การเสริมแบคทีเรีย *Bacillus* P11 และ *Bacillus* S11 ในการเพาะเลี้ยงกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei*

นายภัทรพงศ์ ทรัพย์เจริญ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2553
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

SUPPLEMENTATION OF *Bacillus* P11 AND *Bacillus* S11 IN PACIFIC WHITE SHRIMP *Litopenaeus vannamei* CULTURE

Mr. Pattarapong Sapcharoen

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การเสริมแบคทีเรีย *Bacillus* P11 และ *Bacillus* S11 ในการเพาะเลี้ยงกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei*
โดย	นายภัทรพงศ์ ทรัพย์เจริญ
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

…….. คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

…… ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน)

…….. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

…… กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล)

…… กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร. อรพร หมื่นพล)

ภัทรพงศ์ ทรัพย์เจริญ : การเสริมแบคทีเรีย *Bacillus* P11 และ *Bacillus* S11 ในการเพาะเลี้ยงกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei* (SUPPLEMENTATION OF *Bacillus* P11 AND *Bacillus* S11 IN PACIFIC WHITE SHRIMP *Litopenaeus vannamei* CULTURE) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ. ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์, 118 หน้า.

ได้ศึกษาผลของการเสริม *Bacillus* S11 และ *Bacillus* P11 ในอาหารกุ้งและเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม *Litopenaeus vannamei* โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 4 กลุ่มได้แก่ 1) กลุ่มควบคุมเลี้ยงด้วยอาหารปกติ 2) กลุ่มที่เลี้ยงโดยอาหารผสม *Bacillus* S11 3) กลุ่มที่เลี้ยงโดยอาหารผสม *Bacillus* P11 และ 4) กลุ่มที่เลี้ยงโดยอาหารผสม *Bacillus* S11 ร่วมกับ *Bacillus* P11 พบว่า *Bacillus* S11 แสดงสมบัติเป็นโพรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งขาวได้ดีกว่า *Bacillus* P11 หลังจากการทำการเลี้ยงกุ้งด้วย *Bacillus* S11 เป็นเวลา 90 วันพบว่า กุ้งมีการเติบโตมากกว่ากุ้งกลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) การรอดชีวิตของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* S11 (71.43%) มากกว่ากลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* S11 ร่วมกับ *Bacillus* P11 (64.86%) และกลุ่มควบคุม (61.43%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ปริมาณฟีนอลออกซิเดส ปริมาณเม็ดเลือดรวม และปริมาณเม็ดเลือดกรานูลาร์ ในกุ้งกลุ่มที่ เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* S11 มีค่ามากกว่ากลุ่มการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) หลังจากทำการเหนี่ยวนำกุ้งให้เกิดโรคโดยการแช่ในถังที่มี *Vibrio harveyi* 639 (10^6 CFU ml $^{-1}$) เป็นเวลา 72 ชั่วโมงพบการตายสะสม (%) เท่ากับ 53.33, 40 และ 23.33 ในกุ้งกลุ่มควบคุม, กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* S11 ร่วมกับ *Bacillus* P11 และกุ้งกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* S11 ตามลำดับ

สาขาวิชา....เทคโนโลยีชีวภาพ..... ลายมือชื่อนิสิต.....

ปีการศึกษา.....2553..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

50724109 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORDS : *Bacillus subtilis* STRAIN S11 / *Bacillus subtilis* STRAIN P11 / PROBIOTICS / PACIFIC WHITE SHRIMP / *Litopenaeus vannamei*

PATTARAPONG SAPCHAROEN : SUPPLEMENTATION OF *Bacillus* P11 AND *Bacillus* S11 IN PACIFIC WHITE SHRIMP *Litopenaeus vannamei* CULTURE. ADVISOR : PROF. SIRIRAT RENGPIPAT, Ph.D., 118 pp.

Supplementation of *Bacillus* S11 and *Bacillus* P11 in feed for white shrimp *Litopenaeus vannamei* culture were studied. Four experiments as follows: *Bacillus* S11, *Bacillus* P11, *Bacillus* S11/*Bacillus* P11, supplemented feed, and a control feed without *Bacillus* spp. supplemented were prepared for shrimp cultivation. The result of 90 day cultured period showed that *Bacillus* S11 obtained more probiotic potential than *Bacillus* P11 for white shrimp cultivation. Growth of shrimp fed *Bacillus* S11 supplemented feed was significantly higher ($P<0.05$) than other group. Survival of shrimp fed *Bacillus* S11 supplemented feed (71.43%) was significantly higher ($P<0.05$) than shrimp fed *Bacillus* S11 and *Bacillus* P11 supplemented feed (64.86%) and control group (61.43%). Phenoloxidase, total haemocytes and granular haemocyte were more enhanced in shrimp fed *Bacillus* S11 supplemented feed than those of the control group significantly at $P<0.05$. After challenging with *Vibrio harveyi* 639 (~10^6 CFU ml $^{-1}$) by immersion for 72 hour, cumulative mortality (%) of 55.33, 40 and 20.33 were detected in shrimp control fed, *Bacillus* S11 and *Bacillus* P11/*Bacillus* S11 supplemented feed, respectively.

Field of Study : .....Biotechnology..... Student's Signature .....

Academic Year : .....2010..... Advisor's Signature .....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จลงได้โดยได้รับความกรุณาจาก รศ.ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ คำปรึกษา คำแนะนำ ตลอดจนข้อคิดเห็นต่างๆ รวมทั้งได้ช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ศิษย์ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร. สุเทพ ธนียวัน ที่กรุณารับเป็นประธานในการสอบและแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร. สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล และดร.อรพร หมื่นพล กรรมการในการสอบและแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณภาควิชาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาเอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือและสารเคมีในการทำวิจัย ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยา รวมทั้งเพื่อนๆ พี่ๆและน้องๆ ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกคน ที่ได้ให้กำลังใจ และช่วยเหลือให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงลงด้วยดี

ขอขอบคุณศูนย์เชี่ยวชาญด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือและสารเคมีในการทำงานวิจัย ขอขอบคุณคุณเสรี ดอนเหนือ และเจ้าหน้าที่หน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเลทุกๆท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงลงด้วยดี

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และญาติพี่น้องทุกท่าน ที่ได้ให้กำลังใจช่วยเหลือและสนับสนุน ตั้งแต่เริ่มต้นจนเสร็จสมบูรณ์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ฌ

สารบัญภาพ..... ฎ

บทที่

1 บทนำ..... 1

1.1 ความเป็นมา..... 1

1.2 วัตถุประสงค์..... 4

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 4

2 วารสารปริทัศน์..... 5

2.1 กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*)..... 5

2.2 กายวิภาคศาสตร์..... 6

2.3 การสืบพันธุ์..... 8

2.4 วงจรชีวิต..... 9

2.5 สภาพแวดล้อมในการเลี้ยง..... 11

2.6 โรคของกุ้งขาวแวนนาไม..... 12

2.7 เซลล์เม็ดเลือด..... 20

2.8 ระบบภูมิคุ้มกันโรคของกุ้งขาว..... 22

2.9 การใช้สารกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน (Immunostimulants) ในกุ้งขาว..... 28

2.10 โพรไบโอติก..... 29

2.11 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 34

3 วิธีดำเนินการวิจัย..... 37

3.1 อุปกรณ์ที่สำคัญ..... 37

3.2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในงานวิจัย..... 37

3.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง..... 38

3.4 วิธีดำเนินการวิจัย..... 38

บทที่ หน้า
4 ผลการทดลอง..... 45
5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง..... 72
รายการอ้างอิง..... 76
ภาคผนวก..... 86
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 118

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	หน้าที่การทำงานของอวัยวะที่สำคัญของกุ้ง	7
2	แสดงไวรัสที่พบในกุ้งและคุณลักษณะเฉพาะต่างๆ.....	13
3	แสดงหน้าที่ของเม็ดเลือดกุ้งขาว.....	21
4	คำนิยามของโพรไบโอติก.....	30
5	แสดงแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ใช้ในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม.....	32
6	แสดงผลการจัดจำแนกสายพันธุ์โดยชุดทดสอบ API 50 CHB.....	47
7	จำนวน *Bacillus* S11 และ *Bacillus* P11 ต่อกรัมในอาหารกุ้งขาวแวนนาไม.....	52
8	คุณภาพน้ำระหว่างการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในการทดลองครั้งที่ 1.....	54
9	ปริมาณแบคทีเรียในน้ำระหว่างการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในการทดลองครั้งที่ 1.....	55
10	ปริมาณแบคทีเรียในลำไส้กุ้งขาวแวนนาไมหลังทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน ในการทดลองครั้งที่ 1.....	56
11	ปริมาณ *Vibrio* spp. ในลำไส้กุ้งขาวแวนนาไมหลังทำการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 639 เป็นเวลา 72 ชั่วโมงในการทดลองครั้งที่ 1.....	61
12	คุณภาพน้ำระหว่างการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในการทดลองครั้งที่ 2.....	64
13	ปริมาณแบคทีเรียในน้ำระหว่างการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในการทดลองครั้งที่ 2.....	65
14	ปริมาณแบคทีเรียในลำไส้กุ้งขาวแวนนาไมหลังทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 90 วัน ในการทดลองครั้งที่ 2.....	66
15	การตายสะสม (%) ของกุ้งขาวแวนนาไม เมื่อชักนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* 639 จากการทดลองครั้งที่ 2 เมื่อเวลา 72 ชั่วโมง.....	70
16	ปริมาณแบคทีเรียในลำไส้กุ้งขาวแวนนาไมหลังทำการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 639 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในการทดลองครั้งที่ 2.....	71
17	ค่า OD 660 กับเวลา ของ *B. subtilis* S11 ในอาหาร TSB.....	102
18	ค่า OD 660 กับเวลา ของ *B. subtilis* S11 ที่เติมด้วยส่วนน้ำใสของ *Bacillus* P11ในอาหาร TSB.....	104

ตารางที่		หน้า
19	ค่า OD 660 กับเวลา ของ *B. subtilis* P11 ในอาหาร TSB.....	106
20	ค่า OD 660 กับเวลา ของ *B. subtilis* P11 ที่เติมด้วยส่วนน้ำใสของ *Bacillus* S11ในอาหาร TSB……	108
21	ผลน้ำหนักกุ้งขาว การทดลองครั้งที่ 1……..……	111
22	ผลน้ำหนักกุ้งขาว การทดลองครั้งที่ 2……...	111
23	ผลน้ำหนักกุ้งขาวที่เพิ่มขึ้น การทดลองครั้งที่ 2……	111
24	การรอดชีวิตของกุ้งขาวดำหลังจากทดลองครั้งที่ 1……..	112
25	การรอดชีวิตของกุ้งขาวหลังจากทดลองครั้งที่ 2.....	112
26	การตายสะสมหลังทดสอบการชักนำให้เกิดโรค (challenge test) โดยการแช่ (immersion) *Vibrio harveyi* ในการทดลองครั้งที่ 1……	113
27	การตายสะสมหลังทดสอบการชักนำให้เกิดโรค (challenge test) โดยการแช่ (immersion) *Vibrio harveyi* ในการทดลองครั้งที่ 2……	113
28	ปริมาณแบคทีเรียในน้ำระหว่างการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวในการทดลองครั้งที่ 1.....	114
29	ปริมาณแบคทีเรียในน้ำระหว่างการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวในการทดลองครั้งที่ 2……	115
30	ปริมาณเลือดรวม (total hemocyte) และปริมาณเม็ดเลือดกรานูลาร์ (granular hemocyte) ก่อนและหลังเหนี่ยวนำให้เกิดโรคในการทดลองครั้งที่ 1……	116
31	ปริมาณเลือดรวม (total hemocyte) และปริมาณเม็ดเลือดกรานูลาร์ (granular hemocyte) ก่อนและหลังเหนี่ยวนำให้เกิดโรคในการทดลองครั้งที่ 2……..	116
32	ปริมาณฟีนอลออกซิเดส (unit/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน) ก่อนและหลังเหนี่ยวนำให้เกิดโรคในการทดลองครั้งที่ 1……	117
33	ปริมาณฟีนอลออกซิเดส (unit/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน) ก่อนและหลังเหนี่ยวนำให้เกิดโรคในการทดลองครั้งที่ 2.....	118

สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
1	ผลผลิตกุ้งในประเทศไทยระหว่างกุ้งกุลาดำ (Penaeus monodon) กับกุ้งขาวแวนนาไม (Litopenaeus vannamei) ระหว่างปี 1996 – 2008.....	1
2	ปริมาณและมูลค่าการส่งออกกุ้งในรอบ 10 ปี (2544-2553).....	2
3	ลักษณะภายนอกทั่วไปของกุ้งขาวแวนนาไม.....	6
4	วงจรชีวิตของกุ้งขาวแวนนาไม.....	9
5	กุ้งวัยอ่อนระยะต่างๆ.....	10
6	แสดงเม็ดเลือดของกุ้งทั้ง 3 ชนิด เมื่อถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์.....	21
7	กลไกการป้องกันตัวเองของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง.....	22
8	แสดงระบบภูมิคุ้มกันโรคของกุ้ง.....	24
9	แสดงกลไลการทำงานของฟีนอลออกซิเดส.....	27
10	ลักษณะเซลล์ของ *Bacillus* S11 อายุ 24 ชม. (ก) และลักษณะของสปอร์ *Bacillus* S11 อายุ 48 ชม. (ข).....	45
11	ลักษณะเซลล์ของ *Bacillus* P11 อายุ 24 ชม. (ก) และลักษณะของสปอร์ *Bacillus* S11 อายุ 48 ชม. (ข).....	46
12	การยับยั้งการเจริญของ *Bacillus* S11 โดย *Bacillus* P11 (ก) และการยับยั้งการเจริญของ *Bacillus* P11 โดย *Bacillus* S11 (ข).....	49
13	ความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD660 กับเวลา ของ *B. subtilis* S11 และ *B. subtilis* S11 ที่เติมด้วยส่วนน้ำใสของ *Bacillus* P11.....	50
14	ความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD660 กับเวลา ของ *B. subtilis* P11 และ *B. subtilis* P11 ที่เติมด้วยส่วนน้ำใสของ *Bacillus* S11.....	51
15	น้ำหนักตัวเฉลี่ย (ก) และน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (ข) ของกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงอาหารชนิดต่างๆ ในการทดลองครั้งที่ 1.....	54
16	การรอดชีวิตเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วันและ 60 วันของกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงด้วยอาหาร 4 ชนิด ในการทดลองครั้งที่ 1.....	57

