้นอาจสืบเนื่องมาจากแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* spp. โดยส่วนใหญ่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค (*Vibrio* spp.) (Moriarty, 1999; Purivirojkul *et al*., 2006; Purivirojkul and Areechon, 2007; Decamp *et al*., 2008) โดยแบคทีเรียสามารถเข้าสู่ทางเดินอาหารของสัตว์น้ำได้ทางปากและการกินอาหาร จากนั้นจะถูกกำจัดออกด้วยระบบภูมิคุ้มกันและทางอุจจาระ ซึ่งแบคทีเรียจะเจริญในท่อทางเดินอาหารของกุ้ง โดยการเข้าแทนที่อยู่ในท่อทางเดินอาหารเมื่อกุ้งไม่ได้รับโพรไบโอติกจะทำให้ปริมาณของแบคทีเรียโพรไบโอติกมีแนวโน้มลดลงตามระยะเวลา (Fuller, 1992) Conway (1996) รายงานว่าแบคทีเรียที่เจริญในทางเดินอาหารสัตว์ได้นั้นเพราะแบคทีเรียชนิดนั้นสามารถยึดเกาะบริเวณจำเพาะในทางเดินอาหารได้เป็นระยะเวลานานและมีอัตราการแบ่งเซลล์สูงกว่าอัตราการกำจัดออกจากร่างกายของสัตว์น้ำ เช่น การเติม *Bacillus* spp. ลงไปในน้ำเลี้ยงกุ้งเป็นระยะเวลา 20 วัน ทำให้ ปริมาณ *Bacillus* spp. ในตับกุ้งมีมากถึง 50 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่พบในตับ โดยเข้าไปแทนที่ *Vibrio* spp. ที่เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในตับกุ้ง (Gullian and Rodriguez, 2002)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 10 อัตรารอดและผลผลิตทั้งหมดของกุ้งขาวแวนนาไมในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองหลังระยะเวลาการเลี้ยงนาน 60 วัน

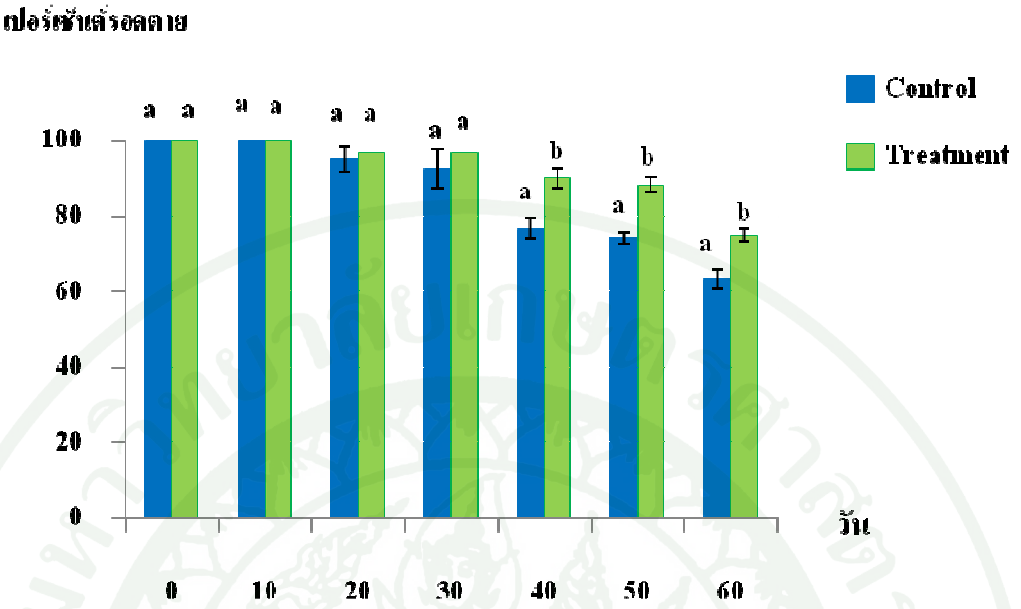
ถัง	กลุ่มควบคุม (%)	กลุ่มทดลอง (%)
1	60	76.62
2	63.33	73.33
3	66.67	76.33
4	63.33	73.33
ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	63.33 ± 2.72[a]	75.00 ± 1.92[b]

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานในแนวตั้งที่กำหนดด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



ภาพที่ 14 น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาวในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองตลอดระยะเวลาการเลี้ยง 60 วัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 15 อัตรารอดของกุ้งขาวที่เลี้ยงในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองตลอดระยะเวลาการเลี้ยง 60 วัน

ผลการทดสอบปริมาณแบคทีเรียรวมในลำไส้กุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน ของกลุ่มทดลองเท่ากับ $16.11 \pm 2.03 \times 10^5$ CFU/g และไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) กับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการให้โพรไบโอติกผสมอาหารตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเท่ากับ $18.80 \pm 1.40 \times 10^5$ CFU/g และ ในกลุ่มทดลองไม่พบเชื้อ *Vibrio* spp. ในลำไส้กุ้งขาวแวนนาไม แต่พบเชื้อ *Vibrio* spp. ในกลุ่มควบคุมมีปริมาณที่ $1.2 \pm 0.2 \times 10^5$ CFU/g (ตารางที่ 11) ซึ่งโพรไบโอติกส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียที่เข้ายึดเกาะทางเดินอาหารโดยเข้าจับที่บริเวณจำเพาะที่เยื่อเมือกบุผิวของท่อทางเดินอาหาร และแบคทีเรียก่อโรคก็มีกลไกเช่นเดียวกัน ซึ่งการมีอยู่ของแบคทีเรียเหล่านี้จะส่งผลต่อผู้ถูกอาศัยหรือสัตว์น้ำ คือ การแย่งอาหารและรุกรานเซลล์ในร่างกายของสัตว์น้ำ ทั้งในโพรไบโอติกและแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารจึงมีกลไกในการป้องกันตนเองจากการถูกกำจัดด้วยระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำ (Westerdahl *et al*., 1991) เพื่อให้สามารถอยู่รอดและเพิ่มจำนวนได้ในระบบทางเดินอาหาร ด้วยสาเหตุนี้โพรไบโอติกที่ดีต้องสามารถแข่งขันเพื่อการเกาะติดบนเยื่อบุผิวและทำหน้าที่ป้องกันผู้ถูกอาศัยโดยการลดความเป็นกรดด่างในระบบลำไส้ (Chadwick *et al*., 2003) รวมถึงการผลิตเอนไซม์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สำหรับย่อยบางชนิด เช่น ไลโซไซม์ (Dopazo *et al*., 1988; Gram *et al*., 1999; Chythanya *et al*., 2002; Sugita *et al*., 2002; Gullian *et al*., 2004)

ผลิตวิตามิน และผลิตสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ เช่น กรดอินทรีย์ สารแบคเทอริโอซิน ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไดอะซิติล อะเซตตอลดีไฮด์ ระบบแลคโตเปอร์ออกซิเดส แลคโตน หรือการทำปฏิกิริยาโดยตรงกับเชื้อก่อโรค จึงทำให้สามารถควบคุมแบคทีเรียก่อโรคได้

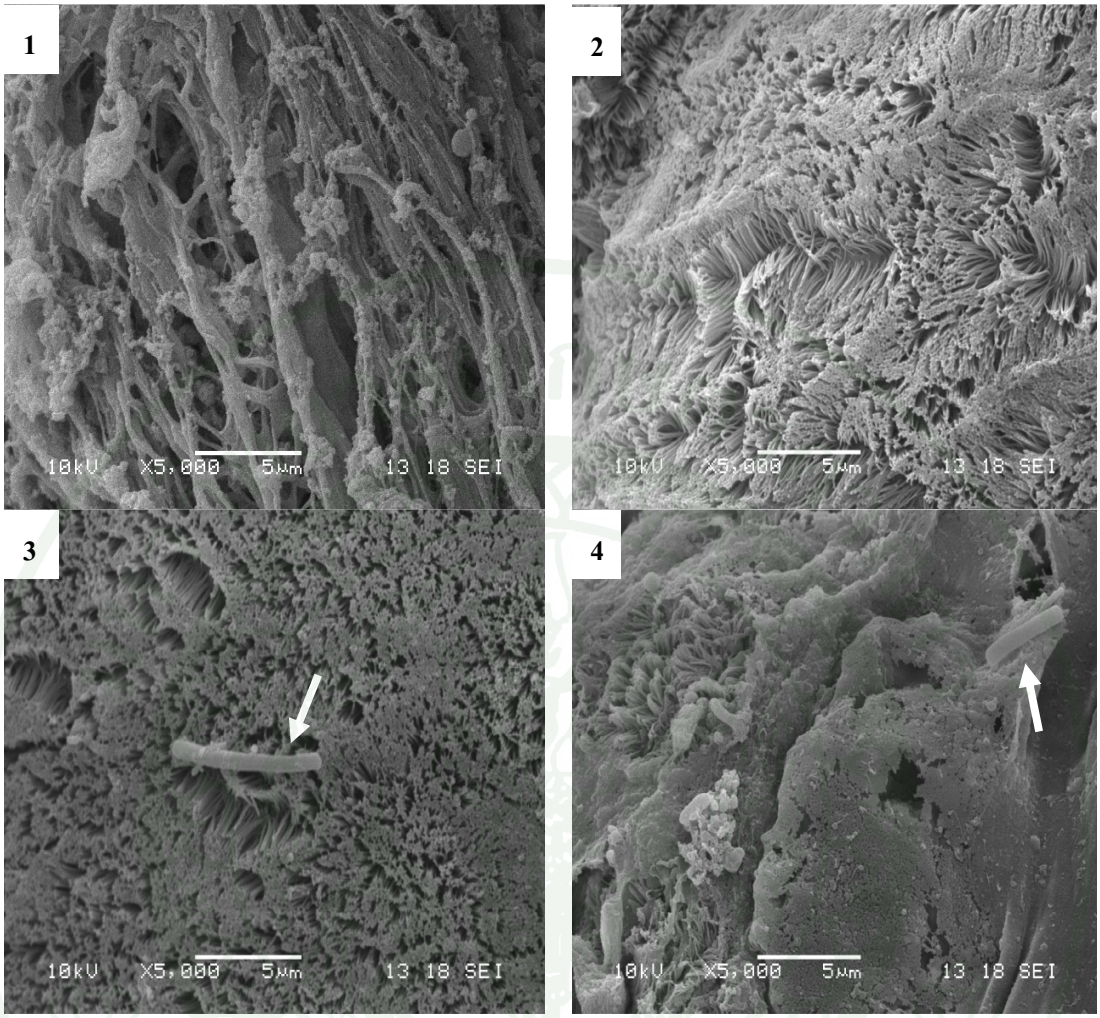
ผลการศึกษาลำไส้กุ้งหลังเสร็จสิ้นการเลี้ยงในห้องปฏิบัติการไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope: SEM) ในกลุ่มควบคุมไม่พบเชื้อแบคทีเรียเกาะที่ผนังลำไส้ซึ่งลักษณะที่พบโดยส่วนใหญ่จะเป็น villi ของผนังลำไส้ (ภาพที่ 16.1-16.2) ส่วนในกลุ่มทดลองพบแบคทีเรียรูปร่างลักษณะเป็นแท่ง ความยาวประมาณ 5 ไมโครเมตร (ภาพที่ 16.3-16.4) ซึ่งมีลักษณะใกล้เคียงกับแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* spp.