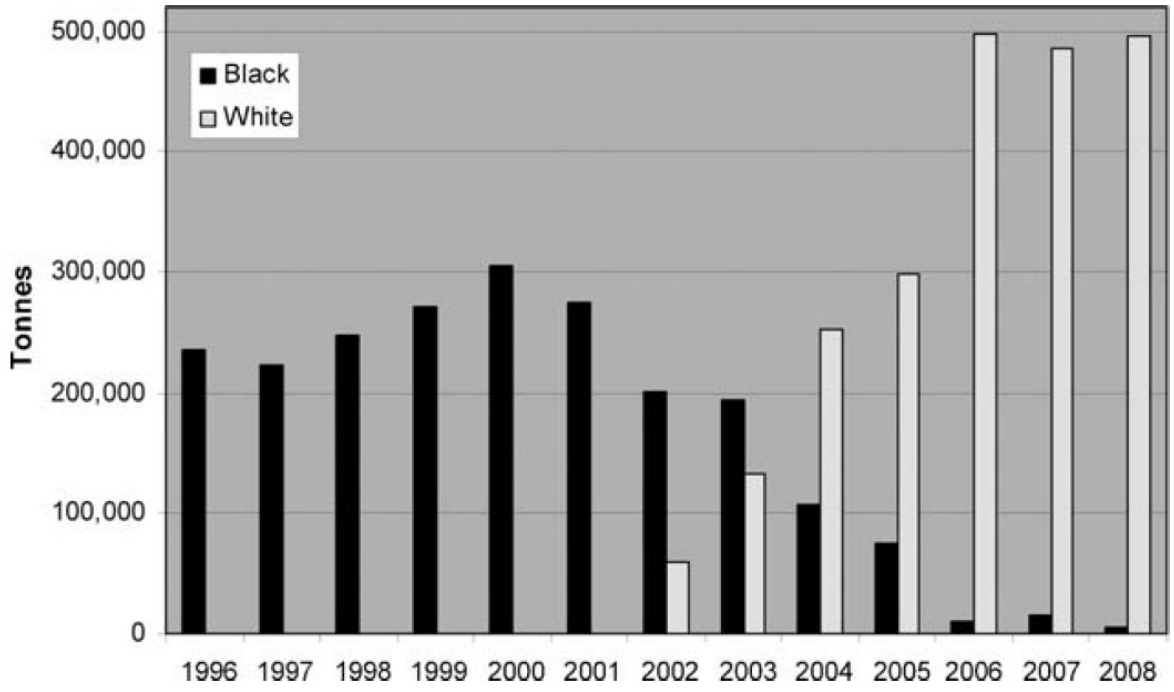
รูปที่		หน้า
17	ปริมาณเม็ดเลือดรวม (total hemocyte) (ก) และปริมาณเม็ดเลือดกรานูลาร์ (granular hemocyte) (ข) ของกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงด้วยอาหาร 4 ชนิด ก่อนและหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* 639 ในการทดลองครั้งที่ 1เมื่อกุ้งอายุ 60 วัน.....	59
18	ปริมาณเม็ดฟีนอลออกซิเดส (unit/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน) ของกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงด้วย อาหารชนิดต่างๆ ก่อนและหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* 639 ในการทดลองครั้งที่ 1เมื่อกุ้งอายุ 60 วัน.....	60
19	การตายสะสมของกุ้งขาวแวนนไม เมื่อชักนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* 639 จากการทดลองครั้งที่ 1.....	61
20	น้ำหนักตัวเฉลี่ย (ก) และน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (ข) ของกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงด้วยอาหาร 3ชนิด ในการทดลองครั้งที่ 2.....	63
21	การรอดชีวิตเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30, 60 และ 90 วันของกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงด้วย 4 ชนิด ในการทดลองครั้งที่ 2.....	64
22	ปริมาณเม็ดเลือดรวม (total hemocyte) (ก) และปริมาณเม็ดเลือดกรานูลาร์ (granular hemocyte) (ข) ของกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงด้วยอาหาร 3 ชนิด ก่อนและหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* 639 ในการทดลองครั้งที่ 2 เมื่อกุ้งอายุ 90 วัน.....	68
23	ปริมาณฟีนอลออกซิเดส (unit/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน) ของกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงด้วยอาหาร 3 ชนิด ก่อนและหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* 639 ในการทดลองครั้งที่ 2 เมื่อกุ้งอายุ 90 วัน.....	69
24	การตายสะสมของกุ้งขาวแวนนาไม เมื่อชักนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* 639 จากการทดลองครั้งที่ 2.....	70
25	ความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD660 กับเวลา ของ *B. subtilis* S11	103
26	ความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD660 กับเวลา ของ *B. subtilis* S11ที่เติมด้วยส่วนน้ำใสของ *Bacillus* P11	105
27	ความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD660 กับเวลา ของ *B. subtilis* P11.....	107
28	ความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD660 กับเวลา ของ *B. subtilis* S11ที่เติมด้วยส่วนน้ำใสของ *Bacillus* P11.....	109

บทที่ 1

บทนำ

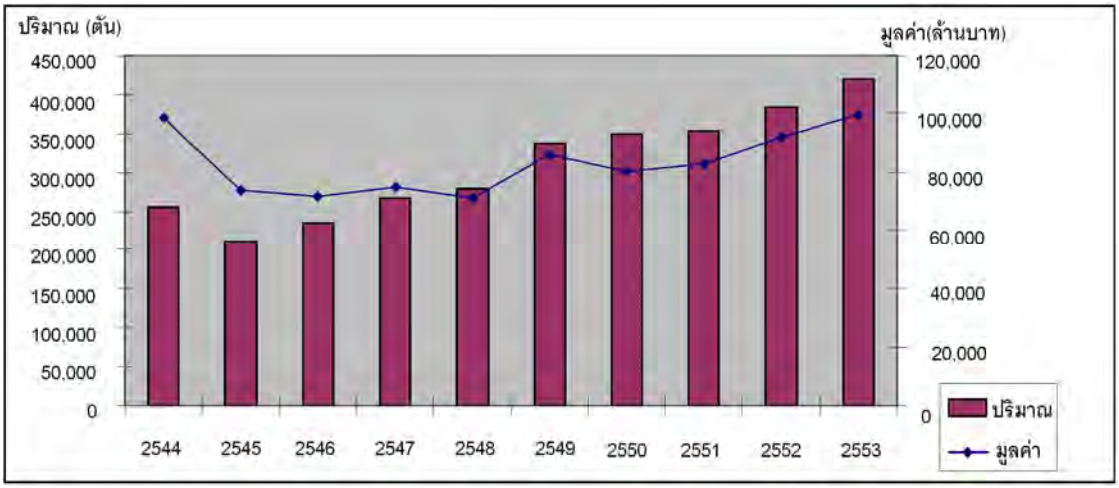
1.1 ความเป็นมา

กุ้งเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย กว่า 30 ปีที่ผ่านมาอาชีพเลี้ยงกุ้งได้สร้างรายได้ให้แก่ผู้ประกอบการและประเทศชาติมาแล้วหลายแสนล้านบาท ประกอบกับประเทศไทยมีปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงและเพาะพันธุ์กุ้ง การเลี้ยงกุ้งจึงเป็นอาชีพที่ได้รับความสนใจในการลงทุนจากบุคคลทั่วไป ปัจจุบันกุ้งกุลาดำในประเทศไทยประสบปัญหากุ้งโตช้า ทำให้เกษตรกรส่วนใหญ่เปลี่ยนมาเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม ซึ่งเป็นกุ้งที่มีการพัฒนาสายพันธุ์มาแล้ว ทำให้มีการเจริญเติบโตรวดเร็วกว่ากุ้งกุลาดำ เลี้ยงง่ายและให้ผลผลิตสูงอีกทั้งกุ้งขาวมีราคาต่อน้ำหนักที่สูงกว่ากุ้งกุลาดำ ทำให้ปัจจุบันการเลี้ยงกุ้งกุลาดำเหลือเพียง 2-3% ของพื้นที่เลี้ยงกุ้งทั้งหมด (รูปที่ 1) (ทีมงานข่าวกุ้ง, 2551) ซึ่งนับเป็นจุดเริ่มต้นซึ่งส่งผลให้กุ้งขาวเป็นกุ้งเศรษฐกิจชนิดใหม่ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งของประเทศไทย



รูปที่ 1 ผลผลิตกุ้งในประเทศไทยระหว่างกุ้งกุลาดำ (Penaeus monodon) กับกุ้งขาวแวนนาไม (Litopenaeus vannamei) ระหว่างปี 1996 – 2008 (Lebel, 2010)

10 ปีที่ผ่านมา (พ.ศ.2544 – 2554) ประเทศไทยส่งออกกุ้งและผลิตภัณฑ์กุ้งทำรายได้ร้อยละ 41 ของมูลค่าการส่งออกสินค้าประมงทั้งหมด ซึ่งนับเป็นสินค้าประมงที่ส่งออกมากที่สุด โดยมีมูลค่า การส่งออกเฉลี่ยปีละ 309,256 ตัน มูลค่า 83,200 ล้านบาท โดยกุ้งที่ส่งออกมากที่สุดได้แก่กุ้งขาว มูลค่าเฉลี่ย 63,911 ล้านบาทต่อปี หรือเท่ากับร้อยละ 76.81 ของกุ้งที่ส่งออกทั้งหมด (รูปที่ 2) (ประพันธ์ โนระดี, 2554)



รูปที่ 2 ปริมาณและมูลค่าการส่งออกกุ้งในรอบ 10 ปี (2544-2553)

ปัจจุบันสภาพลมฟ้าอากาศ ฤดูการต่างๆมีความเปลี่ยนแปลงไปจากอดีตเป็นอย่างมาก ไม่ว่าจะเป็นฤดูการที่ผิดไปจากเดิม มีฤดูร้อนที่ยาวนานขึ้น และอุณหภมิสูงขึ้นผิดปกติ มีมรสุม พายุและไต้ฝุ่นขนาดใหญ่ๆ รุนแรงมากและบ่อยครั้งขึ้น ซึ่งภาวะต่างๆดังที่กล่าวมานั้นเรียกว่า ภาวะภูมิอากาศเปลี่ยนแปลง (Climate Change) การผลิตกุ้งซึ่งเป็นสัตว์เลือดเย็นนั้น ได้รับผลกระทบเป็นอย่างมากจากภาวะภูมิอากาศที่เปลี่ยนแปลง โดยส่งผลกระทบในทุกๆ กระบวนการตั้งแต่การผลิตแพลงก์ตอน การจัดการพ่อแม่พันธุ์และนอเพลียส การเลี้ยงลูกกุ้ง การจัดการในโรงเพาะฟักกุ้งในปัจจุบันจึงเป็นไปได้อย่างยากลำบากมากขึ้น (ทีมงานข่าวกุ้ง, ก.ค. 2553) นอกจากนี้ในรอบหลายปีที่ผ่านมาโลกของเราได้ประสบภัยธรรมชาติร้ายแรงทั่วโลกรวมถึงประเทศไทยเช่น การเกิดวิกฤตการณ์คลื่นสึนามิ พัดถล่มชายฝั่งทะเลอันดามันใน 6 จังหวัดภาคใต้ในปลายปี 2547 (ทีมงานข่าวกุ้ง, ธค. 2548) การเกิดน้ำท่วมภาคใต้ในปี 2553 และ 2554 จากเหตุการณ์ที่กล่าวมาข้างต้นได้ก่อให้เกิดความสูญเสียในอุตสาหกรรมกุ้ง เพราะภาคใต้เป็นแหล่งเลี้ยงกุ้งอันดับ 2 รองจากภาคตะวันออก โดยมีสัดส่วนกุ้งจากทางภาคใต้ราว 40% ของผลผลิตกุ้งทั้งหมด

นอกจากปัญหาทางด้านสภาวะภูมิอากาศและภัยธรรมชาติแล้ว ประเทศผู้นำเข้ากุ้งยังมีการกีดทางการค้าในรูปแบบต่างๆเช่น การประกาศร่างวิเคราะห์ความเสี่ยงในการนำเข้ากุ้ง Import Risk Analysis (IRA) ของประเทศออสเตรเรีย การประกาศนำเข้าสินค้ากุ้งของห้างต่างๆใน

ประเทศสหรัฐอเมริกา ที่ต้องให้ผ่านการรับรองมาตรฐาน Best Aquaculture Practices (BAP) การประกาศระดับการตกค้างของสารปฏิชีวนะในสินค้ากุ้งที่ระดับไม่ตรวจพบเลย (Zero Tolerance) ของสหภาพยุโรป หรือการใช้มาตรการอนุรักษ์ธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมมาเป็นข้อกีดกันทางการค้า กรมประมงจึงได้พัฒนาระบบการผลิตตั้งแต่การเพาะเลี้ยงจนถึงการจับสัตว์น้ำ ซึ่งสนับสนุนการเลี้ยงกุ้งทะเลอย่างปลอดภัย ไร้สารพิษเพื่อให้เกษตรกรไทยจัดระบบการผลิตให้ได้มาตราฐานสากลโดยมี การจัดระบบเป็นสองระบบได้แก่ การจัดระบบการจัดการสิ่งแวดล้อมสำหรับอุสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลอย่างยั่งยืนตลอดสายการผลิตจากฟาร์มถึงโรงงานแปรรูปเพื่อพัฒนาให้ได้กุ้งคุณภาพมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค หรือ Code of Conduct (COC) และการผลิตกุ้งมาตราฐานจีเอพี Good Aquaculture Practice (GAP) ซึ่งทั้งสองระบบมีจุดประสงค์เพื่อผลิตกุ้งทะเลให้มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค ทำให้ฟาร์มเลี้ยงกุ้งทะเลถูกสุขลักษณะที่ดี ป้องกันการใช้ยาและสารเคมีในขณะเลี้ยงกุ้งและไม่ให้มีสารตกค้างในเนื้อกุ้ง

จากเหตุผลที่กล่าวมาทั้งหมดการเลี้ยงกุ้งในปัจจุบันจึงมุ่งเน้นให้กุ้งเจริญเติบโตได้เร็ว มีสุขภาพแข็งแรง และป้องกันการเกิดโรคโดยเน้นที่การจัดการการเลี้ยง และเสริมความต้านทานให้โรคให้กับกุ้งเพื่อลดการใช้สารปฏิชีวนะ หนึ่งในวิธีที่กำลังได้รับความสนใจคือการใช้จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกเสริมในอาหารกุ้ง เพื่อสร้างสมดุลให้กับระบบทางเดินอาหาร และปรับสิ่งแวดล้อมรอบตัวกุ้ง (Gatesoupe, 1999) ส่งผลให้กุ้งมีสุขภาพดีเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว ทนต่อโรคต่างๆได้มากขึ้น

Rengpipat และคณะ (1998a) รายงานการคัดแยก *Bacillus* spp. จากทางเดินอาหารกุ้งกุลาดำจากจังหวัดเพชรบุรี จังหวัดฉะเชิงเทรา จังหวัดสมุทรปราการ และจังหวัดสมุทรสาคร และคัดเลือกได้ *Bacillus* S11 ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกมาผสมอาหารกุ้งกุลาดำและเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำเป็นระยะเวลา 100 วันในระบบน้ำหมุนเวียนแบบปิด พบว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสม *Bacillus* S11 มีการเจริญเติบโตและมีการรอดชีวิตมากกว่ากุ้งกุลาดำที่ไม่ได้รับอาหารที่ผสม *Bacillus* S11 อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) และหลังจากนำมาทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคจาก *V. harveyi* เป็นเวลา 10 วันพบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารผสม *Bacillus* S11 มีการรอดชีวิต 100% ในขณะที่กลุ่มที่ไม่ได้รับอาหารผสม *Bacillus* S11 มีการรอดชีวิต 26% ผลการทดลอง *Bacillus* S11 สนับสนุนความเป็นไปได้ที่ *Bacillus* sp. สามารถแข็งขันและยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค (Gullian ,2004)

นอกจากการใช้ *Bacillus* S11 แล้วยังมีรายงานการใช้โพรไบโอติก *Bacillus* P11 สำหรับเสริมในอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำเพื่อป้องกันการเกิดโรคจาก *V. harveyi* (ศิริเพ็ญ สังข์ชัย, 2546) คัดแยกแบคทีเรีย *Bacillus* P11 จากทางเดินอาหารของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำจากจังหวัดชลบุรีและจังหวัดตรัง ผสม *Bacillus* P11 กับอาหารกุ้งกุลาดำในอัตราส่วนเซลล์สด 1 ส่วน : อาหารกุ้ง 4 ส่วน นำไปทดลองเลี้ยงกุ้งเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมในบ่อปูนซีเมนขนาด 400 ลิตรเป็นเวลา 100 วัน พบว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* P11 มีการเจริญเติบโต, เปอร์เซ็นการรอดชีวิตรวมทั้งสามารถต้านทานการเกิดโรคเรืองแสงจาก *V. harveyi* ดีกว่ากุ้งกุลาดำในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) และเมื่อนำเนื้อกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในอาหารผสม *Bacillus* P11 ไปตรวจหาสารปฏิชีวนพบว่าไม่พบสารปฏิชีวนะตกค้างในเนื้อกุ้งกุลาดำ และเมื่อเสริม *Bacillus* P11 ในการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำในภาคสนาม (พลพิสิฐ อุทิศวรรณกุล, 2548) พบว่าให้ผลการทดลองสอดคล้องกับการทดลองข้างต้นคือเมื่อนำกุ้งที่เสริมด้วยอาหารผสม *Bacillus* P11 เพาะเลี้ยงกุ้งในบ่อดินเป็นระยะเวลา 120 วันพบว่ากุ้งมีการเจริญเติบโต ได้ดีกว่ากุ้งในกลุ่มควบคุมและเมื่อเหนี่ยวนำให้เกิดโรคเรืองแสงด้วย *V. harveyi* พบว่ามีการตายสะสมน้อยกว่ากุ้งกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อนำ *Bacillus* S11 ซึ่งสามารถต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคจาก *V.harveyi* ได้ดีและ *Bacillus* P11 ซึ่งทำให้กุ้งเจริญเติบโตได้ดี เตรียมเป็น mixed culture เสริมในอาหารเลี้ยงกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei* เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการเสริมการเจริญเติบโตและความต้านทานโรคของกุ้งขาว

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

ติดตามผลของการเสริม *Bacillus* S11 และ/หรือ *Bacillus* P11 ในการเพาะเลี้ยงกุ้งขาว

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้อาหารที่เสริมด้วยแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกที่เหมาะสำหรับการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม

ได้กุ้งเจริญเติบโตได้เร็ว มีสุขภาพแข็งแรง ทนต่อโรคต่างๆได้มากขึ้น และไม่มีตกค้างในเนื้อกุ้ง ทำให้ไม่เป็นปัญหาต่อการส่งออก

บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

2.1 กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*)

กุ้งขาวแวนนาไม เป็นกุ้งขาวพื้นเมืองในมหาสมุทรแปซิฟิกพบตามธรรมชาติตั้งแต่ชายฝั่งทะเลของประเทศสหรัฐอเมริกาเม็กซิโกจนถึงชายฝั่งประเทศเปรู มีการเลี้ยงกันมากในทวีปอเมริกาใต้หลายประเทศเช่น เอกวาดอร์ เม็กซิโก เปรู ปานามา ฮอนดูรัส โคลัมเบีย บราซิล ฯลฯ (Rosenberry, 1993; FAO, 1994) ในประเทศไทยได้มีผู้นำเข้ามาทดลองเลี้ยงเมื่อปี 2541 แต่การเลี้ยงครั้งนั้นยังไม่ประสบความสำเร็จมากนัก ประกอบกับมีปัญหาเรื่องการขายและการนำเข้ากุ้งขาวที่มีกฎหมายห้ามนำเข้าอยู่ จนกระทั่ง เดือนมีนาคม พ.ศ. 2545 กรมประมงได้อนุญาตให้นำพ่อพันธุ์แม่พันธุ์ที่ปลอดเชื้อจากต่างประเทศเข้ามาทดลองเลี้ยง ซึ่งเป็นช่วงเวลาเดียวกับที่การเลี้ยงกุ้งกุลาดำในประเทศไทยประสบปัญหากุ้งโตช้า ทำให้เกษตรกรหันมาเลี้ยงกุ้งขาวมากขึ้น

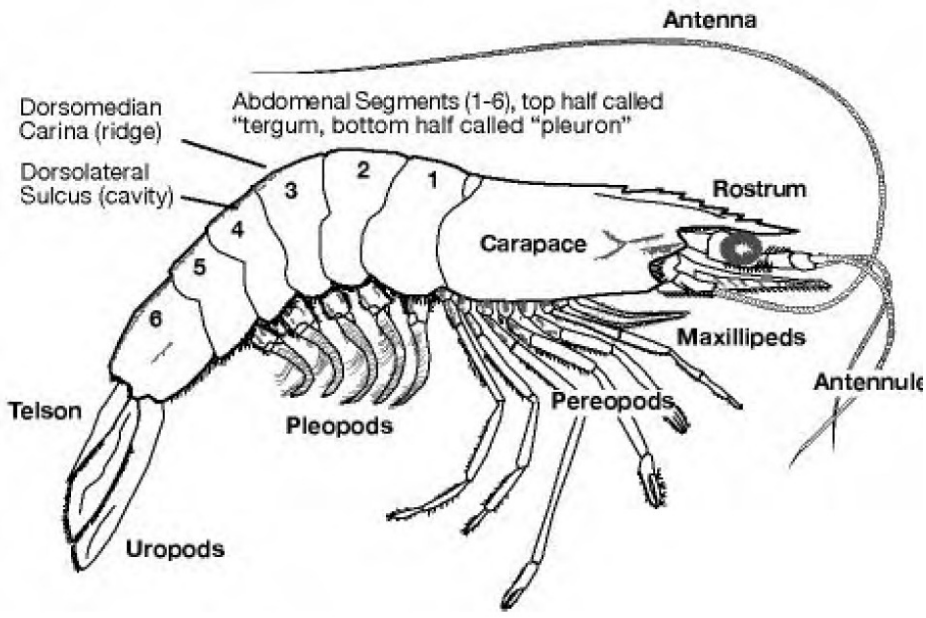
กุ้งขาวแวนนาไม มีชื่อเรียกภาษาอังกฤษว่า Whiteleg shrimp ชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Litopenaeus vannamei* มีการจัดอนุกรมวิธานของกุ้งสายพันธุ์นี้ ดังนี้

Phylum Arthropoda
Class Crustacea
Subclass Malacostraca
Order Decapoda
Family Penaeidae
Genus Penaeus
Subgenus Litopenaeus
Species *Litopenaeus vannamei*

(Farfante และ Kenley, 1997)

2.2 กายวิภาคศาสตร์

ลักษณะโครงสร้างโดยทั่วไปของกุ้งขาวแวนนาไมมีลักษณะประจำ Phylum – Arthropoda คือเป็นสัตว์ประเภทมีลำตัวเป็นข้อปล้อง Class – Crustacea คือมีเปลือกแข็งหุ้มตัว Order – Decapoda มีลักษณะคือมี 10 ขา Family – Penaeidae มีลักษณะประจำตระกูลคือจะวางไข่ออกมานอกตัวแล้วฟักเป็นตัวอ่อนระยะนอเพลียสและ Subgenus – *Litopenaeus* คือมีอวัยวะเพศเมียแบบเปิด ลักษณะโครงสร้างอื่นๆได้แก่ ลำตัวมี 8 ปล้องและมีสีขาว หน้าอกใหญ่ การเคลื่อนไหวเร็ว ส่วนหัวมี 1 ปล้อง มีกรีอยู่ในระดับยาวประมาณ 0.8 เท่าของความยาวเปลือกหัวสันกรีสูง ปลายกรีแคบ ส่วนของกรีมีลักษณะเป็นสามเหลี่ยมมีสีแดงอมน้ำตาล มีฟันกรีด้านบนมี 8-9 ฟัน ฟันกรีด้านล่างมี 1-2 ฟัน ร่องบนกรีมองเห็นได้ชัด เปลือกหัวสีขาวอมชมพูถึงแดง มีขนบางๆบนเปลือก ขาเดินมีสีขาวเป็นลักษณะที่โดดเด่น หนวดแดง 2 เส้นยาว ตาแดงเข้ม ส่วนตัวมี 6 ปล้อง เปลือกตัวสีขาวอมชมพูถึงแดง เปลือกบาง ขาว่ายน้ำ 5 คู่ มีสีขาวข้างในที่ปลายมีสีแดง ส่วนหางมี 1 ปล้อง ปลายหางมีสีแดงเข้ม แพนหางมี 4 ใบและ 1 กรีหาง ขนาดตัวที่โตสมบูรณ์เต็มที่ของกุ้งสายพันธุ์นี้จะมีขนาดที่เล็กกว่ากุ้งกุลาดำ หากินทุกระดับความลึกของน้ำ ชอบว่ายล่องน้ำแก่ง ลอกคราบเร็วทุกๆสัปดาห์ ไม่หมกตัว โดยอวัยวะและหน้าที่การทำงานของแต่ละอวัยวะที่สำคัญแสดงในรูปที่ 3 และตารางที่ 1



รูปที่ 3 ลักษณะภายนอกทั่วไปของกุ้งขาวแวนนาไม (Rosenberry, 2005)

ตารางที่ 1 หน้าที่การทำงานของอวัยวะที่สำคัญของกุ้ง (ที่มา: ธนพงศ์ แสงชื่อ, 2546)

อวัยวะ	หน้าที่การทำงาน
กล้ามเนื้อส่วนท้อง (Abdominal Striated Muscle)	ว่ายถอยหลังอย่างรวดเร็วสำหรับหนีศัตรู
หนวดคู่ที่ 1 (Antenules)	รับประสาทสัมผัสเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงทางเคมี
อวัยวะรับสัมผัสที่โคนหนวด	ปรับสมดุลของแร่ธาตุในร่างกาย (osmosis) และขับถ่าย
หนวดคู่ที่ 2 (Antennae)	รับประสาทสัมผัสเกี่ยวกับการป้องกันภัยและศัตรู
เปลือก (Exoskeleton)	โครงร่างค้ำจุนร่างกายและป้องกันอันตราย
ทางเดินอาหารส่วนต้น (Foregut) : ปาก, คอหอย, กระเพาะอาหาร	กิน, บทเคี้ยวและกักเก็บอาหารชั่วคราว
เหงือก (Gills)	หายใจ, ขับถ่ายของเสีย, ปรับสมดุลแร่ธาตุในร่างกายและดักจับเชื้อโรค
ตับและตับอ่อน (Hepatopancreas)	ย่อยอาหาร, ดูดซึมและสะสมสารอาหาร
อวัยวะระบบน้ำเหลือง (Lymphoid)	ควบคุมการกำจัดสิ่งแปลกปลอมและดักจับเชื้อโรค
Mandibles, Mandibular palps, Gill balers	รับประสาทสัมผัส, นำอาหารเข้าปาก, และพัดโบกน้ำผ่านเหงือก
ลำไส้ส่วนกลาง (Midgut)	ดูดซึมสารอาหารและขับถ่าย
ขาเดินและขาว่ายน้ำ (Pereiopods and Pleopods)	เคลื่อนที่และรับประสาทสัมผัสเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงทางเคมี

2.3 การสืบพันธุ์

ในการผสมพันธุ์ กุ้งขาวแวนนาไมจะผสมพันธุ์ในเวลากลางคืน หลังจากมีการลอกคราบของตัวเมียที่ความลึก 10-15 เมตร ถึง 30-50 เมตร เริ่มจากตัวเมียจะว่ายน้ำขนานไปกับตัวผู้ โดยตัวจะว่ายอยู่สูงกว่า มักจะมีตัวผู้ว่ายตามหลายตัว แต่จะมีตัวเดียวที่สามารถว่ายเข้ามาซ้อนอยู่ด้านล้างของตัวเมียพอดี แล้วตัวเมียจะค่อยๆ ใช้ขาเดินโอบรัดส่วนหัว (carapace) ของตัวผู้ ตัวผู้จะค่อยๆ หงายขึ้นมาติดตัวเมีย พอทั้งคู่ประกับกันได้ตัวผู้จะแน่นส่วนต่อของอกกับท้องเข้ากับส่วนนอกด้านล่างของตัวเมีย หลังจากนั้นตัวผู้จะทำตัวเกือบตั้งจากกับตัวเมีย ต่อจากนั้นกุ้งเพศผู้จะสอดอวัยวะเพศที่เรียกว่า petasma ซึ่งเกิดตากแขนงด้านในทั้ง 2 ข้างของขาว่ายน้ำคู่รกที่เชื่อมติดกันเข้าไปในอวัยวะเพศเมียที่เรียกว่า thelycum ซึ่งเปลี่ยนแปลงมาจากผนังด้านท้อง (sternal plate) ของระยางค์ส่วนอกปล้องที่ 7 และ 8 หรือตรงกับขาเดินคู่ที่ 4-5 ที่พัฒนามาเป็นถุงเก็บน้ำเชื้อแล้วปล่อยน้ำเชื้อเข้าไปเก็บในถุงเก็บน้ำเชื้อในเพศเมียเพื่อรอโอกาสที่จะผสมกับไข่ในภายหลัง ไข่ที่แก่และสุกเต็มที่แล้วจะถูกปล่อยออกมาทางช่องเพศบริเวณโคนขอคู่ที่ 3 และได้รับการผสมกับน้ำเชื้อเพศผู้ ซึ่งขับออกมาจากถุงเก็บน้ำเชื้อทางรูเปิดเล็กๆ บริเวณขาคู่ที่ 4-5 ของเพศเมีย

การพัฒนาของรังไข่จะเริ่มอย่างช้าๆจนกระทั่งวางไข่ ซึ่งสังเกตได้จากสีของรังไข่ Liao และ Chen (1983) ได้กล่าวว่า สีของรังไข่สามารถแบ่งออกเป็น 4 ระยะ ได้แก่

ระยะที่ 1 undeveloped stage เป็นระยะที่ยังไม่มีการพัฒนาของรังไข่ ช่วงนี้รังไข่จะมีสีขาวใส

ระยะที่ 2 developing stage เป็นระยะที่ไข่มีการพัฒนา รังไข่จะมีสีเหลืองหรือแดง

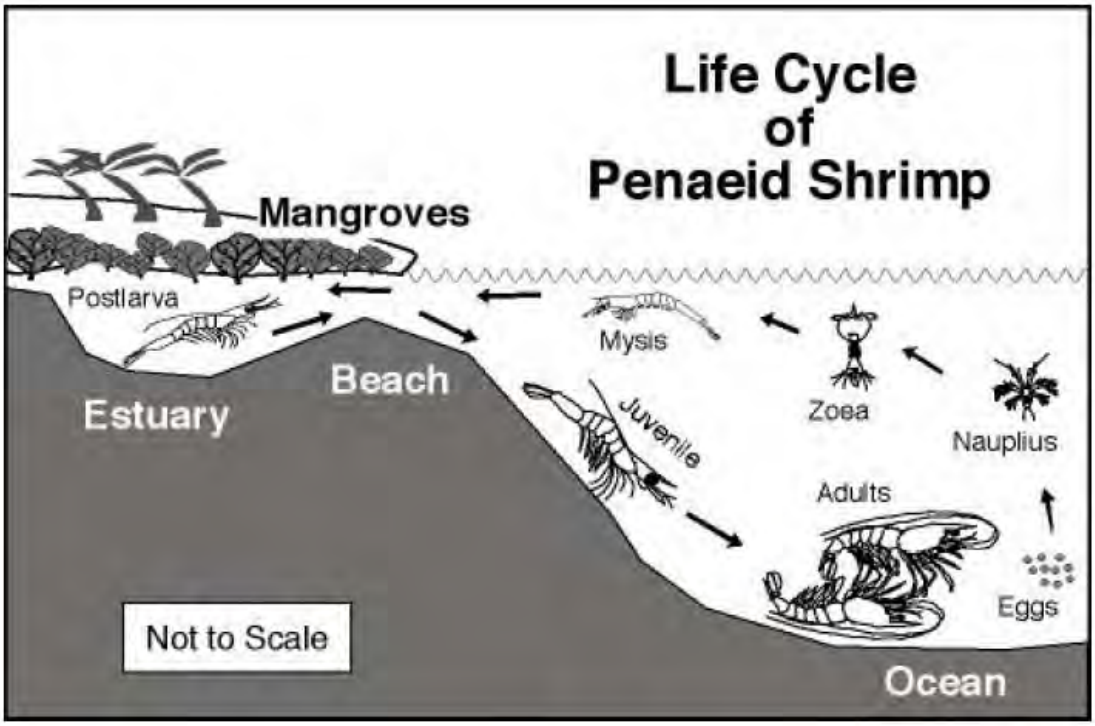
ระยะที่ 3 early ripe stage เป็นระยะที่ไข่ใกล้จะสุก รังไข่จะมีสีน้ำตาลทอง