ตารางที่ 11 ปริมาณแบคทีเรียรวมและ *Vibrio* spp. ในลำไส้กุ้งขาวแวนนาไมในกลุ่มที่ให้อาหารผสมโพรไบโอติกและกลุ่มที่ให้อาหารไม่ผสมโพรไบโอติกหลังระยะเวลาการเลี้ยงนาน 60 วัน

อาหาร	ปริมาณแบคทีเรียรวม ($\times 10^5$ CFU/g)	ปริมาณ *Vibrio* spp. ($\times 10^5$ CFU/g)
อาหารผสมโพรไบโอติก	16.11 ± 2.03^a	0 ± 0.0^a
อาหารที่ไม่ผสมโพรไบโอติก	18.80 ± 1.40^a	1.2 ± 0.2^b

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานในแนวตั้งที่กำหนดด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 16 ผนังลำไส้กุ้งขาวในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope: SEM)

1 = ผนังลำไส้ของกุ้งขาวในกลุ่มควบคุมที่ตรวจดูด้วย SEM

2 = ลักษณะ villi ของผนังลำไส้กุ้งขาวในกลุ่มควบคุมที่ตรวจดูด้วยกล้อง SEM

3-4 = ผนังลำไส้ในกลุ่มทดลองที่พบแบคทีเรีย (ลูกศรชี้) ที่ผนังลำไส้กุ้งขาวที่ตรวจดูด้วยกล้อง SEM

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นอกจากนี้ยังพบว่าคุณสมบัติของน้ำในกลุ่มทดลองนั้นโดยเฉพาะค่าแอมโมเนียและไนไตรท์นั้นมีค่าต่ำกว่าในกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 12) เนื่องจากการให้อาหารผสมแบคทีเรียโพรไบโอติกแล้วเคลือบโดยใช้น้ำมันปลาหมึก มีแบคทีเรียโพรไบโอติกบางส่วนหลุดจากเม็ดอาหารลงในน้ำเลี้ยง และแบคทีเรียโพรไบโอติกบางส่วนที่ไม่ยึดเกาะภายในลำไส้กุ้งออกมากับการขับถ่ายของเสียมาอยู่ในน้ำ ซึ่งอาจพบแบคทีเรียชนิดเดียวกันนี้ได้จากในน้ำที่เลี้ยงกุ้งและสิ่งขับถ่าย และ *Bacillus* spp. เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่สามารถเปลี่ยนสารอินทรีย์ให้กลายเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ได้ซึ่งเป็นเหตุผลว่าในบ่อที่มีปริมาณแบคทีเรียแกรมบวกสูงจะพบว่ามีปริมาณสารอินทรีย์ต่ำในระหว่างการเลี้ยงกุ้ง (Stanier *et al*., 1963; Balcazar, *et al.*, 2006) มีการศึกษาผลของ *B. subtilis, B. megaterium, B. firmus, B. lentus* และ *B. marinus* ต่อการย่อยสลายสารอินทรีย์ในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบพัฒนา ที่มีอาหารเหลือและสิ่งขับถ่ายตกค้างอยู่ในบ่อมากมีผลให้คุณภาพน้ำแย่ลง พบว่าแบคทีเรียเหล่านี้มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายขี้กุ้งและสารอินทรีย์ในบ่อเลี้ยงได้ดี และทำให้กุ้งมีอัตรารอดสูงกว่าบ่อที่ไม่เติมแบคทีเรีย (ชลิต, 2535; รัตนวดี, 2535; เปรมสุดา, 2539; Dalmin *et al*., 2001) และมีหลายงานวิจัยที่แสดงถึงผลของแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ในการปรับปรุงคุณภาพน้ำระหว่างการเลี้ยงกุ้งขาวและการอนุบาลลูกกุ้ง ที่พบว่ากลุ่มทดลองที่มีปริมาณแอมโมเนีย ไนไตรท์ และไนเตรท ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (มนฑกานต์, 2552; Lakshmanan and Soundarapandian, 2008; Rajinikanth *et al.,* 2010)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 12 คุณสมบัติของน้ำระหว่างการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมของกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง

วัน	กลุ่ม	Alkalinity (mg/L)	TAN (mg/L)	Nitrite (mg/L)	pH
10	ควบคุม	101.50 ± 1.84^{a}	0.833 ± 0.139^{a}	0.149 ± 0.026^{a}	7.32 ± 0.06^{a}
	ทดลอง	92.33 ± 5.82^{b}	0.493 ± 0.056^{b}	0.128 ± 0.032^{a}	7.78 ± 0.13^{b}
20	ควบคุม	99.83 ± 3.05^{a}	1.798 ± 0.096^{a}	0.227 ± 0.004^{a}	8.13 ± 0.10^{a}
	ทดลอง	98.50 ± 8.03^{a}	1.759 ± 0.060^{a}	0.195 ± 0.013^{b}	8.25 ± 0.06^{a}
30	ควบคุม	101.83 ± 4.47^{a}	2.118 ± 0.106^{a}	0.330 ± 0.008^{a}	8.31 ± 0.13^{a}
	ทดลอง	101.00 ± 3.94^{a}	1.895 ± 0.067^{b}	0.227 ± 0.009^{b}	8.33 ± 0.13^{a}
40	ควบคุม	105.67 ± 2.21^{a}	2.633 ± 0.109^{a}	0.786 ± 0.078^{a}	8.25 ± 1.03^{a}
	ทดลอง	103.17 ± 1.00^{a}	2.142 ± 0.030^{b}	0.657 ± 0.030^{b}	8.28 ± 0.10^{a}
50	ควบคุม	103.00 ± 0.86^{a}	2.772 ± 0.135^{a}	1.388 ± 0.088^{a}	8.34 ± 0.05^{a}
	ทดลอง	105.83 ± 1.14^{b}	2.167 ± 0.105^{b}	1.018 ± 0.061^{b}	8.23 ± 0.10^{a}
60	ควบคุม	101.67 ± 1.59^{a}	2.719 ± 0.020^{a}	1.853 ± 0.066^{a}	8.08 ± 0.08^{a}
	ทดลอง	104.33 ± 1.59^{b}	2.286 ± 0.125^{b}	1.146 ± 0.058^{b}	8.11 ± 0.09^{a}

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานในแนวตั้งที่กำหนดด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

3. ผลของแบคทีเรียกลุ่มสร้างสปอร์ต่อการยับยั้งเชื้อ *Vibrio spp.* และผลต่ออัตรารอด การเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไมในบ่อเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม

ผลของการศึกษาอัตรารอดตายและการเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไมระหว่างกลุ่มที่ใช้แบคทีเรียกลุ่มสร้างสปอร์ และกลุ่มที่ไม่ให้แบคทีเรียกลุ่มสร้างสปอร์ระหว่างการเลี้ยงในบ่อเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม พบว่าในช่วงอายุกุ้ง 30 วัน ปริมาณเชื้อ *Vibrio* spp. เฉลี่ยที่พบในเลือดกุ้งขาวจากตัวอย่างที่สุ่มมาจำนวน 50 ตัว ปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวมและ *Vibrio* spp. เฉลี่ยในกลุ่มทดลองและในกลุ่มควบคุมไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยกลุ่มทดลองมีค่าแบคทีเรียรวมและ *Vibrio* spp. เฉลี่ยเท่ากับ $15.18 \pm 2.82 \times 10^{4}$ CFU/มิลลิลิตร และ $1.72 \pm 1.88 \times 10^{4}$ CFU/มิลลิลิตร และกลุ่มควบคุมมีค่าแบคทีเรียรวมและ*Vibrio* spp. เฉลี่ยเท่ากับ $36.71 \pm 25.28 \times 10^{4}$ CFU/มิลลิลิตร และ $3.97 \pm 0.74 \times 10^{4}$ CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เมื่อเวลาผ่านไป 60 วัน* พบว่าปริมาณแบคทีเรียรวมในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองไม่มีความแตกต่างทางสถิติแต่พบว่า*Vibrio* spp. เฉลี่ยในกลุ่มควบคุมมีค่าสูงกว่าในกลุ่มทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยมีค่าเท่ากับ $0.99 \pm 1.49\times10^4$ CFU/มิลลิลิตร และ $0.03 \pm 0.02\times10^4$ CFU/มิลลิลิตร ซึ่งมีแนวโน้มเช่นเดียวกับที่เวลาผ่านไป 90 วัน พบว่า*Vibrio* spp. เฉลี่ยในกลุ่มควบคุมมีค่าสูงกว่ากลุ่มทดลอง โดยมีค่าเท่ากับ $0.96 \pm 0.83\times10^4$ CFU/มิลลิลิตร และ $0.05 \pm 0.02\times10^4$ CFU/มิลลิลิตร (ตารางที่ 13, ภาพที่ 17-20)

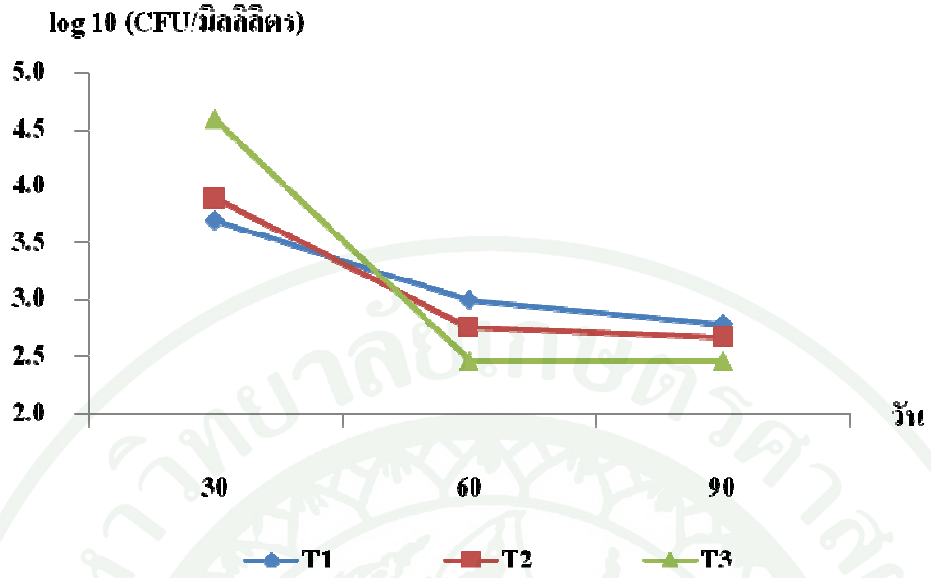
*** หมายเหตุ**: เนื่องจากเกษตรกรพบกุ้งเริ่มแสดงอาการป่วยในกลุ่มควบคุมจึงตัดสินใจผสมโพรไบโอติกซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกษตรกรเคยใช้ตั้งแต่วันที่ 50 จนกระทั่งจบการเลี้ยงจึงทำให้ *Vibrio* spp. ในกลุ่มควบคุมมีแนวโน้มที่ลดลงเช่นเดียวกับในกลุ่มควบคุม

ตารางที่ 13 ปริมาณแบคทีเรียรวมเฉลี่ยและเชื้อ *Vibrio* spp. ที่พบในเลือดกุ้งขาวแวนนาไมในกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมในบ่อเลี้ยงกุ้ง

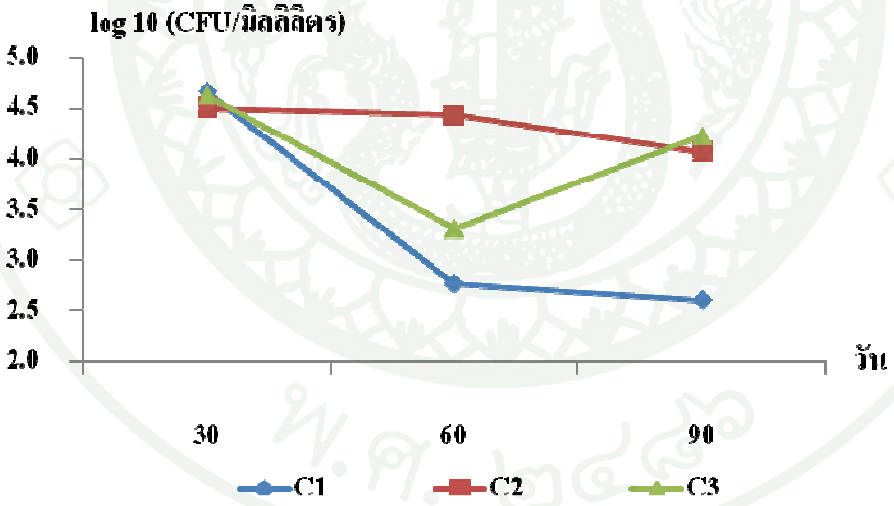
อายุกุ้ง		ปริมาณแบคทีเรีย ($\times10^4$ CFU/มิลลิลิตร)					
		30 วัน		60 วัน		90 วัน	
กลุ่ม	บ่อเลี้ยง	Total bacteria	*Vibrio* spp.	Total bacteria	*Vibrio* spp.	Total bacteria	*Vibrio* spp.
ทดลอง	T1	18.18±6.99	0.50±0.48	3.07±1.24	0.1±0.07	0.75±0.49	0.06±0.05
	T2	12.20±6.56	0.78±0.65	4.60±1.80	0.06±0.05	2.05±1.20	0.05±0.04
	T3	15.15±5.75	3.90±2.90	0.80±0.50	0.03±0.02	1.34±0.64	0.03±0.02
ค่าเฉลี่ย		15.18±2.82[a]	1.72±1.88[a]	2.82±1.91[a]	0.06±0.03[a]	1.38±0.65[a]	0.05±0.02[a]
ควบคุม	C1	64.92±23.72	4.58±3.79	6.52±2.46	0.06±0.05	1.22±0.90	0.04±0.03
	C2	29.13±14.50	3.14±2.53	10.13±3.82	2.71±1.03	3.65±2.53	1.17±0.80
	C3	16.08±7.68	4.19±3.83	1.79±1.15	0.20±0.16	8.70±2.86	1.17±0.80
ค่าเฉลี่ย		36.71±25.28[a]	3.97±0.74[a]	6.15±4.18[a]	0.99±1.49[b]	4.25±3.81[a]	0.96±0.83[b]

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานในแนวตั้งที่กำหนดด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p< 0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

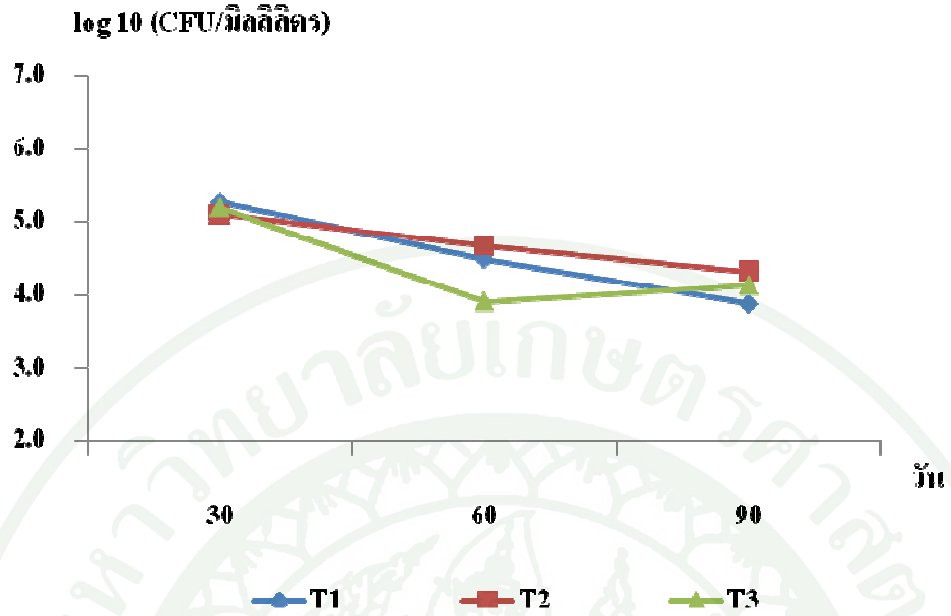


ภาพที่ 17 ปริมาณเชื้อ *Vibrio* spp. ที่พบในเลือดกุ้งขาวแวนนาไมที่พบในบ่อเลี้ยงกุ้งกลุ่มทดลอง

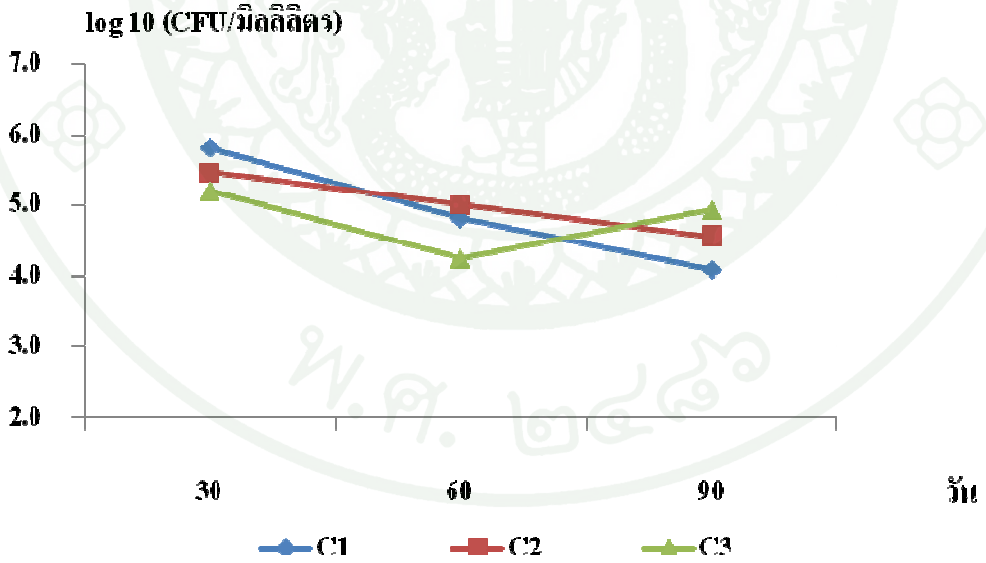


ภาพที่ 18 ปริมาณเชื้อ *Vibrio* spp. ที่พบในเลือดกุ้งขาวแวนนาไมที่พบในบ่อเลี้ยงกุ้งกลุ่มควบคุม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 19 ปริมาณแบคทีเรียรวมที่พบในเลือดกุ้งขาวแวนนาไมในบ่อเลี้ยงกุ้งกลุ่มทดลอง