ระยะที่ 4 ripe stage เป็นระยะที่ไข่ใกล้จะสุกเต็มที่ รังไข่จะมีสีน้ำตาลอมเขียว

แม่กุ้งที่มีไข่แก่พร้อมจะวางไข่นั้นสามารถสังเกตเห็นรังไข่มีเขียวเกือบดำอยู่บนแถบหลังของลำตัวตั้งแต่บริเวณหลัง ไปจรดหางและตรงบริเวณด้านข้างของลำตัว ตรงปล้องที่ 1-2 จะเห็นรังไข่แผ่ขยายออกไปเป็นหยักๆ โค้งลงมาทางด้านข้างของลำตัวทั้งสองข้าง ก่อนทำการวางไข่แม่กุ้งจะว่ายน้ำอย่างรวดเร็วเป็นเวลา 45-60 วินาที ขณะทำการวางไข่แม่กุ้งจะว่างน้ำอย่างช้าๆ ระหว่างที่กำลังวางไข่นี้ขาเดิน 3 คู่สุดท้ายจะแนบติดกันแล้วขยับกาง หุบ เพื่อช่วยให้ไข่และน้ำเชื้อผสมกัน แม้กุ้งจะใช้เวลาวางไข่ครั้งหนึ่งประมาณ 3-5 นาที ไข่จะเกิดการปฏิสนธิในน้ำแล้วค่อยๆ จมลงสู่พื้นเนื่องจากเป็นไข่ประเภทไข่จม (demersal eeg) เพราะมีความหนาแน่นกว่าน้ำทะเล

2.4 วงจรชีวิต

ในธรรมชาติกุ้งขาวจะมีอายุไขประมาณ 36 เดือน โดยเริ่มจากไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิจะมีลักษณะกลมมีเมือกห่อหุ้ม พบเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.22 มิลลิเมตร ปกติไข่กุ้งจะฝักเป็นตัวในบริเวณที่วางไข่ จากนั้นลูกกุ้งวัยอ่อนจะเคลื่อนย้ายเข้าสู่บริเวณชายฝั่งในย่านน้ำกร่อยซึ่งเป็นบริเวณที่มีอาหารธรรมชาติสมบูรณ์ ลูกกุ้งจะเลี้ยงตัวเองอยู่ในบริเวณนี้จนโตถึงขั้นพ่อแม่พันธุ์จึงค่อยอพยพสู่ทะเลลึกเพื่อทำการสืบพันธุ์วางไข่ต่อไป การพัฒนาของตัวอ่อนระยะของกุ้งขาวเมื่อได้รับการปฏิสนธิแล้วภายใน 12-14 ชั่วโมงก็จะฟังตัวอ่อนในระยะนอเพลียส (nauplius) ลูกกุ้งที่ฟักออกมาเป็นตัวนี้จะมีการพัฒนาและเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปจนกระทั่งเหมือนตัวเต็มไวซึ่งสามารถแบ่งออกเป็นระยะต่างๆ ได้ดังต่อไปนี้ (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 วงจรชีวิตของกุ้งขาวแวนนาไม (Rosenberry, 2005)

รูปที่ 5 แสดงกุ้งวัยอ่อนระยะต่างๆดังต่อไปนี้

ตัวอ่อนระยะที่ 1 นอเพลียส(nauplius)

รูปร่างคล้ายแมงมุมยังไม่ต้องการอาหารเนื่องจากมีถุงอาหาร (yolk sac) ติดอยู่กับลำตัว ตัวอ่อนระยะนี้จะผ่านการลอกคราบ 5-6 ครั้ง ภายในเวลา 36-48 ชั่วโมงก่อนจะเข้าระยะที่ 2

ตัวอ่อนระยะที่ 2 โปรโตซูเอีย (protozoea)

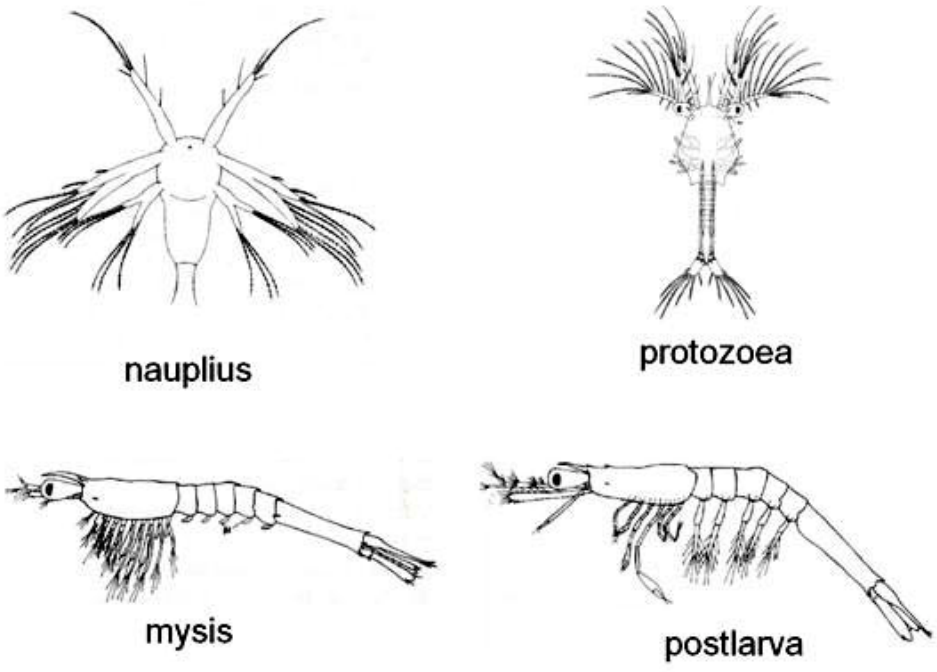
ตัวอ่อนระยะนี่จะมีตั้วยาวขึ้น ส่วนหัวและลำตัวแยกจากกันอย่างเห็นได้ชัดเจน ระยะนี้มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง 3 ขั้นตอนใช้ระยะเวลาประมาณ 4-7 วัน

ตัวอ่อนระยะ 3 ไมซัส (mysis)

ระยะนี้ลูกกุ้งจะมีลักษณะคล้างกุ้งวัยรุ่น แต่การว่ายน้ำยังว่ายน้ำแบบหัวทิ่มลง และดีดขึ้นลง พัฒนาการของลูกกุ้งระยะนี้มี 3 ขั้นตอนใช้เวลาทั้งหมดประมาณ 5-7 วัน

ตัวอ่อนระยะที่ 4 โพสลาวา (postlarva)

ลูกกุ้งระยะนี้มีลักษณะใกล้เคียงกับลูกกุ้งวัยรุ่นมากขึ้นมีอวัยวะต่างๆเกือบครบทุกส่วน และพัฒนาการไปเรื่อยๆจนเข้าสู่ระยะกุ้งวัยรุ่น ลูกกุ้งในระยะโพสลาวานี้จะมีขาเดิน 3 คู่ คู่แรกมองเห็นเป็นก้ามชัดเจนหางแคบเข้าเป็นระยะที่มีระยางคค์ครบ มีขากรรไก (mandible) ที่ชัดเจน ขาว่ายน้ำเจริญให้เห็นชัดเจนขึ้น กรีสั้นกว่าดวงตา ระยะระหว่างตากางออกมองเห็นได้ชัดเจน ลักษณะลำตัวสั้นป้อมจะมีลักษณะใสมีเส้นสีน้ำตาลพาดยาวจากบริเวณหนวดถึงหาง โดยปล้องท้องปล้องที่ 6 จะยาวกว่าปล้องหัวเล็กน้อย กุ้งวัยรุ่น (juvenille) จะมีจนาดตัวโตขึ้นโดยมีการเจริญของเหงือกที่สมบูรณ์ กุ้งในระยะนี้จะมีการพัฒนาของกรีอย่างเต็มที่ มองเห็นกรีด้านบนมี 8-9 ฟัน ความยาวกรีจะสั้นกว่า exopodite ของหนวด ปลายกรีเรียวตรง การเคลื่อนไหวจะคล้ายกับกุ้งโตเต็มที่แล้ว คือใช้ขาเดินและขาว่ายน้ำ (ปิยะบุตร วินิชพงษ์พันธุ์, 2545)



รูปที่ 5 กุ้งวัยอ่อนระยะต่างๆ (ที่มา: ทินรัตน์ ศรีสุวรรณ์, 2551)

2.5 สภาพแวดล้อมในการเลี้ยง

กุ้งขาวเป็นกุ้งที่เลี้ยงได้ทั้งในระบบธรรมชาติและระบบกึ่งหนาแน่น มีนิสัยไวต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะของน้ำในบ่อเพาะเลี้ยงและตกใจง่าย ลักษณะพิเศษของกุ้งสายพันธุ์นี้คือสามารถสร้างความคุ้นเคยหรือปรับลักษณะภายใต้ระบบเพาะเลี้ยงได้ ซึ่งสามารถทำการเพาะเลี้ยงได้ทั้งบริเวณพื้นที่ชายฝั่ง หรือบริเวณพื้นที่ที่มีความเค็มต่ำ เช่นสามารถทำการเพาะเลี้ยงได้ทั้งในที่มีระดับความเค็ม 5-35 ppt และระดับความเค็มต่ำ 0-5 ppt แต่ระดับความเค็มที่สามารถเติบโตได้ดีคือ 10-22 ppt (ปิยะบุตร วินิชพงษ์พันธุ์, 2545) แต่การเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมด้วยน้ำความเค็มที่ต่ำมากส่วนใหญ่จะไม่สามารถผลิตกุ้งขนาดใหญ่ได้ เหมือนกับการเลี้ยงด้วยน้ำความเค็มปกติ เนื่องจากน้ำความเค็มต่ำจะมีปริมาณอิออนที่สำคัญ ได้แก่ แมกนีเซียม โซเดียม แคลเซียม โพแทสเซียม คลอไรด์ ไบคาร์บอเนตและซัลเฟตน้อย ส่งผลต่อการรอดชีวิตและการเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไม (ชลอ ลิ้มสุวรรณ และพรเลิศ จันทร์รัชกูล, 2547) นอกจากความเค็มของน้ำจะไม่ต่ำมากจนเกือบเป็นน้ำจืด เช่น ความเค็มอยู่ระหว่าง 4-8 ส่วนในพันส่วน (พีพีที) และปล่อยลูกกุ้งในอัตราความหนาแน่นไม่สูงมาก มีการจัดการเรื่องคุณภาพน้ำและการให้อากาศอย่างพอเพียงสามารถที่จะเลี้ยงได้กุ้งขนาดใหญ่ได้ (อรอนงค์ ประวิทย์วิไลกุล, 2547)

อุณหภูมิของน้ำถือเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่สำคัญในการเลี้ยงกุ้ง เนื่องจากมีผลต่อการกระบวนการเผาผลาญอาหาร การใช้ออกซิเจน อัตราการบริโภคอาหาร การเจริญเติบโต การลอกคราบ การรอดชีวิตและความสามารถในการทนทารสารพิษ (Wyban และคณะ, 1995; Ponce-Palafox และคณะ, 1997; Jackson และ Wang, 1998; Hewitt และ Duncan, 2001; Coman และคณะ, 2002; Spanopoulos-Hernández และคณะ, 2005) อุณหภูมิที่สามารถเจริญได้คือ 25-35 องศาเซลเซียส(ปิยะบุตร วินิชพงษ์พันธุ์, 2545) แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของกุ้งจะแปลผันตามช่วงอายุของกุ้ง และสายพันธุ์ โดยกุ้ง *L. vannamei* ที่มีขนาดเล็ก (น้ำหนักน้อยกว่า 5 กรัม) จะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญอยู่ที่มากกว่า 30 องศาเซลเซียส ในขณะที่เมื่อมีขนาดใหญ่ (16 กรัม) จะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ที่ประมาณ 27 องศาเซลเซียส (Wyban และคณะ, 1995) สำหรับกุ้งขาวแวนนาไมในระยะวัยรุ่น มีการรอดสูงสุดที่อุณหภูมิ 20-30 องศาเซลเซียส(Ponce-Palafox และคณะ, 1997)

Hypoxia หรือระดับออกซิเจนละลายน้ำต่ำ คือมีค่าออกซิเจนละลายน้ำน้อยกว่า 2.8 มิลลิกรัมต่อลิตร (Diaz และ Rosenberg, 1995) มีผลต่อการเจริญเติบโต การรอดชีวิต การบริโภคอาหาร พฤติกรรมการดำรงชีวิต ระบบ การลอกคราบ ระบบควบคุมการขับถ่ายน้ำและแร่ธาตุในร่างกาย และระบบภูมิคุ้มกัน(Clark, 1986; Renaud, 1986; Allan และ Maguire,1991; Moullac และคณะ, 1998; Wannamaker และ Rice, 2000; McGraw และคณะ, 2001; Wu และคณะ,

2002; Mugnier และ Soyez, 2005) ระดับออกซิเจนละลายน้ำได้ที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงกุ้งขาว ควรมีค่ามากกว่า 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (Brock และ Main, 1994)

ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่เหมาะสำหรับเลี้ยงกุ้งขาวควรอยู่ระหว่าง 7-9 (Brock และ Main, 1994) โดยปกติค่า pH จะไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก แต่จะเปลี่ยนแปลงได้เมื่อเกิดการเน่าสลายของอาหารที่ตกค้างหรือมีการเกิดของแพลงค์ตอนพืชมาก ค่าความเป็นกรด-ด่างที่มีการเปลี่ยนแปลงมากระหว่างช่วงวัน มีผลต่อการเจริญเติบโตและการลอกคราบของกุ้ง (วัลลภ คงเพิ่มพูล, 2534) นอกจากนี้ค่าความเป็นกรด-ด่างที่มาก (10.1) หรือน้อย (6.5) เกินไปยังส่งผลต่อการตายของกุ้งขาวเมื่อทำให้เกิดโรคด้วย *V. alginolyticus* โดยพบว่ามีการตายสะสมมากกว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยความเป็นกรด-ด่างตามธรรมชาติ (8.2) (Li และ Chen, 2008)

ค่าความเป็นด่าง (alkalinity) หมายถึง ความจุของน้ำนั้นที่จะสะเทินกรด (กรรณิการ์ สิริสิงห์, 2544) หรือความสามารถของน้ำที่จะรับไฮโดรเจนอิออน เพื่อทำให้กรดเป็นกลาง (มั่นสิน ตัณฑุลเวศม์ และไพพรรณ พรประภา, 2544) โดยปกติค่าความเป็นด่างของน้ำขึ้นอยู่กับ ไฮดรอกไซด์ คาร์บอเนต และ ไบคาร์บอเนต เป็นหลัก ดังนั้นค่าความเป็นด่างจึงเป็นตัวควบคุม pH ไม่ให้มีการเปลี่ยนแปลงมากนัก หรือไม่ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วจนส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของกุ้ง กุ้งขาวชอบอยู่ในน้ำเค็มที่มีค่าความเป็นด่าง ในช่วง 80-150 มิลลิกรัมต่อลิตร (ปิยะบุตร วินิชพงษ์พันธุ์, 2545)

2.6 โรคของกุ้งขาวแวนนาไม (ทินรัตน์ ศรีสุวรรณ์, 2551)

โรคที่พบในกุ้งแบ่งตามสาเหตุของโรคได้ดังนี้

1. โรคติดเชื้อจากไวรัส แบคทีเรีย และริกเก็ตเซีย เชื้อรา โปรโตซัว หนอนพยาธิ

2. โรคไม่ติดเชื้อ จากทุพโภชนา สิ่งแวดล้อม และกายภาพ สารพิษ เนื้องอกและกรรมพันธุ์

โดยโรคติดเชื้อจากไวรัสเป็นโรคที่สำคัญที่สุดของกุ้งทะเล หากแบ่งตามสาเหตุ พบว่ากว่า 80 เปอร์เซนต์ ของความสูญเสียจากการเลี้ยงกุ้งมีสาเหตุมาจากโรคติดเชื้อไวรัส และแบคทีเรียรวมกัน โดย 58 เปอร์เซนต์มาจากไวรัส และอีก 22 เปอร์เซนต์มาจากแบคทีเรีย

ในประเทศไทยได้มุ่งเน้นที่ระบุลักษณะไวรัสในกุ้ง ตามความสำคัญของไวรัสที่จะส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจ ไวรัสที่พบได้แก่ ไวรัสดวงขาว (WSSV) ไวรัสหัวเหลือง (YHV) ไวรัสในเฮปปาโตแพนเครียส (HPV) แบคคูโลไวรัส (MBV) ทอราซินโดรมไวรัส (TSV) และโรคแคระแกร็นโดย เชื้อพาร์โวไวรัสที่เรียกว่า infectious hypodermal and hematopoeitic virus (IHHNV)