ภาพที่ 20 ปริมาณแบคทีเรียรวมที่พบในเลือดกุ้งขาวแวนนาไมในบ่อเลี้ยงกุ้งกลุ่มควบคุม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การศึกษาผลของแบคทีเรียกลุ่มสร้างสปอร์ผลต่อการเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไมในบ่อเลี้ยงที่กำหนดระยะเวลาไว้ 120 วัน แต่เนื่องจากฟาร์มกุ้งที่ทำการศึกษาต้องทำการจับกุ้งก่อน 120 วัน จึงทำให้เก็บข้อมูลสุดท้ายที่ 90 วัน ซึ่งพบว่ากุ้งขาวแวนนาไมบ่อกลุ่มทดลองและบ่อควบคุมมีน้ำหนักเฉลี่ยไม่แตกต่างกันตลอดการเลี้ยง โดยกุ้งบ่อทดลองเท่ากับ 16.14±1.58 กรัม ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) กับบ่อควบคุมที่มีน้ำหนักเฉลี่ยเท่ากับ 15.41±0.80 กรัม (ตารางที่ 14, ภาพที่ 21)

ตารางที่ 14 น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาวแวนนาไมในบ่อเลี้ยงกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม

กลุ่ม	น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม)			
	บ่อเลี้ยง	30	60	90
ทดลอง	T1	3.85±0.88	9.98±1.25	15.13±2.57
	T2	5.15±0.67	10.37±1.31	15.34±3.64
	T3	4.29±0.55	10.08±1.85	17.96±2.15
น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม)		4.29±0.66[a]	10.14±0.20[a]	16.14±1.58[a]
ควบคุม	C1	4.35±1.04	10.20±0.95	15.34±2.67
	C2	5.45±1.36	11.14±1.56	16.06±3.00
	C3	4.16±0.64	9.28±1.21	16.66±1.93
น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม)		4.65±0.69[a]	10.20±0.92[a]	15.41±0.80[a]

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานในแนวตั้งที่กำหนดด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p< 0.05$)

การศึกษาผลของแบคทีเรียกลุ่มสร้างสปอร์ผลต่ออัตรารอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมในบ่อเลี้ยงพบว่าเมื่อครบ 90 วัน อัตรารอดตายเฉลี่ยในบ่อทดลองมีค่าเท่ากับ 81.73 ± 3.39 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่แตกต่างกับอัตรารอดตายเฉลี่ยของบ่อควบคุมที่มีค่าเท่ากับ 80.40 ± 2.35 เปอร์เซ็นต์

เมื่อคำนวณค่าผลผลิตรวมเฉลี่ยในบ่อทดลองพบว่ามีค่าเท่ากับ 2475.89 ± 205.31 กิโลกรัมต่อไร่ ซึ่งสูงกว่าในบ่อควบคุมที่มีค่าเท่ากับ 2336.34 ± 76.33 กิโลกรัมต่อไร่ (ตารางที่ 15) แต่ไม่แตกต่าง

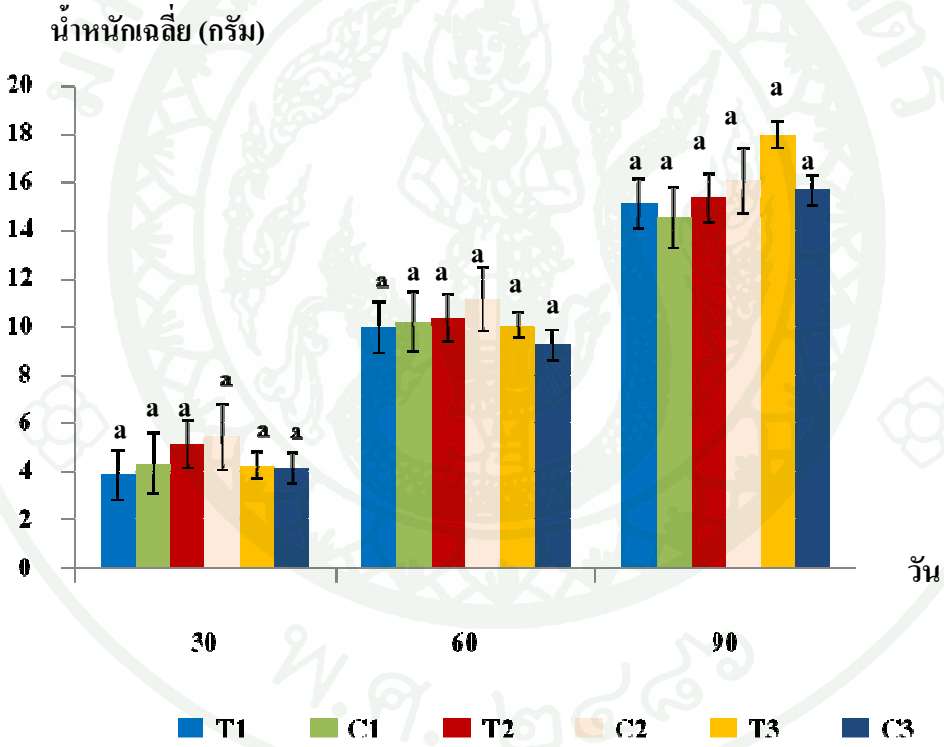
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ถึงแม้ผลผลิตรวมเฉลี่ยในบ่อทดลองที่มีค่าสูงกว่าบ่อควบคุม เท่ากับ 139.55 กิโลกรัมต่อไร่ ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ แต่นำผลผลิตรวมในบ่อทดลองที่เพิ่มขึ้นมาคำนวณมูลค่าเป็นตัวเงินจะได้เท่ากับ 18,141.50 บาทต่อไร่ ซึ่งทำให้เกษตรกรมีรายได้เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับผลผลิตของกุ้งกลุ่มควบคุม และราคากุ้งขาวซื้อขายในขณะนั้นที่ขนาด 50-60 ตัวต่อกิโลกรัม อยู่ที่ 130 บาท โดยผลผลิตรวมเฉลี่ยต่อไร่ของบ่อควบคุมเมื่อคำนวณเป็นตัวเงินเท่ากับ 303,724.20 บาทต่อไร่ ในขณะที่บ่อทดลองเท่ากับ 321,865.70 บาทต่อไร่

อย่างไรก็ตามผลของแบคทีเรียโพรไบโอติกต่ออัตรารอดตายของกุ้งขาวในห้องปฏิบัติการและในบ่อเลี้ยงจริงที่มีความแตกต่างกันนั้น อาจมีสาเหตุมาจากการเลี้ยงกุ้งขาวในห้องปฏิบัติการนั้นมีการผสมโพรไบโอติกกับอาหารที่ใช้ให้กุ้งกินทุกวันจนเสร็จสิ้นการทดลองซึ่งทำให้กุ้งได้รับแบคทีเรียโพรไบโอติกอย่างต่อเนื่องสม่ำเสมอซึ่งตามรายงานของ Fuller (1992) ที่กล่าวมาแล้วในข้างต้นว่า เมื่อกุ้งได้รับโพรไบโอติกในบริมาณที่ไม่เพียงพอก็อาจจะทำให้ปริมาณของแบคทีเรียโพรไบโอติกมีแนวโน้มลดลงตามระยะเวลาซึ่งจะมีผลสืบเนื่องต่อไปถึงอัตรารอดของกุ้งในบ่อเลี้ยงจริงได้ ซึ่งในการทดลองในฟาร์มเลี้ยงนั้นจะให้อาหารตามโปรแกรมเดิมของฟาร์มและให้โพรไบโอติกผสมอาหาร 5 วันและหยุด 5 และใช้ในอัตราส่วนที่ต่ำ คือ 2 กรัมต่ออาหารกุ้ง 1 กิโลกรัม และการทดลองในการเลี้ยงจริงอาจมีบางปัจจัยที่ไม่สามารถควบคุมได้ จึงทำให้ผลของอัตรารอดในบ่อเลี้ยงจริงไม่มีความชัดเจนมากเท่ากับในห้องปฏิบัติการ นอกจากนั้นการที่เกษตรกรมีการใช้โพรไบโอติกในบ่อควบคุมตั้งแต่วันที่ 50 จนสิ้นสุดการทดลองเนื่องจากพบว่ามีกุ้งป่วยนั้นก็น่าจะมีผลทำให้อัตรารอดและการเจริญเติบโตของทั้งสองกลุ่มมีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก แต่อย่างไรก็ตามพบว่าปริมาณ *Vibrio* spp. ในกลุ่มทดลองมีค่าต่ำกว่าในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ตั้งแต่วันที่ 60 จนสิ้นสุดการทดลอง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการใช้ *Bacillus* spp. ให้กุ้งกินสามารถช่วยควบคุมปริมาณ *Vibrio* spp. ในกุ้งได้ระดับหนึ่ง ซึ่งสอดคล้องกับ Moriarty (1998) ที่ศึกษา *Bacillus* sp. ที่เป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ใช้ในบ่อเลี้ยงกุ้งเพื่อควบคุมปริมาณ *Vibrio* spp. โดยทำการเปรียบเทียบในฟาร์มที่ประเทศอินโดนีเซียซึ่งการเลี้ยงกุ้งมีปัญหาเกี่ยวกับ *Vibrio* เรืองแสง ถึงแม้บางฟาร์มมีการใช้ *Bacillus* sp. เป็นแบคทีเรียโพรไบโอติก กุ้งยังคงมีอัตราการตายสูง เนื่องจากฟาร์มไม่มีประสบการณ์การใช้โพรไบโอติกและมีการใช้เพียงแค่ 80 วันเท่านั้น แต่ในทางตรงกันข้ามฟาร์มที่ใช้โพรไบโอติกมากกว่า 160 วัน จะช่วยลดปัญหา *Vibrio* เรืองแสงได้ นอกจากนี้ Rajinikanth *et al.* (2010) รายงานถึงการใช้โพรไบโอติกต่ออัตรารอดตายและการเจริญเติบโตของกุ้งในฟาร์มเลี้ยงประเทศอินเดียโดยใช้ผสมอาหารในอัตราส่วน 5 กรัมต่ออาหาร 1กิโลกรัมและอัตราส่วน 10 กรัมต่ออาหาร 1กิโลกรัม อัตรารอดตายของกุ้งในกลุ่มที่ได้รับโพร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ไบโอติกในปริมาณที่สูงกว่าจะมีอัตรารอดตายสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับโพรไบโอติกในปริมาณต่ำและกลุ่มควบคุม น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งเมื่อเสร็จสิ้นการทดลองที่ 130 วัน น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งในกลุ่มที่ได้รับโพรไบโอติกมีน้ำหนักมากกว่ากลุ่มควบคุม 15% และน้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งในกลุ่มที่ได้รับโพรไบโอติกทั้งในปริมาณสูงและต่ำนั้นไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ส่วนคุณภาพน้ำนั้นได้รับความช่วยเหลือจากทางฟาร์มในการตรวจวัดคุณภาพน้ำให้เพราะในการศึกษาครั้งนี้ไม่ได้มุ่งเน้นคุณภาพน้ำเป็นหลักเพราะเป็นการผสมไพรไบโอติกกับอาหารให้กุ้งกินประกอบกับการศึกษาทดลองในฟาร์มนั้นเป็นพื้นที่เลี้ยงขนาดใหญ่กว่าในห้องปฏิบัติการมากจึงทำให้คุณภาพน้ำทั้งบ่อควบคุมและบ่อทดลองไม่มีความแตกต่างกัน ซึ่งการศึกษาครั้งนี้มีจุดประสงค์ที่ต้องการทราบถึงผลต่อการควบคุมเชื้อ *Vibrio* spp. ในบ่อเลี้ยงและผลต่ออัตรารอดและการเจริญเติบโตของกุ้ง