2.6.1 โรคที่เกิดจากไวรัส

ไวรัสที่พบในกุ้งแบ่งเป็นสองชนิดคือ 1. DNA viruses ได้แก่ Infectious Hypodermal and Haematopoietic Necrosis Virus (IHHNV), Hepatopancreatic Parvovirus (HPV), Spawner-isolated Mortality Virus (SMV), Lymphoidal Parvo-like Virus (LPV), Baculovirus penaei (BP), Monodon-typed Baculovirus (MBV), Baculoviral Midgut Gland Necrosis Virus (BMN), White Spot Syndrome Virus (WSSV), Iridovirus และ 2. RNA viruses ได้แก่ Taura Syndrome Virus (TSV), Yellowhead/Lymphoid Organ/Gill Associated Virus (YHV/LOV/GAV), reo-like viruses (REO II & IV), Infectious Myonecrosis Virus (IMNV), Lymphoid Organ Vacuolization Virus (LOVV), Rhabdovirus of Penaeid Shrimp โดยมีคุณลักษณะต่างๆกันแสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงไวรัสที่พบในกุ้งและคุณลักษณะเฉพาะต่างๆ

ไวรัส	ขนาดของ virion	กรดนิวคลีอิก	ชนิด
<u>DNA viruses</u>			
IHHNV	20 nm	ssDNA	parvovirus
HPN	22-24 nm	ssDNA	parvovirus
SMV	20 nm	ssDNA	parvovirus
LPV	25-30 nm	ssDNA	parvo-like virus
BP	55-75 x ~300 nm	dsDNA	occluded baculovirus
MBV	~75 x 300 nm	dsDNA	occluded baculovirus
BMN	~75 x 300 nm	dsDNA	nonocclud baculovirus
WSSV	130 x 350 nm	dsDNA	*Nimaviridae* (ใหม่)
IRIDO	136 nm	dsDNA	ridovirus
<u>RNA viruses</u>			
TSV	30 nm	ssRNA	*Dicistrovirdae* (ใหม่)
YHV/LOV/GAV	44 x 173 nm	ssRNA	*Roniviridae* (ใหม่)
REO III & IV	55-70 nm	dsDNA	Aquareovirus
IMNV	40 nm	dsDNA	*Totiviridae*
LOVV	55 nm	ssRNA	Togo-like virus
RPS (=SVC)	70 x 125 nm	ssRNA	rhabdovirus

2.6.1.1 โรคเอ็มบีวี (Spherical baculovirosis หรือ Penaeus monodon-typed baculovirosis หรือ MBV)

โรคติดเชื้อแบคคูโลไวรัสในกุ้งกุลาดำหรือ MBV เป็นโรคที่พบได้ทั่วไปในประเทศไทย และในหลายภูมิภาคทั่วโลก มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งส่งออก เกิดจาก Penaeus monodon-types baculovirus หรือ MBV เชื้อ MBV ติดต่อโดยตรงทางการกินเนื้อเยื่อกุ้งที่ติดเชื้อหรืออุจจาระ น้ำที่ปนเปื้อนเชื้อ กุ้งกุลาดำทุกระยะสามารถติดเชื้อได้ ยกเว้นระยะไข่ และ nauplius ไม่พบว่าติดต่อผ่านสัตว์พาหะ อาการในกุ้งวัยอ่อน (larval stages ได้แก่ ระยะ zoea และ mysis) จนถึงระยะพี (postlarva) อาจพบการตายมากกว่า 90 เปอร์เซนต์ ในขณะที่กุ้งระยะ juvenileและกุ้งโตเต็มวัย อาจติดเชื้อได้แต่ไม่ตาย อาการที่พบได้แก่ อัตราการตายการสูง ลำไส้ส่วนกลาง (midgut) มีสีขาว

การควบคุมและป้องกัน ไม่มียารักษาโรคหรือวัคซีนป้องกัน โดยหากพบเชื้อไวรัสใน เฮปปาโตแพน เครียส หรืออุจจาระ ก็ให้ทำลายกุ้งนั้น

2.6.1.2 โรคดวงขาว (White Spot Syndrome)

โรคดวงขาวเป็นโรคที่สำคัญที่สุดในกุ้งทะเล ประมาณกันว่าตั้งแต่ปี พ.ศ. 2536 เป็นต้นมาโรคนี้ทำให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจมากถึงหนึ่งหมื่นล้านดอลล่าห์สหรัฐฯทั่วโลก และพบได้แทบทุกภูมิภาค ในหลายประเทศ (Wang และคณะ, 1999; 2000) รวมถึงประเทศไทยก็พบโรคนี้เช่นกัน โรคนี้เป็นโรคที่มีผลกระทบต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้ง รวมถึงการค้าระหว่างประเทศอย่างมาก เกิดจากเชื้อไวรัสดวงขาว ที่เรียกว่า White Spot Syndrome Virus หรือ WSSV (Tang และ Lightner, 2000) เชื้อมีชีวิตอยู่ได้ในน้ำทะเลเป็นเวลาอย่างน้อย 30 วันและอยู่ในบ่อเลี้ยงกุ้งได้ 3 ถึง 4 วัน (Nunan และ Lightner, 1997; Poulos และคณะ, 2001) กุ้งติดเชื้อนี้ได้หลายทาง เช่น จากการกินกุ้ง หรือน้ำที่มีเชื้อปนเปื้อน เชื้อไวรัสนี้ผ่านไข่ไปยังกุ้งรุ่นต่อไปได้ กุ้งที่ไม่แสดงอาการก็แพร่เชื้อได้ และพบว่ากุ้งทุกระยะตั้งแต่ไข่จนถึงระยะพ่อแม่พันธุ์ป่วยเป็นโรคได้ (Durand และคณะ, 2003) อาการที่สำคัญได้แก่ การกินอาหารลดลงฉับพลัน ตัวกุ้งมีสีแดง และเปลือกกุ้งอ่อน ลอกหลุดง่าย และมีจุดหรือดวงขาว ขนาดตั้งแต่ 0.5 ถึง 2 มิลลิเมตรบริเวณใต้เปลือกชั้นคิวติเคิล

การควบคุมและป้องกัน โรคนี้ไม่มีวิธีรักษาที่ได้ผล หากพบว่ากุ้งป่วยเป็นโรคนี้ ต้องคัดทิ้งทั้งบ่อ สำหรับมาตรการการจัดการโรคดวงขาวนั้น อาจปฏิบัติโดย

1. การลดความหนาแน่นในการเลี้ยงลง

2. การเลี้ยงกุ้งปลอดเชื้อ (WSSV-free)

3. การเพิ่มอุณหภูมิน้ำให้สงขึ้น มีรายงานว่า อุณหภูมิน้ำเป็นปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมอย่างหนึ่งที่มีผลทำให้เชื้อไวรัสดวงขาวลดการเพิ่มจำนวนได้

2.6.1.3 โรคไอเอชเอชเอ็นและโรคแคระแกร็น (Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis หรือ IHHN และ Runt Deformity Syndrome หรือ RDS)

โรคไอเชเอชเอ็นและโรคแคระแกร็นเป็นโรคสำคัญของกุ้งทะเล และมีผลกระทบต่อการค้ากุ้งและผลิตภัณฑ์กุ้งระหว่างประเทศ ทั้งสองโรคเกิดจากการติดเชื้อพาร์โวไวรัสที่เรียกว่า Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus หรือไอเอชเอชเอ็นวี (IHHNV) การติดต่อส่วนใหญ่เกิดจากการสัมผัสกับกุ้งที่มีเชื้อ แต่อย่างไรก็ตามพบว่าเชื้อไวรัสชนิดนี้ผ่านจากพ่อแม่กุ้งไปสู่ลูกกุ้งรุ่นต่อไปได้ (Motte และคณะ, 2003) สาเหตุที่เรียกโรคเป็นสองชื่อต่างกันเช่นนี้เนื่องจากโรคไอเอชเอชเอ็น มักทำให้เกิดการตายเฉียบพลันอย่างรุนแรง โดยเฉพาะในกุ้ง *L. stylirostris* ในขณะที่โรคแคระแกร็น (RDS) เป็นโรคติดเชื้อเรื้อรังที่เกิดจากเชื้อ IHHNV ในกุ้งขาววานนาไม (*L. vannamei*), *L. stylirostris*, กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) และกุ้งอื่นๆ (Tang และคณะ, 2003) อาการของโรคไอเอชเอชเอ็นเช่น ตัวกุ้งมีสีน้ำเงิน ซึม เบื่ออาหาร ในขณะที่กุ้งโตเต็มวัยที่เป็นโรคอาร์ดีเอส มักติดเชื้อเรื้อรัง แสดงอาการแคระแกร็น การเจริญเติบโตลดลง อาการที่สังเกตได้ง่ายคือ กรีโค้งงอ (bent rostrum) หนวดกุ้งเปราะ หงิกงอ (brittle, wrinkled antenna) หัวกุ้งกรอบๆ (bubble head) และการผิดรูปที่ปล้องท้องอันที่ 6

การควบคุมและป้องกัน ไม่มีการรักษา ต้องคัดทิ้ง และอาจเพาะเลี้ยงกุ้งสายพันธุ์ที่มีความต้านทานโรค สำหรับเทคนิคการจัดการโรคไอเอชเอชเอ็นและโรคแคระแกร็นที่ปฏิบัติกันคือหลีกเลี่ยงการเลี้ยงที่ความหนาแน่นสูง โดยเฉพาะในบ่ออนุบาลลูกกุ้ง

2.6.1.4 โรคเอชพีวี (Hepatopancreatic Parvovirus หรือ HPV)

โรคติดเชื้อพาร์โวไวรัสในเฮปปาโตแพนเครียสหรือโรคเอชพีวี เป็นโรคสำคัญโรคหนึ่งของกุ้งทะเล พบครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2525 ที่ประเทศสิงคโปร์และจีนในกุ้งแชบ๊วย *Fenneropenaeus merguiensis* ในปี พ.ศ. 2534-2535 พบได้เริ่มพบโรคนี้ในกุ้งขาววานนาไม ที่จับจากธรรมชาตินอกชายฝั่งของรัฐ Nayarit รัฐ Sinaloa และรัฐ Guerrero ของประเทศเม็กซิโก สาเหตุเกิดจากเชื้อพาร์โวไวรัสที่เรียกว่าHepatopancreatic Parvovirus (HPV) การติดต่อเกิดจากการสัมผัสเชื้อจากกุ้งที่เป็นโรค โดยเฉพาะในกุ้งวัยอ่อนและ กุ้งพี (postlarva) ระยะแรกๆ จนถึงกุ้งวัยรุ่น (juveniles) พบว่าไวต่อการติดเชื้อมากที่สุด ส่วนในกุ้งโตเต็มวัยไม่ทราบผลกระทบที่แน่นอน นอกจากนี้คาดว่าเชื้อไวรัสนี้อาจผ่านจากพ่อแม่กุ้งมาสู่ลูกกุ้งได้ด้วย อาการของโรคเอชพีวีนี้เป็นสาเหตุให้กุ้งพีมีอัตรารอดต่ำในถังหรือบ่ออนุบาล ในกุ้งวัยรุ่นอาจทำให้การเจริญเติบโตช้า แต่ก็เคยพบรายงานการตายในกุ้งขาว *L. vannamei*

การควบคุมและป้องกัน โรคนี้ไม่มีวิธีรักษา แต่อาจป้องกันได้โดยการตรวจพ่อแม่พันธุ์ด้วยวิธีพีซีอาร์ในอุจจาระ ซึ่งเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง ไม่ทำให้กุ้งบอบช้ำ

2.6.1.5 โรคทอร่า (Taura syndrome)

โรคทอร่า เป็นโรคสำคัญโรคหนึ่งของกุ้งทะเล พบได้ทั่วโลกรวมทั้งในประเทศไทย และยังพบการระบาดประปรายในประเทศต่างๆ เช่น การระบาดที่รัฐเท็กซัส สหรัฐอเมริกา ในปี พ.ศ. 2547 เป็นต้น สาเหตุเกิดจากเชื้อไวรัสที่เรียกว่า Taura Syndrome Virus (TSV) (Hasson และคณะ, 1995) ติดต่อจากกุ้งสู่กุ้งได้โดยการกินเนื้อกุ้งที่มีเชื้อ นอกจากนี้ยังคาดว่าเชื้อไวรัสแพร่ได้ผ่านน้ำ กุ้งระยะที่เป็นโรคนี้ส่วนใหญ่ได้แก่กุ้งพี (ระยะ postlarva) กุ้งวัยรุ่น (juveniles) และกุ้งโตเต็มวัย อาการที่อาจสังเกตได้ ได้แก่ การตายของเซลล์เยื่อบุคิวติเคิล (ซึ่งอาจสังเกตได้ที่ครีบหาง) และจุดดำตามตัวกุ้ง รอยโรคที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า คือ จุดดำตามตัวกุ้ง (ซึ่งเกิดจาก melanization)

การควบคุมและป้องกัน ทั้งที่เป็นเทคนิคเก่าและใหม่ เช่น

1. ใช้กุ้ง*ขาว L. vannamei* ที่ปลอดเชื้อหรือที่ต้านทานเชื้อ

2. การเลี้ยงกุ้งร่วมกับปลานิลหรือปลาทับทิม โดยการปล่อยทั้งลูกกุ้งและลูกปลาพร้อมๆ กัน ปลาจะช่วยกินซากกุ้งที่เป็นโรคตาย ช่วยป้องกันการติดเชื้อจากกุ้งสู่กุ้งโดยการกินกันเอง วิธีนี้จะได้ผลผลิตทั้งกุ้งและปลา

3. การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันหรือโพรไบโอติก

2.6.1.6 โรคหัวเหลือง (Yellowhead disease)

โรคหัวเหลืองเป็นโรคสำคัญของกุ้งทะเลในประเทศไทย นอกจากนี้ยังพบได้ในหลายประเทศในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เอเชียตะวันออก อินโดแปซิฟิก และออสเตรเลีย และยังเป็นโรคที่มีผลกระทบต่อการค้ากุ้งและการขนย้ายกุ้งระหว่างประเทศ โรคหัวเหลืองทำให้เกิดการตายในกุ้งรุนแรงและเฉียบพลัน โดยประมาณกันว่าทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจมากถึง 500 ล้านดอลล่าห์สหรัฐฯ โรคหัว-เหลืองนี้พบครั้งแรกที่ประเทศไทย ในราวปี พ.ศ. 2534 หลังจากนั้นก็พบในอีกหลายประเทศในเอเชีย ส่วนอาการที่พบคือ หัวเหลืองและสีตัวกุ้งค่องข้างซีด สาเหตุเกิดจากเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองที่เรียกว่า Yellow Head Virus (YHV) การติดต่อไม่ทราบแน่ชัด แต่คาดว่าเกิดจากการสัมผัสกับกุ้งที่มีเชื้อโดยตรง กุ้งและสัตว์จำพวกครัสเตเชียนหลายชนิดก็สามารถติดเชื้อไวรัส YHV ได้เช่นกัน ไวรัสโรคหัวเหลืองสามารถก่อโรคได้ในกุ้ง postlarva ระยะท้ายๆ เป็นต้นไป แต่มักสังเกตพบการตายมากในกุ้งวัยรุ่นในบ่อเพาะเลี้ยง อาการและการตายจะปรากฏภายใน 2-4 วันหลังติดเชื้ออัตราการตายอาจสูงถึง 100 เปอร์เซนต์ อาการที่เด่น ได้แก่ หัวกุ้งที่ป่วยมีสีเหลือง ซึ่งเกิดจากเหงือกและเปลือกกุ้งที่มีสีเหลือง

การควบคุมและป้องกัน โรคหัวเหลืองไม่มีวิธีรักษา หากกุ้งเป็นโรคนี้ต้องคัดทิ้ง การป้องกันโรคเข้าฟาร์มอาจทำได้หลายวิธี เช่น การเลี้ยงกุ้งที่ปลอดเชื้อ เป็นต้น

2.6.2 โรคที่เกิดจากแบคทีเรียและริกเก็ตเซีย

2.6.2.1 โรคติดเชื้อวิบริโอ (Vibriosis)