ภาพที่ 21 น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาวแวนนาในบ่อเลี้ยงกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 15 อัตรารอดและผลผลิตทั้งหมดของกุ้งขาวแวนนาไมในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง หลังจากการเลี้ยงนาน 90 วัน

ชุดทดลอง	บ่อ	อัตรารอด (%)	Total production (กิโลกรัมต่อไร่)
กลุ่มทดลอง	T1	78.51	2677.29
	T2	84.35	2266.86
	T3	84.44	2483.50
ค่าเฉลี่ย		81.73 ± 3.39 [a]	2475.89 ± 205.31[a]
กลุ่มควบคุม	C1	78.10	2421.01
	C2	82.11	2315.20
	C3	82.24	2272.80
ค่าเฉลี่ย		80.40 ± 2.35 [a]	2336.34 ± 76.33[a]

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานในแนวตั้งที่กำหนดด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุปผล

1. แบคทีเรียสร้างสปอร์ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์ PondSafe ทั้ง 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Brevibacillus parabrevis, Bacillus velezensis*, *B. amyloliquifaciens*, *B. subtilis* และ *B. megaterium* นั้นสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Vibrio harveyi* ได้สูงสุด 48 ชั่วโมงในห้องปฏิบัติการและพบว่าการรวมกันของแบคทีเรียสร้างสปอร์ทั้ง 5 สายพันธ์สามารถยับยั้งการเจริญของ *Vibrio harveyi* ได้ดีกว่าการยับยั้งโดยแบคทีเรียสร้างสปอร์เพียงตัวเดียว ทดสอบเบื้องต้นโดยการทำ cross streak และวัดประสิทธิภาพการยับยั้งหรือลดการเจริญเติบโตของ *Vibrio harveyi* ด้วยวิธี agar well diffusion assay และ broth co-culture

2. ผลของการใช้ผลิตภัณฑ์ PondSafe ในการควบคุมเชื้อ *Vibrio* spp. และผลต่ออัตรารอดและการเจริญเติบของกุ้งขาวแวนนาไมในห้องปฏิบัติการ หลังจากเลี้ยงกุ้งจนครบ 60 วัน พบว่าน้ำหนักกุ้งในกลุ่มทดลองมีน้ำหนักเฉลี่ยที่ใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม และไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) แต่พบว่าอัตรารอดตายของกุ้งในกลุ่มทดลองมีอัตรารอดตายสูงกว่าในกลุ่มควบคุมและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และในกุ้งขาวกลุ่มทดลองไม่พบเชื้อ *Vibrio* spp. ในลำไส้แต่พบเชื้อ *Vibrio* spp. ในกลุ่มควบคุม

3. ผลของการใช้ผลิตภัณฑ์ PondSafe ในการควบคุมเชื้อ *Vibrio* spp. และผลต่ออัตรารอดและการเจริญของกุ้งขาวแวนนาไมในบ่อเลี้ยง พบว่าในบ่อทดลองปริมาณเชื้อ *Vibrio* spp. ที่ตรวจพบในเลือดกุ้งขาวที่อายุ 60 วัน และ 90 วัน มีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) แต่อย่างไรก็ตามพบว่า อัตรารอดและน้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งในบ่อทดลองและบ่อควบคุมที่มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ข้อเสนอแนะ

ควรมีการศึกษาต่อเพิ่มเติมถึงรูปแบบการใช้โพรไบโอติกในภาวะต่างๆ เช่น ศึกษาปริมาณและความถี่ในการใช้เมื่อพบกุ้งป่วยหรือเพื่อป้องกันการติดเชื้อ *Vibrio* spp. รวมถึงผลของโพรไบโอติกต่อภูมิคุมกันของกุ้งเพื่อให้เกิดการใช้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กุลวรา แสงรุ่งเรือง. 2534. **การศึกษาปริมาณแบคทีเรียที่เปลี่ยนแปลงในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ**. เอกสารวิชาการ ฉบับที่14/2534. ศูนย์ศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบน กองเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง.

ขจีนาฏ โพธิเวชกุล, สุมาลี เหลืองสกุล และสมใจ ศิริโภค. 2540. **การคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อใช้ผลิตเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอสและไลเปส**. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ, กรุงเทพฯ.

จันทสิงห์ ดวงบ้านเซ่า. 2544. **การใช้แบคทีเรียเพื่อการจัดคุณภาพน้ำและปริมาณสารอินทรีย์ในตะกอนดินในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำระบบปิด.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

จินตลา ลิ้มภักดี. 2544. **การคัดเลือกและศึกษาลักษณะเฉพาะของแบคทีเรียแล็กติกที่ผลิตสารยับยั้งจุลชีพจากผลิตภัณฑ์ประมงซึ่งแปรรูปโดยกระบวนการหมักและการนำไปใช้ประโยชน์.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตร, กรุงเทพฯ.

ชลอ ลิ้มสุวรรณ. 2535. **คัมภีร์การเลี้ยงกุ้งกุลาดำ**. พิมพ์ครั้งที่ 2. บริษัท ฐานเศรษฐกิจ จำกัด, กรุงเทพฯ.

_____. 2543. **กุ้งไทย 2000 สู่ความยั่งยืนและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม**. โรงพิมพ์เจริญรัฐการพิมพ์, กรุงเทพฯ.

_____. 2549. **เอกสารคำสอนโรคสัตว์น้ำ (Diseases of Aquatic Animals).** คณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ชลอ ลิ้มสุวรรณ และ พรเลิศ จันทร์รัชชกูล. 2547. **อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย**. สนับสนุนการจัดการพิมพ์โดยสำนักคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เพื่อเฉลิมพระเกียรติพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวภูมิพลอดุลยเดชเนื่องในวโรกาสพระราชพิธีมหามงคลเฉลิมพระชนมพรรษา 5 ธันวาคม พ.ศ. 2547. บริษัทเมจิคพับบลิเคชั่นจำกัด.

ชลิต โนระดี. 2535. **ผลของแบคทีเรียต่อการย่อยสลายสารอินทรีย์ในบ่อซีเมนต์เลี้ยงกุ้งกุลาดำที่มีพื้นเป็นดินเหนียว.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

บรรจง เทียนส่งรัศมี. 2542. **เทคโนโลยีการเลี้ยงกุ้งดำหลังศตวรรษที่ 20.** ภาควิชาวาริชศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบรูพา, ชลบุรี.

เปรมสุดา สมาน. 2539. **จุลินทรีย์สำหรับน้ำเสียที่เกิดจากการเลี้ยงกุ้งทะเล**. วิทยานิพรธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณณพินิจ. 2535. **จุลชีววิทยาทั่วไป**. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

นิตยา ยิ้มเจริญ. 2549. **การใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ** . วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

พงษ์เทพ วิไลพันธ์. 2546. **แบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียกรดแล็กติกที่พบในปลาร้า**. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

มณจันทร์ เมฆธน. 2540. การใช้จุลินทรีย์ในบ่อเลี้ยงกุ้ง, น. 70-72. *ใน* **การสัมมนาและนิทรรศการทางวิชาการ งานวันกุ้งจันทบุรี 40**. กรมประมง, กรุงเทพฯ.

_____ และ กมลพร มาแสวง. 2543. ศักยภาพของแบคทีเรียที่มีประโยชน์บางชนิดในการยับยั้งแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ที่ทำให้เกิดโรคเรืองแสง. *ใน* **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38**. จตุจักร, กรุงเทพฯ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

มนฑกานต์ สมบรูณ์. 2552. **ผลของแบคทีเรียสกุล Bacillus ชนิดต่างๆ ในการควบคุมแบคทีเรียวิบริโอ (Vibrio spp.) และคุณภาพน้ำในการอนุบาลลูกกุ้งและการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (Litopenaeus vannamei)**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

_____, ชลอ ลิ้มสุวรรณ, นิติ ชูเชิด และ พรเลิศ จันทร์รัชชกูล. 2552. ผลของการใช้จุลินทรีย์กลุ่ม *Bacillus* ที่แตกต่างกัน 3 กลุ่มต่อแบคทีเรียวิบริโอ (*Vibrio* spp.) คุณภาพน้ำและอัตรารอดตายในการอนุบาลลูกกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*). **เรื่องเต็มการประชุมวิชาการ ครั้งที่ 47 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เล่มที่ 4 สาขาประมง**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพ

มะลิ บุญยรัตผลิน. 2531. **อาหารและการให้อาหารกุ้งกุลาดำ**. สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ, กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

มาลินี วิชชาวุธ และสมยศ สิทธิโชคพันธ์. 2548. การนำเข้าพ่อแม่พันธุ์กุ้งขาวตามระเบียบกรมประมง. **วารสารการประมง** 58(2): 170-171.