โรคติดเชื้อวิบริโอพบได้ทั่วโลก และเป็นปัญหาสำคัญอย่างหนึ่งของการเลี้ยงกุ้ง เกิดจากเชื้อวิบริโอ (Vibrio) เช่น *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi, V. vulnificus* เป็นต้น ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ เชื้อนี้พบได้ทั่วไปในน้ำทะเล แม้แต่ในกุ้งที่แข็งแรงก็สามารถพบเชื้อวิบริโอหลายสปีชีส์ในทางเดินอาหารของกุ้งได้ และเชื้อวิบริโอนี้เกิดการดื้อยาต้านจุลชีพได้ง่ายมาก เชื้อวิบริโอหลายสปีชีส์เป็นเชื้อจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารของกุ้งปกติ จึงคาดว่าการติดเชื้อน่าจะผ่านทางทางเดินอาหารเป็นส่วนใหญ่ เชื้อนี้ก่อโรคได้ในกุ้งทุกระยะ ตั้งแต่ไข่จนถึงกุ้งโตเต็มวัย อาจพบโรคนี้ได้ในโรงเพาะฟัก เชื้ออาจเป็นสาเหตุโดยตรงของโรคหรือเป็นเชื้อฉวยโอกาส ซึ่งต้องอาศัยสิ่งโน้มนำอื่น เช่นการติดเชื้อไวรัส หรือความเครียด เชื้อวิบริโออาจทำให้เกิดโรคทางเดินอาหาร โรคตามระบบ (systemic infection) หรือโรคบริเวณเปลือกกุ้ง ซึ่งอาจแสดงอาการต่างๆกัน เช่น อัตราการตายสูง การกินอาหารลดลง สังเกตได้จากกุ้งไม่มีอุจจาระ และลอกคราบช้าลง อาการและรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่อาจใช้ในการวินิจฉัยเบื้องต้น การเรืองแสงของตัวกุ้ง (luminescence) การพบโคโลนีของแบคทีเรียที่มีสีเขียวขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อThiosulfate Citrate Bile Sucrose Agar (TCBS) การติดเชื้อวิบริโอเป็นสาเหตุของโรคมากมาย เช่น hatchery vibriosis, sea gull syndrome, septic hepatopancreatic necrosis (SHPN), luminescent vibriosis, swollen hidgut syndrome, shell disease, appendage necrosis (rot), splinters

การควบคุมและป้องกันในโรงเพาะฟักลูกกุ้ง ได้แก่

1. ฆ่าเชื้อโรคและพักบ่อระหว่างการเลี้ยงแต่ละครั้ง
2. ฆ่าเชื้อที่อาจมากับไข่กุ้ง นอร์เพลียสทั้งของกุ้งและของไรอาร์ทีเมีย
3. ใช้การจัดการที่ดี เช่นดูแลการให้อาหาร ความหนาแน่น อุณหภูมิน้ำ เป็นต้น
4. ใช้โพรไบโอติก
5. ใช้ยาต้านจุลชีพ

2.6.2.2 โรคติดเชื้อริกเก็ตเซียในเฮปปาโตแพนเครียส (Hepatopancreatic rickettsia infection)

โรคนี้เกิดจากเชื้อริกเก็ตเซีย พบได้ประปราย รอยโรคจำเพาะทางจุลพยาธิวิทยาที่พบ คือมีริกเก็ตเซียในไซโตพลาสซึมของเฮปปาโตแพนเครียส ยังไม่มีรายงานด้านการป้องกัน การควบคุมและการรักษา เชื้ออาจมีหลายสายพันธุ์ตามภูมิภาคต่างๆ ได้แก่ สเตรนฮาวาย พบในกุ้ง Melicertus marginatus และสเตรนเม็กซิโก พบในกุ้ง *L. vannamei* และ *L. Stylirostris*

2.6.3 โรคที่เกิดจากปาราสิต

2.6.3.1 โรคติดเชื้อโปรโตซัว (Infections by protozoa)

โปรโตซัวที่พบในกุ้ง ได้แก่ Microsporidian และ Haplosporidian พบได้ทั่วโลก มีผลกระทบต่อการเลี้ยงกุ้งในทุกรุ่นอายุ มักพบในบ่อกุ้งที่มีการเลี้ยงการจัดการไม่ดี อาจพบการตายในกุ้งที่ติดเชื้อรุนแรง วินิจฉัยโดยวิธีการทางจุลพยาธิวิทยา หากพบกุ้งติดเชื้อโปรโตซัวแนะนำให้คัดทิ้ง

2.6.3.2 โรคติดเชื้อเกรการีน (Infections by Gregarines)

เกรการีนที่เป็นปาราสิตในกุ้งมีหลายชนิด ส่วนใหญ่กุ้งมักไม่แสดงอาการหากติดเชื้อเล็กน้อย แต่ถ้าติดเชื้อรุนแรงอาจพบว่า ลำไส้ส่วนกลางมีสีเหลือง การกินอาหารและการเจริญเติบโตลดลง อาจพบโรคเฟาลิ่งและโรคติดเชื้อวิบริโอแทรกซ้อนร่วมด้วย อาจทำให้ตายได้

การควบคุมและป้องกัน ใช้ยากันบิดผสมอาหารให้กิน อาจได้ผลบ้าง (ขนาดของยาที่ใช้เท่ากับขนาดที่ใช้ในสัตว์ปีก)

2.6.3.3 โรคหนอนพยาธิ (Helminth parasitic infections of shrimp)

หนอนพยาธิที่พบในกุ้งมีทั้งพยาธิตัวตืด พยาธิตัวกลม และพยาธิใบไม้ ซึ่งพบได้เป็นครั้งคราว กุ้งที่เป็นโรคพยาธิมักไม่แสดงอาการใดๆ และมักพบในฟาร์มที่มีการจัดการไม่ดี โรคนี้วินิจฉัยด้วยวิธีการทางจุลพยาธิวิทยา และยังไม่มีรายงานการรักษาที่ได้ผล

2.6.4 **โรคที่เกิดจากสิ่งแวดล้อมและกายภาพ**

2.6.4.1 <u>โรคฟองอากาศ (Gas bubble disease)</u>

โรคฟองอากาศ เกิดจากสาเหตุ 2 ประการ ได้แก่

1. ไนโตรเจน ที่มีความอิ่มตัวมากกว่า 110 เปอร์เซนต์ หรือ อุณหภูมิของน้ำสูงขึ้นอย่างฉับพลัน ซึ่งทำให้เกิดฟองอากาศเล็กๆ (gas emboli) เข้าไปอุดตันระบบหมุนเวียนเลือด และเป็นสาเหตุของภาวะขาดออกซิเจน (hypoxia) นอกจากนี้ยังทำความเสียหายทางกายภาพโดยตรงต่อเนื้อเยื่อ หรือ

2. ออกซิเจน ที่มีความอิ่มตัวมากกว่า 250 เปอร์เซนต์ ซึ่งอาจเกิดจากถุงหรือแท็งก์ที่อัดออกซิเจนแล้ว แต่ไม่มีการกวนอากาศ หรือเกิดจากกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืช ในถังหรือแท็งก์ที่ไม่มีการกวนอากาศ ทำให้เกิดฟองอากาศเล็กๆ ซึ่งสามารถทำลายเนื้อเยื่อทางกายภาพโดยตรงได้

อาการที่พบ ได้แก่

1. กุ้งป่วย และลอยโดยหงายเอาด้านท้อง (ventral side) ของส่วนหัวขึ้น และอยู่ที่ผิวน้ำ

2. สังเกตเห็นฟองอากาศได้ในเนื้อเยื่อ ที่บริเวณที่เปลือกหุ้มอยู่บางๆ

3. เหงือกขาว (snow white gill)

4. พบฟองอากาศเมื่อตรวจเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยายต่ำ และ โรคนี้ไม่มีวิธีรักษา การแก้ไขทำได้ด้วยการกำจัดสาเหตุ ตามที่ได้กล่าวมาแล้ว

2.6.5 **โรคทุพโภชนาการ**

2.6.5.1 <u>โรคตะคริว (Cramped muscle syndrome)</u>

โรคตะคริวมีอาการเฉียบพลันเฉพาะ คือ การหดตัวอย่างรุนแรงของกล้ามเนื้อท้อง และยังมีกล้ามเนื้อสีขาวซึ่งอาจเกิดขึ้นเฉพาะจุดหรือทั่วร่างกาย โรคตะคริวมีสาเหตุมาจากการขาดธาตุโปแตสเซี่ยม และยังสันนิษฐานว่าอาจเกิดจากสัดส่วนระหว่างโปแตสเซี่ยมและแคลเซี่ยมขาดสมดุลย์ และอาจมีปัจจัยมาจากแมกนีเซี่ยมด้วย

วิธีป้องกันและรักษาได้แก่ การให้แร่ธาตุโปแตสเซี่ยมและแมกนีเซี่ยมเสริมอาหาร และการใช้ปุ๋ยที่มีโปแตสเซี่ยม เช่น โปแตส (potash) โรยก้นบ่อ

2.7 เซลล์เม็ดเลือด

เซลล์เม็ดเลือดของครัสเตเซียนและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง เป็นระบบที่มีความสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกันเช่น ทำหน้าที่ในกระบวนการกลืนทำลายหรือพาโกไซโตซีส (phagocytosis) การห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอม (encapsulation) การรวมตัวของเม็ดสี (melanization) (Johansson, 2000) น้ำเลือดของกุ้งจะมีสีน้ำเงินซึ่งเป็นสีของฮีโมไซยานิน (hemocyamin) ซึ่งมีองค์ประกอบที่สำคัญคือทองแดง ทำหน้าที่ในการแลกเปลี่ยนและขนส่งออกซิเจนไปหล่อเลี้ยงเซลล์ ระบบหมุนเวียนเลือดของกุ้งเป็นระบบเปิด คือเลือดไม่ได้หมุนเวียนอยู่ในท่อเลือดตลอดเวลา เลือดจะถูกหัวใจบีบส่งไปเลี้ยงส่วนต่างๆของร่างกาย แล้วจะไหลไปรวมกันที่แอ่งเลือดในส่วนของลำตัวบริเวณใต้ท้องซึ่งจุดนี้จะเป็นจุดรวมเลือดก่อนที่จะถูกหัวใจดึงไปฟอกที่เหงือกแล้วรับไปเลี้ยงส่วนต่างๆ ของร่างกายอีกครั้งหนึ่ง เม็ดเลือดของครัสเตเซียนสามารถแบ่งตามสัณฐานวิทยา (morphology) และองค์ประกอบของไซโตพลาสซึม(cytoplasm)ได้เป็น 3 ชนิดคือ (รูปที่ 6 และตารางที่ 3) (Bacuchau, 1980; กิจการ ศุภมาตย์ และคณะ, 2543)

2.7.1 ไฮยาลิน เซลล์ (Hyalin cell)

เป็นเซลล์เม็ดเลือดที่มีรูปร่างแบน กลม ผิวเรียบ บางครั้งจะพบว่ามีลักษณะคล้ายกระสวย เซลล์จะมีนิวเคลียส ขนาดใหญ่อยู่กลางเซลล์ มีไซโตพลาสซึมน้อย ไม่มีกรานูลภายในเซลล์เป็นเซลล์เม็ดเลือดที่มีขนาดเล็กที่สุด ขนาดของเซลล์ยาว 6.8-13.6 ไมครอนกว้าง 6.4-8.3 ไมครอน เส้นผ่านศูนย์กลาง 5-6 ไมครอน

2.7.2 เซมิกรานูลลาร์ (Semigranular hemocyte)

เป็นเซลล์เม็ดเลือดที่พบลักษณะของ เม็ดกรานูลขนาดเล็ก อยู่ในเซลล์ในปริมาณที่ไม่มาก (cell process) เซลล์มีขนาดความยาว 9.0-14.2 ไมครอนกว้าง 4.2-6.8 ไมครอน เส้นผ่านศูนย์กลาง7-10 ไมครอน ทำลายสิ่งแปลกปลอมโดยการห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอม (encapsulation) และเกี่ยวข้องกับกระบวนการกลืนทำลายสิ่งแปลกปลอม (phagocytosis) เซลล์ชนิดนี้จะตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาสู่ตัวกุ้งโดยการจับกับผิวของสิ่งแปลกปลอม (Johasson และ Söderhäll, 1989) โดยทำปฏิกิริยากับสาร polysaccharide ของจุลินทรีย์ เช่น Lipopolysaccharide และ β-1,3-glucans เกิดการหลั่งสารที่อยู่ในแกรนูล (Söderhäll และ Cerenius, 1992)

2.7.3 กรานูลาร์ (Granular hemocyte)

เป็นเซลล์เม็ดเลือดที่มีขนาดใหญ่ที่สุดและมีกรานูลขนาดใหญ่จำนวนมากอยู่ในไซโตพลาสซึม เป็นเซลล์ที่สะสม Prophenoloxidase activating system หรือระบบโปรพีโอ (proPO) แต่จะไม่หลั่งสารจากแกรนูลเมื่อกระตุ้นด้วยสารโพลีแซคคาไรด์จากจุลินทรีย์ (Söderhäll และ Cerenius, 1992) เซลล์มีขนาดความยาว 12.2-14.6 ไมครอน กว้าง7.2-7.8 ไมครอน เส้นผ่าศูนย์กลาง 8-10 ไมครอน

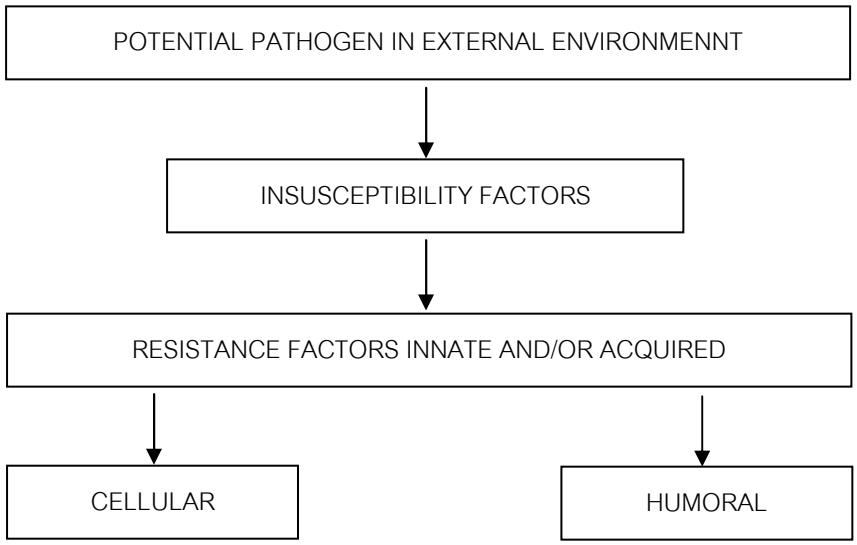
รูปที่ 6 แสดงเม็ดเลือดของกุ้งทั้ง 3 ชนิด เมื่อถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์
H = ไฮยาลินเซลล์ S = เซมิกรานูลาร์ L = กรานูลาร์
Bar = 5 ไมครอน (ที่มา: กิจการ ศุภมาตย์ และคณะ, 2543)

ตารางที่ 3 แสดงหน้าที่ของเม็ดเลือดกุ้งขาว

หน้าที่	ชนิดของเม็ดเลือด		
	ไฮยาลิน	เซมิกรานูลาร์	กรานูลาร์
การแข็งตัวของเลือด	+	-	-
การกลืนทำลายสิ่งแปลกปลอม (phagocytosis)	-	+	+
การห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอม (encapsulation)	-	+	+
ระบบโพรฟีนอลออกซิเดส (Prophenoloxidase system)	-	+	+

2.8 ระบบภูมิคุ้มกันโรคของกุ้งขาว

ภูมิคุ้มกันโรคของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังเป็นภูมิคุ้มกันที่มีมาโดยแต่กำเนิด (innate immunity) เป็นระบบการป้องกันการติดเชื้อจากสิ่งมีชีวิตอื่นในลักษณะที่ไม่เฉพาะเจาะจง ไม่มีการจดจำ และสร้างแอนติบอดีต่อสิ่งแปลกปลอม (รูปที่ 7)



รูปที่ 7 กลไกการป้องกันตัวเองของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (Sindermann, 1990)