มินตรา ศีลอุดม, นนทวิทย์ อารีย์ชน และ ประพันธ์ศักดิ์ ศีรษะภูมิ. 2551. ประสิทธิภาพของแบคทีเรียสกุล *Bacillus* spp. ที่แยกได้จากลำไส้ของกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei,* Boone) ในการยับยั้งเชื้อ *Vibrio harveyi*. *ใน* **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46 สาขาประมง**.

ภวัต สังขะวัฒนะ. 2544. การ**พัฒนาผลิตภัณฑ์นมหมักคล้ายโยเกิร์ตโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์โพรไบโอติก**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

เรืองลักขณา จามิกรณ์. 2535. **ชีวเคมีเบื้องต้น**. มหาวิทยาลัยรามคำแหง, กรุงเทพ.

รัตนาวดี ทับทิม. 2535. **แบคทีเรียที่ช่วยย่อยสลายเศษอาหารในนากุ้ง.** ภาควิชาจุลชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, จุฬาลงกรมหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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

วรรณพร ฮุ้ยสกุล. 2550. **ผลของโปรไบโอติก (*Lactobacillus* spp.) ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำระบบปิด**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วรรณิภา เพี้ยงภักตร์. 2539. **การใช้แบคทีเรียเสริมในอาหารกุ้ง**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วลัยพร ทิมบุญธรรม. 2544. **การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วัชริยา ภูรีวิโรจน์กุล. 2549. **การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* Fabricius**. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

_____ , มณจันทร์ เมฆธน และ นนทวิทย์ อารีย์ชน. 2547. **การหาชนิดของแบคทีเรียในลำไส้ของกุ้งกุลาดำที่เหมาะสม เพื่อใช้เป็นโปรไบโอติกในกุ้งกุลาดำและเพื่อควบคุมคุณภาพสิ่งแวดล้อมในบ่อกุ้ง**. รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์. โครงการวิจัยทุนอุดหนุนวิจัย มก. ประจำปีงบประมาณ 2547. ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ, คณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วารุณี แซ่เอี๊ย. 2549**. ผลของการใช้จุลินทรีย์กลุ่ม *Bacillus* sp. ต่อคุณภาพน้ำและผลผลิตกุ้งกุลาดำในกาเลี้ยงด้วยน้ำความเค็มต่ำ**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท,มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิจิตรา ลีละศุภกุล และ สมหมาย เชี่ยววารีสัจจะ. 2541. **การศึกษาเบื้องต้นการใช้จุลินทรีย์ที่มีศักยภาพเพื่อการบำบัดน้ำและควบคุมในการเพาะเลี้ยงกุ้ง**. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ ทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินรายได้ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประเภทกำหนดหัวข้อประจำปี 2541.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิสุทธิ์ วีระกุลพิริยะ. 2554. นโยบายภาครัฐในการส่งเสริมอุตสาหกรรมกุ้ง. **Aqua Biz** 4 (41): 66-73.

สมศักดิ์ ปณีตัธยาศัย. 2554. ยุธศาสตร์ตลาดกุ้งไทย 2554 สถานการณ์และยุธศาสตร์ทางการตลาด. *ใน* **งานวันกุ้งไทย ครั้งที่ 21 ระหว่างวันที่ 12-13 กุมภาพันธ์ ชมรมผู้เลี้ยงกุ้งสุราษฎธานี.** จังหวัดสุราษฎธานี.

สายสมร ลำยอง. 2524. **สารปฏิชีวนะและปฏิกิริยาการต่อต้านจุลินทรีย์**. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

สมาน กูจิ. 2538. **การศึกษาประสิทธิภาพของสารเคมีและแบคทีเรียที่ใช้ในการปรับปรุงคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สรรเสริญ ช่อเจี้ยง และ ทวี โรจนสารัมภกิจ. 2539. การศึกษาการเจริญเติบโตและผลผลิตการเลี้ยงกุ้งกุลาดำในบ่อดินโดยใช้จุลินทรีย์ (*Bacillus subtilis*). **เอกสารวิชาการฉบับที่ 11/2539**. สถานีเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งจังหวัดสงขลา, กองเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง, กรุงเทพฯ.

สิทธิ บุญยรัตผลิน, วนัดดา คมเวช, พุทธ ส่องแสงจินดา, เจนจิตต์ คงกำเนิด และ วินัย กระจายวงศ์. 2532. โรคกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในบ่อคอนกรีตกลม. **เอกสารวิชาการฉบับที่4/2532.** สถาบันเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง จังหวัดสงขลา, กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

สินธิ แดงสกุล และ ลิลา เรืองแป้น. 2541. ประสิทธิภาพของโปรไบโอติกที่ผลิตจาก *Bacillus* เพื่อการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. **วารสารการประมง** 51(5): 446-456.

สุบงกช กำเนิดมณี. 2540. **การศึกษาประสิทธิภาพของยานอร์ฟล็อกซาซีนิโคติเนทในการป้องกันโรควิบริโอซีสในกุ้งกุลาดำ**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และ วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. 2552. **การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอย่างยั่งยืน :บทบาทของจุลินทรีย์และการประยุกต์ใช้**. พิมพ์ครั้งที่1. สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ. 308 หน้า.

_____, แก้วกานต์ ศักดิ์อนุชัยชาญ, นเรศ เชื้อสุวรรณ และ วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. 2548. การแพร่กระจายของแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. ในสัตว์ทะเลจากธรรมชาติและการเพาะเลี้ยง. **วารสารวิทยาศาสตร์บรูพา** 10(1-2): 83-91.

สุรีย์ ฟูตระกูล. 2533. **ชีวะเคมีพื้นฐาน 1**. ภาควิชาเคมี, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2553. **การนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร ปี 2553**. แหล่งที่มา: http://www.oae.go.th/oae_report/export_import/export_result.php. 15 มีนาคม 2554.

หน่วยวิจัยเพื่อความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพกุ้ง. 2546. **โรคติดเชื้อไวรัสที่สำคัญของกุ้งกุลาดำในประเทศไทย**. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพฯ.

อรอนงค์ ประวิทย์วิไลกุล. 2547. **การเปรียบเทียบการเลี้ยงกุ้งขาวแปซิฟิก (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931) ในบ่อดินและบ่อที่ปูด้วยโพลีเอททีลีน**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

องอาจ เลาหวินิจ. 2545. โพรไบโอติกและจุลินทรีย์ก่อนใช้ต้องเข้าใจพื้นฐาน. **วารสารสัตว์น้ำ** 156(13): 35-37.

อนันต์ชัย เขื่อนธรรม. 2542. **หลักการวางแผนการทดลอง**. ภาควิชาสถิติ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อัครเดช แก้ววิเชียร. 2545. โพรไบโอติก: ทางเลือกเพื่อแก้ปัญหาการตกค้างยาต้านจุลชีพในกุ้ง. **LAB. TODAY** (4): 37-40.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Abrahama, T. J. and R. Palaniappan. 2003. Distribution of luminous bacteria in semi-intensive penaeid shrimp hatcheries of Tamil Nadu, India. **Aquaculture** 232: 81-90.

Alavandi, S.V., K.K. Vijayan, T.C. Santiago, M. Poornima, K.P. Jithendran, S.A. Ali and J.J.S. Rajan. 2004. Evaluation of *Pseudomonas* sp. PM11 and *Vibrio fluvialis* PM17 on immune indices of tiger shrimp, *Penaeus monodon*. **Fish Shellfish Immunol** 17: 115-120.

Alday-Sanz, V., A. Rouge and J. F. Turnbull. 2002. Clearing mechanism of *Vibrio vulnificus* biotype I in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. **Dis. Aqua. Org.** 48: 91-99.

Anderson, I. G., M. N. Shamsudin, M. Shariff and G. Nash. 1988. Bacterial septicemia in juvenile tiger shrimp, *Penaeus monodon*, cultured in Malaysia brackish water ponds. **Asian Fish. Sci.** 2: 93-108.

APHA, AWWA and WEF. 1995. **Standard Methods for the Examination Water and Wastwater**. 20th ed. United Book Press, Maryland.

Arguelles-Arias, A., M. Ongena, B. Halimi, Y. Lara, A. Brans, B. Joris1 and P. Fickers. 2009. *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and mother secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. **Microbial Cell Factories** 8(63): 1-12.

Balcazar, J.R. 2003. Evaluation of probiotic bacterial strains in *Litopenaeua vannamei*. **Final Report, National Center for Marine and Aquacuture Research.** Guayaquil, Ecuador.

_____, I. de Blas, I. Ruiz-Zarzuela, D. Cunningham, D. Vendrell and J.L. Muzquiz. 2006. The role of probiotic in aquaculture. **Vet. Microbiol.** 114: 173-186.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Bernet, M. F., D. Brassart, J. R. Neeser and A. L. Servin. 1994. *Lactobacillus acidophilus* LA 1 binds to cultured human intestinal cells and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. **Gut** 35: 483–489.

Blomberg, L., A. Henriksson and P. L. Conway. 1993. Inhibition of adhesion of *Escherichia coli* K88 to piglet ileal mucus by *Lactobacillus* spp. **Environ. Microbiol**. 59: 34–39.

Boyd, C.E. 1979. **Water Quality in Warmwater Fish Pond**. Albama: Fisheries and Allied Aquaculture Department, Auburn University.

Braude, Al., C.E. Davis and F. Joahua. 1986. **Infectious Disease and Medical Microbiology**. 2ed Philadelphia : W.B. Saunder Company.

Brock, J.A. and K. Main. 1994. **A Guide to the Common Problems and Disease of Cultured *Penaeus vannamei***. Published by the Oceanic Institute, Makapuu Point, Honolulu, Hawaii, USA.

Brockway, D.R. 1995. Metabolic products and their effect. **Fish-cult.** 12: 127-129.

Bruno, M. E. C. and T. J. Montville. 1993. Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. Appl. **Environ. Microbiol**. 59: 3003– 3010.

Buddingh, G.J. 1974. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 8th edition**. The Williams and Wilkins Company, Baltimore, Maryland.