ระบบภูมิคุ้มกันของครัสเตเซียนแบ่งออกเป็น 2 ระบบ (Lackie, 1980; Ratcliffe และคณะ , 1985; Smith และ Chisholm, 1992) คือ

1. ภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์ (cellular defenses)
2. ภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยสารน้ำ (humoral defenses)

2.8.1 **ภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์** (cellular defenses)

สัตว์ไม่มีกระดูกสันมีการตอบสนองของร่างกายเมื่อสิ่งแปลกปลอมจากสิ่งแวดล้อมเข้าสู่ร่างกาย โดยจะมีกลไกในการป้องกันตนเองทั้งการตอบสนองที่ทำงานโดยเซลล์ และองค์ประกอบในน้ำเลือด ซึ่งมีหลายวิธีการได้แก่ การแข็งตัวของเลือด (clotting) กระบวนการกลืนทำลาย (phagocytosis) การสร้างโนดูล (nodule formation) และการห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอม (encapsulation)

2.8.1.1 <u>การแข็งตัวของเลือด (clotting)</u>

การแข็งตัวของเลือดเป็นขบวนการที่ยับยั้งการสูญเสียเลือดเมื่อเกิดบาดแผลและป้องกันการติดเชื้อผ่านบาดแผล การแข็งตัวของเลือด จะเกิดจากการทำงานของเม็ดเลือดไฮยาลินเซลล์และโคแอคกลโลเจน (Coagulogen) และพบว่าการแข็งตัวของเลือดจะเกิดขึ้นพร้อมกับการสร้างเม็ดสีดำ (melanin) ที่เกิดขึ้นในระบบโพรฟีนอลออกซิเดส (Johansson และ Söderhäll, 1989; Ratcliffe และคณะ, 1985)

2.8.1.2 <u>การกลืนทำลายสิ่งแปลกปลอม (phagocytosis)</u>

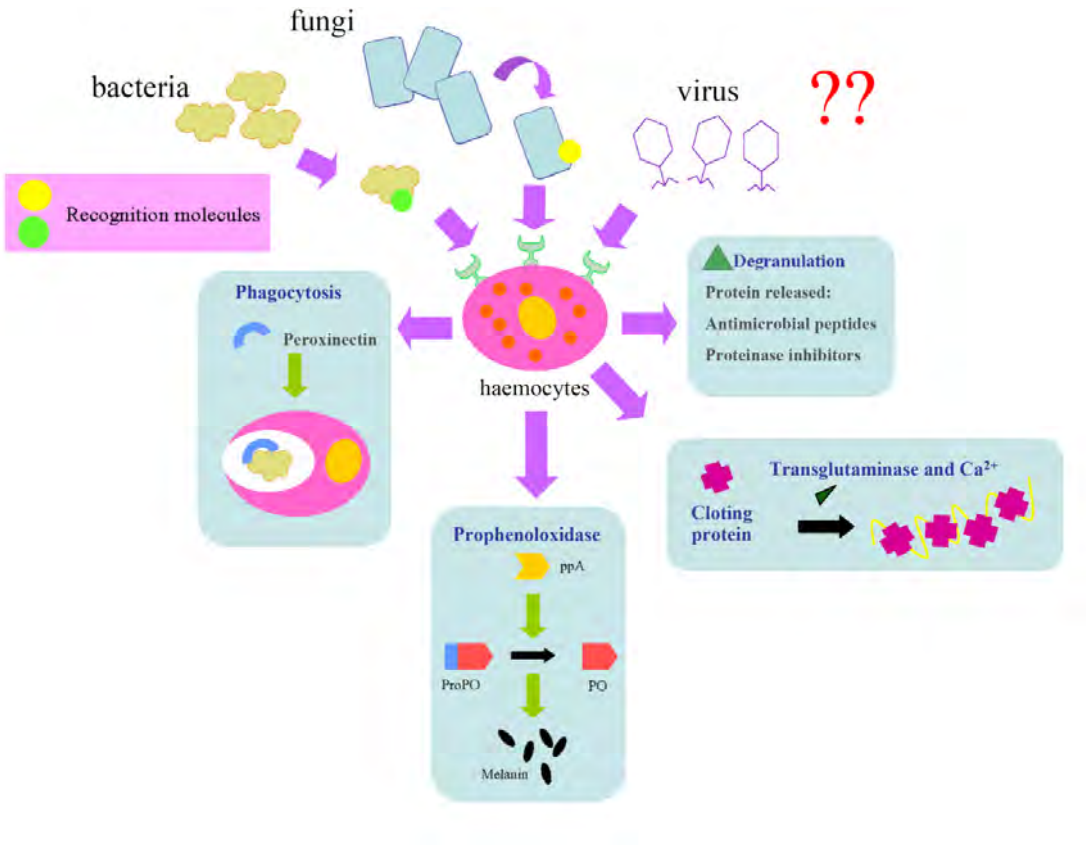
เมื่อเม็ดเลือดเซมิกรานูลาร์ พบสิ่งแปลกปลอมเข้าจะมีการยื่นไซโตพลาสซึมเข้าไปล้อมรอบสิ่งแปลกปลอมแล้วกลืนเข้าสู่ภายในเซลล์ต่อมาจะมีการนำออกซิเจนเข้าสู่เซลล์และออกซิเจนจะถูกรีดิวซ์เป็นซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (O_2^-) ต่อจากนั้นจะถูกเปลี่ยนไปเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออนยังสามารถเปลี่ยนรูปไปเป็นไฮดรอกซิลเรดิคัล (.OH) ซึ่งทั้งซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และไฮดรอกซิลเรดิคัล จะเป็นตัวทำให้สิ่งแปลกปลอมที่ถูกกลืนกินเข้าในเซลล์ถูกทำลาย

2.8.1.3 <u>การสร้างโนดูล (nodule formation)</u>

ในกรณีที่มีสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อก่อโรคเข้าสู่ร่างกายในปริมาณ มากจนเกินความสามารถของ การกลืนกินสิ่งแปลกปลอมจะทำลายได้ทัน เม็ดเลือดกุ้งจะมารวมตัวกันมากขึ้นเพื่อล้อมรอบไม่ให้สิ่งแปลกปลอมนั้นแพร่กระจายไปได้ จนลุกลามไปทั่วร่างกาย พร้อมกับการเกิดเม็ดสีดำ (melanin production) ในระบบโพรฟีนอลออกซิเดส (Johansson และ Söderhäll, 1989)

2.8.1.4 <u>การห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอม (encapsulation)</u>

การห่อหุ้มสิ่ง แปลกปลอมจะเกิดขึ้นเมื่อมีสิ่งแปลกปลอมขนาดใหญ่มากกว่า 10 ไมโครเมตร (Lackie, 1980) เข้าสู่ร่างกายหรือเชื้อที่ทำอันตรายกับร่างกายมีการเพิ่มปริมาณจนการสร้างโนดูลไม่สามารถควบคุมได้ เม็ดเลือดจำนวนมากจะเข้ามาล้อมรอบและมีการทำงานของระบบโพรฟีนอลออกซิเดสเข้ามาทำลายสิ่งแปลกปลอมร่วมด้วยดังแสดงในรูปที่ 8



รูปที่ 8 แสดงระบบภูมิคุ้มกันโรคของกุ้ง (ที่มา: อัญชลี ทัศนาขจร, 2553)

2.8.2 ภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยสารน้ำ (hemoral defenses)

ระบบภูมิคุ้มกันสิ่งแปลกปลอมโดยสารน้ำหรือสารที่เป็นองค์ประกอบในน้ำเลือดได้แก่เลคติน (lectins) สารต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย (antibacterial substances) เอนไซม์ไลโซไซม์ (lysozyme) และระบบโพรฟีนอลออกซิเดส (Prophenoloxidase system) โดยสารประกอบบางชนิดเป็นโปรตีน บางชนิดเป็นเอนไซม์ สารประกอบในน้ำเลือดส่วนใหญ่ถูกหลั่งมาจากแกรนนูลของเซลล์เม็ดเลือด ซึ่งมีความสามารถในการทำลายแบคทีเรีย หรือทำให้เกิดการแตกของเซลล์ (Smith และ Söderhäll, 1983; ทวีศักดิ์ ศรีชนะ, 2547)

2.8.2.1 กระบวนการที่เกี่ยวข้องกับเลคติน (lectin)

เลคติน (lectins) หรือเรียกกันอีกชื่อว่า agglutinin โดยเลคตินเป็นโปรตีน หรือไกลโคโปรตีน (glycoprotein) มีความสามารถเชื่อมต่อกับคาร์โบไฮเดรตที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ที่ประกอบด้วย polysaccharide และ glycan (ทวีศักดิ์ ศรีชนะ, 2547) การจับของเลคตินทำให้สารประกอบประเภทคาร์โบไฮเดรตตกตะกอนหรือทำให้เซลล์เกาะกลุ่มกันได้ (agglutination) ในสัตว์จำพวกกุ้งเลคตินเป็นตัวการสำคัญในระบบ การรับรู้ถึงการแทรกแซงของสิ่งแปลกปลอม (recognition system) (Ratcliffe และคณะ, 1985) เลคตินสามารถทำให้จุลินทรีย์เกาะกลุ่มกันได้ (agglutination) และช่วยในกระบวนการเชื่อมต่อระหว่างเม็ดเลือดกับสิ่งแปลกปลอมโดยการทำหน้าที่เป็นออพโซนิน (opsonins) (Ratanapo และ Chulavatnatol, 1990)

2.8.2.2 สารต่อต้านแบคทีเรีย (antibacterial substances)

พบได้ในน้ำเลือดของกุ้ง มีฤทธิ์ฆ่าแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก นอกจากพบได้ในพลาสมา ซีรัม สารละลาย hemocyte lysate supernatant แล้วยังพบสารต่อต้านเชื้อแบคทีเรียได้ในตับและตับอ่อน (สารต้านแบคทีเรียสามารถถูกชักนำให้สูงขึ้นได้เมื่อได้รับการกระตุ้น สารดังกล่าวไม่ทนคนความร้อน และมีความจำเพาะต่อเชื้อบางชนิด (ชัยชาญ ไตรศรีศิลป์, 2545)

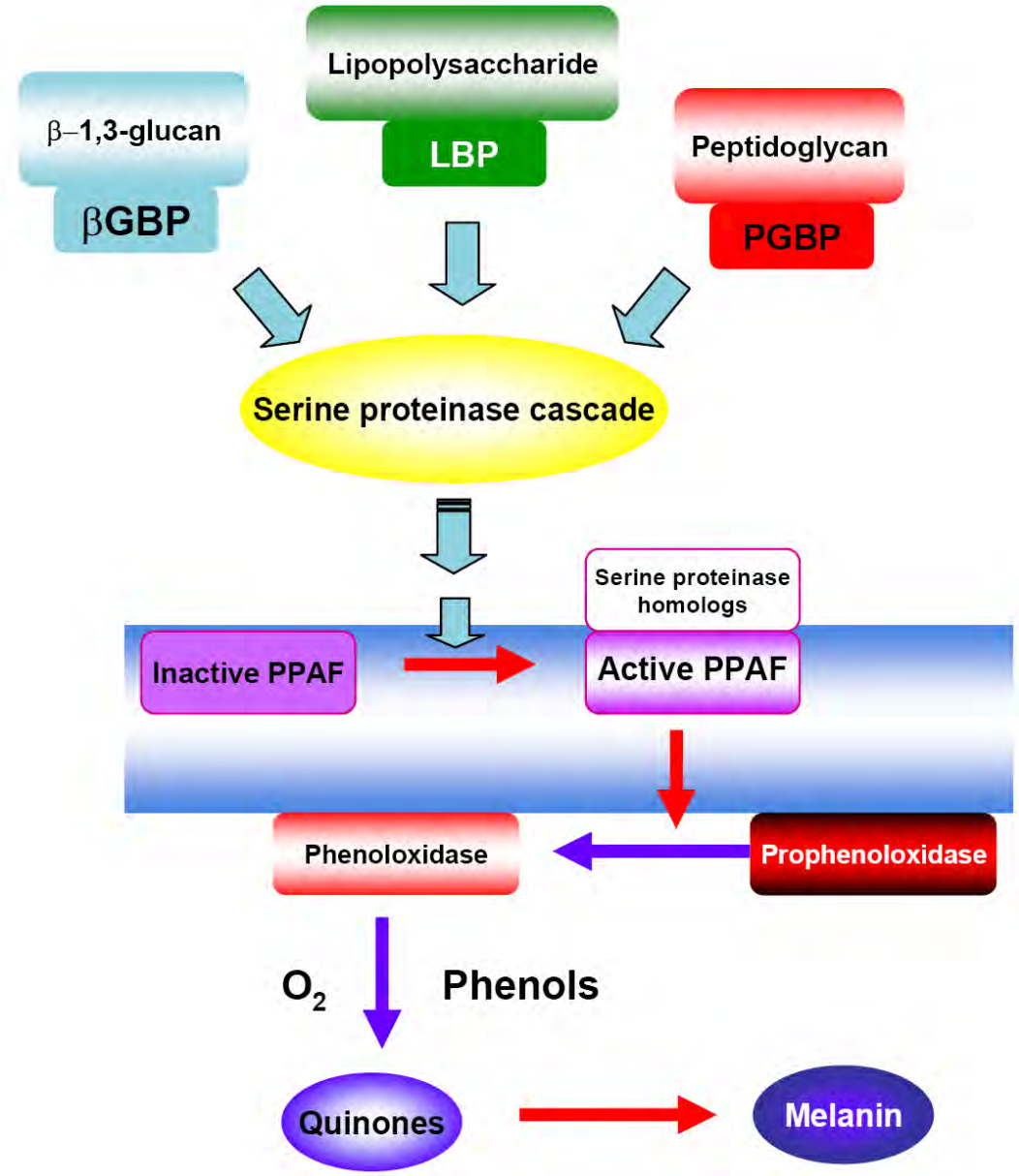
2.8.2.3 เอนไซม์ไลโซไซม์ (lysozyme)

มีต้นกำเนิดอยู่ในเซลล์เม็ดเลือดชนิด granular ซึ่งจะถูกปลดปล่อยออกสู่กระแสเลือดเพื่อตอบสนองต่อการกระตุ้นบางอย่าง เอนไซม์ไลโซไซม์มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวก แต่มีฤทธิ์เพียงเล็กน้อยต่อแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากไม่สามารถทำให้เกิดการแยกของผนังเซลล์ได้ แต่ช่วยให้แบคทีเรียมีความไวมากต่อการออกฤทธิ์ของสารต้านแบคทีเรีย (Santarem และ Figueras, 1995)

2.8.2.4 ระบบโพรฟีนอลออกซิเดส (Prophenoloxidase system)