Carmignani, G. M. and J. P. Bennett. 1977. Rapid start-up of a biological filter in a closed aquaculture system. **Aquaculture** 11: 85–88.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Chadwick, R., S. Henson, B. Moseley, G. Koenen, M. Liakopoulos, C. Midden, A. Palou, G. Rechkemmer, D. Gchrder and A. von Wright. 2003. **Functional Foods.** Springer, Germany.

Chiayuvareesajja, S. and C.D. Boyd. 1993. Effect of zeolite, formalin, bacterial augmentation and aeration on total ammonia nitrogen concentrations. **Aquaculture** 116: 33–45.

Chythanya, R., I. Karunasagar and I. Karunasagar. 2002. Inhibition of shrimp pathogenic Vibrios by marine *Pseudomona*s I-2 strain. **Aquaculture** 208: 1-10.

Colin, R. 1989. **Bacillus.** The University of Newcastle upon Tync. Newcastle upon Tyne, United Kingdom.

Conway P.L. 1996. Development of intestinal microbiota, pp.3-38. *In* R.I. Mackie, B.A. White and R.E. Isaacson, eds. **Gastrointestinal Microbiology**. Chapman and Hall. New York.

Costa, R., I. Mermoud, S. Koblavi, B. Morlet, P. Haffner, F. Berthe, M. Legroumellec and P. Grimont. 1998. Isolation and characterization of bacteria associated with a *Penaeus stylirostris* disease (Syndrome 93) in New Caledonia. **Dis. Aquat. Org.** 47: 1-12.

Coyne, V.E. and D. Harding. 2007. Identification of genes expressed in response to bacterial infection of the ommercially-important South African abalone *Haliotis midae*. **International Marine Biotechnology Conference**. Dan hotel, Eilat, Israel.

Dalmin, G., K. Kathiresan and A. Purushothaman. 2001. Effect of probiotics on bacterial population and health status of shrimp in culture pond ecosystem. **Indian J. Exp. Biol**. 39: 939-942.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Decamp, O., D.J. Moriarty and P. Lavens. 2008. Probiotics for shrimp larviculture: review of field data from Asia and Latin America. **Aquac. Res.** 39: 334-338.

De Vuyst, L. and E.J. Vandamme. 1994. **Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria**. Blackie Academic & Professional, New York.

Dopazo, C.P., M.L. Lemos, C. Lodeiros, J. Bolinches, J.L. Barja and A.E. Toranzo. 1988. Inibitory activity of antibiotic-producing marine bacteria against fish pathogens. **J. Appl. Bacteriol.** 65: 97–101.

FAO/WHO. 2001. **Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria.** Cordoba, Argentina.

Flegel, T. W., D.F. Fegan, S. Kongsom, S. Vuthikornudomkit, S. Sriurairatana, S. Boonyaratpalin, C. Chantanachookhin, J.E. Vickers and O.D. Macdonald. 1992. Occorrence, diagnosis and treatment of shrimp diseases in Thailand. pp 57-112 *In* W, Fulks and K.L. Main (eds) **Diseases of Cultured Peneid Shrimp in Asia and the United States**. Oceanic Institute, Honolulu, HI.

Fuller, R. 1992. **Probiotics**. The Scientific Basis. Chapman and Hall, London.

Gatesoupe, F.J. 1999. The use of probiotics in aquaculture: review. **Aquaculture** 180: 147–165.

Goarant, C., J. Herlin, R. Brizard, A. L. Marteau, C. Martin and B. Martin. 2000. Toxic factors of *Vibrio* strains pathogenic to shrimp. **Dis. Aquat. Org.** 40: 101-7.

Gomez-Gil, B., A. Roque and J.F. Turnbul. 2000. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. **Aquaculture** 191: 259–270.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Gomez-Gil, B., M.A. Herrera-Vega, F.A. Abreu-Grobois and A. Roque. 1998. Bioencapsulation of two different *Vibrio* species in nauplii of the brine shrimp (*Artemia franciscana*). **Appl. Environ. Microbiol.** 64: 2318-2322.

Gopal, S., S.K. Otta, S. Kumara, I. Karunasagar, M. Nishibuchi and I. Karunasagar. 2005. The occurrence of *Vibrio* species in tropical shrimp culture environment; implication for food safety. **Inter. J. Food Micro.** 102: 151-159.

Gram, L., J. Melchiorson, B. Spanggaard, I. Huber and T. Nielsen. 1999. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* strain AH2, a possible probiotic treatment of fish. **Appl. Environ. Microbiol**. 65: 969-973.

Gullian, M. and J. Rodriguez. 2002. Immunostimulant qualities of probiotic bacteria. **Global Aquacult. Advo**. 5: 52-54.

_____, F. Thompson and J. Rodriguez. 2004. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**. 233: 1-14.

Hampson, B.L. 1976. Ammonia concentration in relation to ammonia toxicity during a rainbow trout rearing experiment in a closed freshwater-seawater system. **Aquaculture** 9: 61-70.

Harris, L. and L. Owens. 1999. Production of exotoxins by two luminous *Vibrio harveyi* strains known to be primary pathogens of *Penaeus monodon* larvae. **Dis. Aquat. Org.** 38: 11-22.

Hjelm, M., O. Bergh, A. Riaza, J. Nielsen, J. Melchiorsen, S. Jensen, H. Duncan, P. Ahrens, H. Birkbeck and L. Gram. 2004. Selection and identification of autochthonous potential probiotic bacteria from turbot larvae *(Scophthalmus maximus)* rearing units system. **Appl. Microbiol.** 27: 360–371.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Holthuis, L.B. 1980. FAO Species Catalogue, Vol. 1, **Shrimps and Prawns of the World**. Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Irianto A. and B. Austin. 2002. Use of probiotic to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **J. Fish Dis**. 25: 333-369.

Ishimaru, K., M. Akagawa-Matsushita and K. Muroga. 1995. *Vibrio penaeicida* a pathogen of kuruma prawns (*Penaues japonicus*). **J. Syst. Bacteriol.** 45: 134-138.

Ivanova, E.P., V.V. Mikhailov and L.V. Andreev. 1992. Marine bacillas and some approaches to their identification. **MikroBiol. Zh**. 54(1): 27-33.

Krovacek, K., A. Faris, W. Ahne and I. Mansson. 1987. Adhesion of *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio anguillarum* to fish cells and to mucuscoated glass slides. **FEMS Microbiol. Lett.** 42: 85–89.

Lakshmanan, R. and P. Soundarapandian. 2008. Effect of commercial probiotics on large scale culture of black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Fabricius). **Res. J. Microbiol**. 3(3):198-203.

Lemos, M. L., C.P. Dopazo, A.E. Toranzo and J.L. Barja. 1991. Competitive dominance of antibiotic producing marine bacteria in mixed cultures. **J. Appl. Bacteriol.** 71: 228–232.

Lertcanawanichakul M. and S. Sawangnop. 2008. A comparison of two methods used for measuring the antagonistic activity of *Bacillus* species. **Walailak J Sci & Tech**. 5(2): 161-171.

Lewis, W.M. and D.P. Morris. 1986. Toxicity of nitrite to fish: a review. **Trans. Am. Fish. Soc.** 115: 183–195.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Lightner, D.V. 1996. **A Handbook of Pathology and Diagnostic Procedures for Disease of Penaeid Shrimp**. World Aquaculture Society.

_____. 1988. Vibriosis of penaeid shirmp, pp. 42-47. *In* C. J., Sindermann and D.V. Lightner, eds. **Disease Dignosis and Control in North American Marine Aquaculture**. Elsevier Scince publishing Company, Inc. New York.

Lilley, D.M. and R.J. Stillwell. 1965. Probiotic: growth promoting factors produced by micro-organisms. **Science** 147: 747-748.

Maketon, M. and K. Masawhang. 2000. Potential of some beneficial bacterias in colonizing *Vibrio harveyi*, a luminous bacteria causing disease in shrimp, pp. 259-268. *In* **The Proceedings of 38th Kasetsart University Annual Conference.** Kasetsart University, Bangkok.

McIntosh, R.P. 2000. Changing paradigms in shrimp farming. Part V. Establishm ent of heterotrophic bacterial communities. **Globe. Aquac. Advoc**. 3(6): 52-54.

Meunpol, O., K. Lopinyosiri and P. Menasveta. 2003. The effect of ozone and probiotics on the survival of black tiger shrimp (*Peneaus monodon*). **Aquaculture** 220: 437-448.

Mohney, L.L. 1994. An epizootic of vibriosis in Ecuadorian pond reared *Penaeus vannamei,* Boone (Crustacea: Decapoda). **J. World Aquac. Soc.** 25: 116-125.

_____, D.V. Lightner and T.A. Bell. 1991. An epizootic due to *Vibrio* spp. in pond – reared *Penaeus vannamei* in Ecuador. **Book of Abstracts, World Aquaculture Meeting**. Puerto Rico.

Montes, A.J. and D.G. Pugh. 1993. The use of probiotics in food-animal practice. **Vet. Med**. 88: 282–288.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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

_____. 1999. Disease control in shrimp aquaculture with probiotic bacteria. *In* C.R. Bell, M. Brylinsky and P. Johnson-Green, eds. **Microbial Interactions in Aquaculture**. Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology, Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada.

Moss, S.M., B.R. LeaMaster and J.N. Sweeney. 2000. Relation abundance and species composition of gram negative, aerobic bacteria associated with the gut of juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in oligotrophic well water and eutrophic pond water. **J. World Aquac. Soc.** 31: 255-263.

Mulder, R.W., R. Harvenaar and J.H. Huis in't Veld. 1997. Intervention strategies: the use of probiotic and competitive exclusion microfloras against contamination with pathogenic in pigs and poultry, pp.187-207. . *In* R. Fuller, ed. **Probiotics 2: Applications and practical aspects**, Chapman and Hall, London

Nair, S., K. Tsukamoto and U. Shimidu. 1985. Distribution of bacteriolytic bacteria in the coastal marine environments of Japan. **Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish**. 51: 1469–1473.

Nash, G., C. Nithimathachock, C. Tungmandi, A. Arkarjamorn, P. Prathanpipat and P. Ruamthaveesub. 1992. Vibriosis and its control in pond-reared *Penaeus monodon* in Thailand, pp. 143-155. *In* M. Shariff, ed. **Diseases in Asian Aquaculture**. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Olsson, J.C., A. Westerdahl, P. Conway and S. Kjelleberg. 1992. Intestinal colonization potential of turbot (*Scophthalmus maximus*) and dab (*Limanda limanda*) associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*. **Appl. Environ. Microbiol**. 58: 551–556.

Onarheim, A.M. and J. Raa. 1990. Characteristics and possible biological significance of an autochthonous flora in the intestinal mucosa in sea-water fish, pp. 197–201. *In* R. L. Sel, ed. **Microbiology in Poecilotherms**. Proceedings of the International Symposium on Microbiology in Poecilotherms. Elsevier Science Publishers B.V., Paris, France.

Parker, R.B. 1974. Probiotics, the other half of the antibiotic story. **Anim. Nutr It. heal**. 29: 4–8.

Perfettini, J. and M. Bianchi. 1990. The comparison of two simple protocols designed to initiate and stimulate ammonia oxidation in closed aquaculture systems. **Aquaculture** 88: 179–188.

Phianphak, W., S. Piyatirativarakul, P. Menasveta and S. Rengpipat. 1997. Use of probiotics in *Penaeus monodon*. *In* **2nd Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference 1997**, abstract of poster session. Phuket, Thailand.

Phianphak, W., S. Rengpipat, S. Piyatiratitivorakul and P. Menasveta. 1999. Probiotic use of *Lactobacillus* spp. for black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. **J. Sci. Res. Chula. Univ.** 24(1): 41-51.

Pitogo, C.R L. and L.D. De la Pena. 1998. Bacterial disease in shrimp (*Penaeus monodon*) culture in the Philippines. **Fish Pathol.** 33: 405-411.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Pitogo, C.R L., M.C.L. Baticados, E.R. Cruz-Lacierda and L.D. De la Pena. 1990. Occurrence of luminous bacterial disease of *Penaeus monodon* larvae in the Philippines. **Aquaculture** 91: 1-13.

Prosser, J.I., K. Killham, L.A. Glover and E.A.S. Rattray. 1996. Luminescence-based systems for detection of bacteria in the environment. **Crit. Rev. in Biotech.** 16 (2): 157-183.

Prieur, D., G. Mevel, J.L. Nicolas, A. Plusquelle and M. Vigneulle. 1992. Interactions between bivalve molluscs and bacteria in the marine environment. Oceanogr**. Mar. Biol. Annu. Rev.** 28, 277–352.

Purivirojkul, W. and N. Areechon, 2007. Application of *Bacillus* spp. isolated from the intestine of black tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius) from natural habitat for control pathogenic bacteria in aquaculture. **Kasetsart J. (Nat. Sci.)** 41: 125-132.

_____, N. Areechon, P. Srisapoome and M. Maketon. 2006. Competition on using nutrient for growth between *Bacillus* spp. and *Vibrio harveyi.* **Kasetsart J. (Nat. Sci.)** 40 : 499 – 506.

Pybus, V., M.W. Loutit, I.L. Lamont and J.R. Tagg. 1994. Growth inhibition of the salmon pathogen *Vibrio ordalii* by a siderophore produced by *Vibrio anguillarum* strain VL4335. **J. Fish Dis.** 17: 311–324.

Rajinikanth, T., Ramasamy, P. and V. Ravi. 2010. Efficacy of Probiotics, Growth Promotors and Disinfectants in Shrimp Grow out Farms. **American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.**, 7 (3): 347-354.

Reid, R.T., D.H. Live, D.J. Faulkner and A. Butler. 1993. A siderophore from a marine bacterium with an exceptional ferric ion affinity constant. **Nature** 366: 455–458.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Rajinikanth, T., P. Ramasamy and V. Ravi. 2010. Efficacy of probiotics, growth promotors and disinfectants in shrimp grow out farms. **American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.** 7 (3): 347-354.

Rengpipat, S., S. Rukpratanporn, S. Piyatirativarakul and P. Menasveta. 1998 a. Probiotic in aquaculture : A case study of probiotic for larvae of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*), pp. 177-181. *In* T.W. Flegel, ed. **National Center for Genetic Engineering and Biotechnology.** Advance in Shrimp Biotechnology, Bangkok.

_____, W. Phianphak., S. Piyatirativarakul and P. Menasveta. 1998 b. Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. **Aquaculture** 167: 301-313.

_____, S. Rukpratanporn, S. Piyatirativarakul and P. Menasveta. 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). **Aquaculture** 191: 271-288.

Rheinheimer, G. 1992. **Aquatic Microbiology**. Wiley, London.

Rico-Mora, R., D. Voltolina and J. A. Villaescusa-Celaya. 1998. Biological control of *Vibrio alginolyticus* in *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae) cultures. **Aquacult**. **Eng**. 19: 1–6.

Ring, E. and F.J. Gatesoupe. 1998. Lactic acid bacteria in fish: a review. **Aquaculture** 160: 177–203.

Rinkinen, M., K. Jalava, E. Westermarck, S. Salminen and A.C. Ouwehand. 2003. Interaction between probiotic lactic acid bacteria and canine enteric pathogens: a risk factor for intestinal *Enterococcus faecium* colonization. **Vet. Microbiol**. 92: 111-119.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Rosenberry, B. 2001. **Shrimp Farming 2001**. Shrimp News International, San Diago.

Sakai, M. 1999. Current research status of fish immunostimulants. **Aquaculture** 172: 63–92.

Salminen, S., E. Isolauri and E. Salminen. 1997. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. **Antonie van Leeuwenhoek** 70: 347–358.

Salminen, S., A. Ouwehand, Y. Benno and Y.K. Le. 1999. Probiotics: how should they be defined ?. **Trends. Food. Sci. Tech.** 10: 107–110.

Saulnier, D., P. Haffner, C. Goarant, P. Levy and D. Ansquer. 2000. Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review. **Aquaculture** 191: 133-144.

Schmetterer, G., C.P. Wolk and J. Elhai. 1986. Expression of luciferase from *Vibrio harveyi* and *Vibrio fischeri* in filamentous cyanobacteria. **J. Bacteriol.** 167(1): 411-414.

Scholz, U., G. Garcia-Diaz, D. Ricque, L.E. Cruz-Suarez, F. Vargas-Albores and J. Latchford. 1999. Enhancement of vibriosis resistance in juvenile *Penaeus vannamei* by supplementation of diets with different yeast product. **Aquaculture** 176: 271-283.

Scura, E.D. 1995. Dry seasons production problems on shrimp farms in Central America and the Caribbean Basin, pp. 200–213. *In* C.L. Browdy and J. S. Hopkins, ed. **Swimming Through Troubled Water**. Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture' 95. World Aquaculture Society, Baton Rouge, La.

Sindermann, C.J. 1990. **Principal Diseases of Marine Fish and Shellfish, 2 eds**. Academic Press.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Stanier, R.Y., M. Doudoroff and E.A. Adelberg. 1963. **The Microbial World**. Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, N.J.

Stoffels, G., I.F. Nes and A. Gudmundsdottir. 1992. Isolation and properties of a bacteriocinproducing *Carnobacterium piscicola* isolated from fish. **J. Appl. Bacteriol**. 73:309-326.

Sugita, H., N. Matsuo, Y. Hirose, M. Iwato and Y. Deguchi. 1997. *Vibrio* sp. strain NM10, isolated from the intestine of a Japanese coastal fish, has an inhibitory effect against *Pasteurella piscida*. **Appl. Environ. Microbiol**. 63: 4986–4989.

_____, R. Okano, Y. Suzuki, D. Mizukami, N. Akiyama and S. Matsuura. 2002. Antibacterial abilities of intestinal bacteria from larva and juvenile Japanese flounder against fish pathogens. **Fish. Sci**. 68: 1004-1011.

Tendencia, E.A. and L.D. de la Peña. 2001. Antibiotic resitance of bacteria from shrimp ponds. **Aquaculture** 195 (3-5): 193-204.

Tucker, C.S., R. Francis-Floyd and M.H. Beleau. 1989. Nitrite-induced anemia in channel catfish, *Ictularus punctatus* Rafinesque. **Bull. Environ. Contam. Toxicol**. 43: 295–310.

Vandenbergh, P. 1993. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. **FEMS Microbiol. Rev**. 12: 221–238.

Vattanaviboon, P. and S. Mongkolsuk. 2001. Unusaul adaptive, cross protection responses and growth phase resistance against peroxide killing in a bacterial shrimp pathogen, *Vibrio harveyi*. **FEMS Microbiol. Letters** 200: 111-116.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Venkateswara Rao, A. 2010. Bioremediation-The natural progression to restore the health of aquaculture pond ecosystem. **Asian Aquaculture.** 1(4): 18-25.

Verschuere, L., G. Rombaut, P. Sorgeloos and W. Verstraete. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 64: 655-669.

Westerdahl, A., C. Olsson, S. Kjelleberg and P. Conway. 1991. Isolation and characterization of turbot (*Scophthalmus maximus*) associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*. **Appl. Environ. Microbiol**. 57: 2223–2228.

Williams, S.T. and J.C. Vickers. 1986. The ecology of antibiotic production. **Microbial Ecol.** 12: 43–52.

Wittman, R.J. and G.J. Flick. 1995. Microbial contamination of shellfish: prevalence, rick to human health, and control strategies. **Annu. Rev. Public. Health** 16: 123-140.

Ziegler, M.M. and T.O. Baldwin. 1981. Biochemical bacteria bioluminescence. Curr. Top. Bioenerg. Citeds by G. Schmetterer, P. Wolk. And J. Elhai. 1986. Expression of luciferases from *Vibrio fischeri* in filamentous Cyanobacteria. **J. Bacteriol**. 167(1): 411-414.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ-สกุล	นางสาวปาจรีย์ จือเหลียง
วัน เดือน ปี ที่เกิด	26 พฤศจิกายน 2528
สถานที่เกิด	อำเภอปะเหลียน จังหวัดตรัง
ประวัติการศึกษา	วท.บ (ประมง) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ตำแหน่งปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ผลงานดีเด่นและ/หรือรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์