กิจการ ศุภมาตย์ (2543) อธิบายว่า ระบบโพรฟีนอลออกซิเดส (prophenoloxidase system)เป็นกระบวนการสร้างเม็ดสีดำที่เรียกว่า เมลานีน(Melanin pigment) โดยเมลานิน จะเป็นตัวทำลายสิ่งแปลกปลอมที่อยู่ในเม็ดเลือด ระบบโพรฟีนอลออกซิเดสจะทำงานโดยอาศัยองค์ประกอบของเอนไซม์โพรฟีนอลออกซิเดสซึ่งจะพบได้ในเม็ดเลือดชนิดเซมิกรานูลาร์ และ กรานูลาร์โดยจะมีการเก็บเอ็นไซม์ไว้ในเม็ดกรานูลที่อยู่ในไซโตพลาสซึม ปกติเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสที่อยู่ในแกรนูลจะอยู่ในรูปของโปรเอนไซม์ที่ไม่แอกทีฟ การเปลี่ยนแปลงให้อยู่ในรูปของเอนไซม์ phenoloxidase นั้นต้องอาศัยการเปลี่ยนแปลงหลายขั้นตอนโดยพบว่าระบบนี้สามารถถูกกระตุ้นด้วยสารประกอบของผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ ได้แก่ lipopolysacharide (LPS), peptidoglycan และ β -1,3 glucan ซึ่งจะจับกับโมเลกุลจดจำได้แก่ β -1,3 glucan-binding protein (BGBP) และ lipopolysaccharide- β -1,3 glucan-binding protein (LGBP), (Duvic และ Söderhäll,1990; Lee และคณะ, 2000) เกิด complex จับกับเซลล์เม็ดเลือดก่อให้เกิดการสลายแกรนูลโดยมีการหลั่งของเอนไซม์ prophenoloxidase activating enzyme (ppA) พร้อมกับเอนไซม์ proPO โดยเอนไซม์ ppA ในรูปที่แอคทีฟสามารถเปลี่ยนเอนไซม์ prophenoloxidase ไปเป็น

phenoloxidase ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัวสำคัญของกระบวนการ melanization โดยจะทำปฏิกิริยาออกซิเดชั่นเพื่อเปลี่ยนสารกลุ่ม phenol ไปเป็น quinone และเปลี่ยนเป็น melanin ซึ่งจะช่วยยับยั้งหรือป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ได้ (Söderhäll และ Cerenius, 1998) (รูปที่9) โดย melanin ที่เกิดขึ้นสามารถเห็นเป็นจุดสีดำบนเปลือกและเหงือกรวมทั้งบริเวณรอบๆ บริเวณที่เกิดกระบวนการฟาโกไซโทซิส โนดูลฟอร์เมชั่น และเอนแคปซูลเลชั่น โดยกระบวนการโปรพีโอจะถูกควบคุมไม่ให้มีมากเกินไปด้วยเอนไซม์ proteinase inhibitor เช่น pacifastin และ α2-macroglobulin เป็นต้น การเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมภายนอก มีผลกระทบต่อการตอบสนองต่อกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสของกุ้งกุลาดำ พบว่าการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิจาก 26 เป็น 35 องศาเซลเซียส ส่งผลให้ปริมาณของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสลดลงถึง 30 % ส่วนการลดลงของ pH จาก 7.8 เป็น 6.0 ทำให้ปริมาณของเอ็นไซม์ดังกล่าวลดลง 31 % ปริมาณของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสสามารถเพิ่มขึ้นได้เมื่อกุ้งได้รับอาหารเสริม 0.01% β -glucan พบว่าเมื่อเสริมสารดังกล่าวเป็นเวลา 4 สัปดาห์สามารถกระตุ้นให้ปริมาณของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสเพิ่มขึ้นได้ (ขวัญดาว จันทโชติ, 2551)



รูปที่ 9 แสดงกลไลการทำงานของฟีนอลออกซิเดส (ที่มา: อัญชลี ทัศนาขจร, 2553)
(GBP = β -1,3-glucan Binding Protein; LBP = Lipopolysaccharide และ β -1,3-glucan-binding Protein; PGBP = Peptidoglycan-binding Protein ; PPAF = Prophenoloxidase activating enzyme)

2.9 การใช้สารกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน (Immunostimulants) ในกุ้งขาว

ปัจจุบันการใช้สารปฏิชีวนะเพื่อป้องกันและรักษาโรคมีข้อจำกัดอย่างมาก เนื่องจากปัญหาการเกิดสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ดื้อยา รวมถึงปัญหาสารตกค้างที่ตรวจพบในผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำซึ่งก่อให้เกิดผลเสียต่อผู้บริโภคและผู้ส่งออก การใช้อาการผสมสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunostimulant) เพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ(nonspecific immunity) น่าจะเป็นทางเลือกที่จะลดปัญหาการสูญเสียทางเศรษฐกิจอันเกิดจากโรคสัตว์น้ำ (ชนกันต์ จิตมนัส, 2547) สารกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันเป็นสารซึ่งมีคุณสมบัติในการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวทำให้เกิดความต้านทานต่อโรคติดเชื้อจากไวรัส แบคทีเรีย รา โปรโตซัว และช่วยลดความเสี่ยงของการระบาดของโรค หรือภาวะที่เสี่ยงต่อการทำให้เกิดการอ่อนแอ เช่น การจับ การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิและสภาพแวดล้อม (Raa, 2000)

2.9.1 สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันจากพืช

Cheng และคณะ (2005) ได้รายงานถึงการใช้ sodium alginate ในอาหารเพื่อเพิ่มภูมิคุ้มกันในกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei* และความต้านทานการติดเชื้อ *Vibrio alginolyticus* โดยกุ้งขาวที่ได้รับอาหารเสริม sodium alginate ที่ระดับ 2 กรัมหรือน้อยกว่าต่อกิโลกรัมอาหารเป็นเวลา 5 เดือน แล้วได้รับเชื้อ *V. alginolyticus* ปริมาณ 2 x 106 cfu ต่อกุ้งหนึ่งตัว หลังจากได้รับเชื้อ 1 วัน พบว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารเสริม sodium alginate ที่ระดับ 2.0 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร มีการรอดชีวิตสูงสุด และหลังจากได้รับเชื้อ 2-4 วัน กุ้งขาวที่ได้รับอาหารเสริม sodium alginate ที่ระดับ 0.5 และ 1.0 กรัมต่อกิโลกรัมอาหารมีการรอดชีวิตเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม สามารถเพิ่มการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน โดยมีค่า phenoloxidase activity, respiratory burst, phagocytic activity และ clearance efficiency ต่อเชื้อ *V. alginolyticus* เพิ่มขึ้น สามารถต้านทานการติดเชื้อ *V. alginolyticus* ได้

2.9.2 สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันจากแบคทีเรีย

ขวัญดาว จันทโชติ (2551) ได้ศึกษาผลของอาหารเม็ดสำเร็จรูปเสริมบีตากลูแคนและนิวคลีโอไทด์ เปรียบเทียบกับอาหารชุดควบคุมในกุ้งขาวแวนนา โดยเลี้ยงกุ้งด้วยอาหารเสริม 0.01%บีตากลูแคน 2%นิวคลีโอไทด์เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า การตอบสนองภูมิคุ้มกันในกุ้งขาวแวนนาไมก่อนการชักนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 1526 อาหารเสริม 0.01 %บีตากลูแคน มีค่าปริมาณเม็ดเลือดรวมและแอคทิวิตีของฟีนอลออกซิเดสมีค่าสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารทดลองสูตรอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) การตอบสนองภูมิคุ้มกันในกุ้งขาวแวนนาไม

หลังการชักนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 1526 เป็นเวลา 4 วัน พบว่า อาหารเสริม 0.01 %บีตากลูแคน มีค่าปริมาณเม็ดเลือดรวมและแอคทิวิตีของฟีนอลออกซิเดสมีค่าสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารทดลองสูตรอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และเปอร์เซ็นต์การตายสะสมของกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริม 0.01 %บีตากลูแคนมีเปอร์เซ็นต์การตายสะสมที่น้อยที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารทดลองเสริม 2%นิวคลีโอไทด์และอาหารทดลองชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ ฉัทชนัน ศิริไพศาล และคณะ (2549) ได้ศึกษาการใช้เบต้ากลูแคนเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งขาว พบว่ากุ้งขาวที่ได้รับเบต้ากลูแคนความเข้มข้น 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 14 วัน มีระดับภูมิคุ้มกันแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

Liu และคณะ (2010) ได้ศึกษาผลของการใช้โพรไบโอ *Bacillus subtilis* E20 ต่อภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไมวัยอ่อน พบว่าเมื่อทำการวิเคราะห์ยีนส์ที่เกี่ยวกับภูมิคุ้มกันหลังจากทำการเลี้ยงกุ้งด้วยโพรไบโอติกเป็นเวลา 14 วันพบว่าการแสดงออกของยีนส์ prophenoloxidase I, prophenoloxidase II, และ lysozyme เพิ่มขึ้นและแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

2.10 **โพรไบโอติก** (Probiotics)

โพรไบโอติก (Probiotic) มาจากภาษากรีกแปลว่า “เพื่อชีวิต” (for life) (Fuller, 1992) คำว่า โพรไบโอติก ถูกให้ความหมายครั้งแรกในปี 1953 โดย Kollath ได้ให้คำจำกัดความว่าเป็นสารที่ตรงกันข้ามกับสารปฏิชีวนะ (Hamilton-Miller และคณะ, 2003) ปัจจุบันองค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ (FAO) และองค์การอนามัยโลก (WHO) ได้ให้คำนิยามว่า โพรไบโอติกคือจุลินทรีย์ที่มีชีวิตซึ่งเมื่ออยู่ในปริมาณที่พอเพียงจะให้ประโยชน์ต่อสุขภาพของสัตว์เจ้าบ้าน

คำนิยามเกี่ยวกับโปรไบโอติกอาจจะมีการเปลี่ยนแปลงได้อีกตลอดเวลา เพราะนักวิทยาศาสตร์ยังคงค้นคว้าเกี่ยวกับโปรไบโอติก หรือโครงสร้างของเซลล์นั้นๆ ที่อาจก่อให้เกิดประโยชน์กับสุขภาพของมนุษย์ ดังนั้นด้วยเหตุนี้เองจึงยังคงมีคำนิยามใหม่ๆ เกิดขึ้นเสมอ และอาจจะมีการเปลี่ยนแปลงได้อีกเรื่อยๆ ในอนาคตข้างหน้า (ตารางที่ 4) (Lee และคณะ, 1999; Salminen และคณะ, 1999)

ตารางที่ 4 คำนิยามของโพรไบโอติก

อดีต (ก่อนมีการนำมาใช้กับคน)	ปัจจุบัน (หลังมีการนำมาใช้กับคน)
“สารที่ขับออกมาโดยจุลินทรีย์ซึ่งมีผลต่อการเจริญของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ” (Lilley และ Stellwell, 1965)	“โพรไบโอติก รวมการเติมจุลินทรีย์ที่มีชีวิต ในน้ำแหล่งอาศัยของสัตว์ชนิดนั้นๆ ซึ่งสัตว์นั้นอาศัยอยู่” (Moriarty ,1998)
“อาหารเสริมของสัตว์ที่มีประโยชน์ต่อร่างกายสัตว์ที่ถูกอาศัย โดยส่งผลต่อจุลินทรีย์ภายในระบบทางเดินอาหาร” (Parker, 1974)	“จุลินทรีย์เสริมที่มีชีวิต ซึ่งมีผลเป็นประโยชน์ต่อเจ้าบ้าน โดยปรับสมดุลจุลินทรีย์ของเจ้าบ้านให้ดีขึ้น” (Gram, 1999)
“อาหารเสริมจากจุลินทรีย์ที่มีชีวิต ซึ่งส่งผลต่อร่างกายสัตว์ที่ถูกอาศัย โดยการช่วยปรับปรุงสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้” (Fuller, 1989)	“เซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกนำเข้าไปในลำไส้และสามารถมีชีวิตอยู่ได้ เพื่อวัตถุประสงค์ที่จะปรับปรุงสุขภาพให้ดีขึ้น” (Gatesoupe, 1999)
“เชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิตเดี่ยวหรือผสม ซึ่งเมื่อประยุกต์ใช้ในคนและสัตว์แล้วก่อให้เกิดประโยชน์กับผู้ถูกอาศัย โดยจะช่วยในการปรับปรุงคุณสมบัติของจุลินทรีย์ในลำไส้” (Havenaar และ Huis in’t Veld, 1992)	”เซลล์แบคทีเรียมีชีวิต หรืออาหารซึ่งมีเซลล์แบคทีเรียมีชีวิต หรือส่วนประกอบของเซลล์แบคทีเรีย ที่ให้ผลประโยชน์ต่อสุขภาพเซลล์ของเจ้าบ้าน” (Lee และคณะ, 1999)
“เชื้อจุลินทรีย์ที่ได้จากการเตรียมจุลินทรีย์ที่มีชีวิต และ/หรือเซลล์ตายแล้ว ซึ่งมีจุดมุ่งหมายเพื่อช่วยปรับปรุงสมดุลของเชื้อจุลินทรีย์และเอนไซม์ในผนังเนื้อเยื่อเมือก หรือช่วยกระตุ้นกลไกของระบบภูมิต้านทาน” (Reuter, 1997)	“จุลินทรีย์เสริมที่มีชีวิตซึ่งมีผลที่เป็นประโยชน์ต่อสัตว์เจ้าบ้าน โดยเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องหรืออยู่รอบๆ เจ้าบ้าน หรือโดยปรับปรุงการใช้ประโยชน์จากอาหารหรือพัฒนาคุณค่าทางโภชนาการ หรือโดยพัฒนาการตอบสนองต่อโรค หรือโดยพัฒนาคุณภาพสิ่งแวดล้อมของเจ้าบ้าน” (Verchuere, 2000)
“จุลินทรีย์มีชีวิตที่ใช้เสริมในอาหาร โดยมีวัตถุประสงค์ในการปรับปรุงสุขภาพให้ดีขึ้น” (Tannock, 1997)	“ผลิตภัณฑ์ที่ประกอบด้วยจุลินทรีย์มีชีวิตในปริมาณเพียงพอที่จะเข้าไปยึดพื้นที่ แทนจุลินทรีย์ประจำถิ่นเดิม ในทางเดินอาหารของเจ้าบ้าน และเป็นประโยชน์ต่อสุขภาพของเจ้าบ้าน” (Schrezenmeir และ Devrese, 2001)

2.10.1 **จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโพรไบโอติก**

จุลินทรีย์โพรไบโอติกถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายทั้งในคน (Holzafel และคณะ, 1998) และสัตว์บก คือ วัว ควาย แกะ แพะ หมู สัตว์ปีก และรวมถึงสัตว์เลี้ยงด้วย (Fuller, 1989) จุลินทรีย์ที่นำมาเป็นโพรไบโอติกส่วนใหญ่จะเป็นแบคทีเรียโดยเฉพาะแลคติกแอซิดแบคทีเรีย มีราเป็นส่วนน้อย โดยโพรไบโอติกที่ใช้นี้อาจจะประกอบด้วยจุลินทรีย์สายพันธุ์เดี่ยวหรือจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์ และอาจใช้มากกว่า 8 สายพันธุ์ในผลิตภัณฑ์ที่เตรียม (Fuller, 1989)

2.10.2 **โพรไบโอติกที่ดีควรมีลักษณะดังนี้** (Fuller, 1989)

1. ควรเป็นสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดประโยชน์ต่อสัตว์ที่ได้รับโพรไบโอติก เช่น เพิ่มการเจริญเติบโตของสัตว์ หรือต้านทานการเกิดโรคในสัตว์
2. ไม่เป็นสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรค
3. เป็นเซลล์ที่มีชีวิต และสามารถเพิ่มจำนวนได้มาก
4. สามารถมีชีวิตอยู่รอดและทำงานได้ในกระเพาะอาหาร
5. มีความคงทนและสามารถรอดชีวิตได้ในสภาพการเก็บรักษาและในขณะทำการทดลอง

2.10.3 **โพรไบโอติกกับการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม**

ปัจจุบันนักวิจัยและผู้ประกอบการด้านการเตรียมอาหารเริ่มเล็งเห็นถึงศักยภาพของจุลินทรีย์โพรไบโอติกมากขึ้น จึงมีการศึกษาและทำวิจัยเกี่ยวกับโพรไบโอติกในกุ้ง อีกทั้งเกษตรกรยังสามารถหาซื้อโพรไบโอติกนำมาเพาะเลี้ยงกุ้งได้ง่าย นอกจากนี้มีการพัฒนาเทคโนโลยีการเลี้ยงโดยไม่มีการใช้สารปฏิชีวนะใดๆ ตลอดระยะเวลาการเลี้ยง เรียกว่า โพรไบโอติก ฟาร์มมิ่ง (Probiotic Farming) โดยระบบการเลี้ยงดังกล่าวจะใช้จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์และไม่เป็นภัยต่อสิ่งแวดล้อม เพื่อทดแทนการใช้สารเคมี ด้วยการใช้แบคทีเรียที่ดี (SuperBiotic) ไปควบคุมแบคทีเรียที่ไม่ดี อันเป็นต้นเหตุของโรคต่างๆ ในกุ้งและป้องกัน ไวรัสในกุ้ง ประกอบกับการใช้ระบบการจัดการบ่อที่มีประสิทธิภาพจะทำให้กุ้งที่เลี้ยง แข็งแรง มีการรอดชีวิตสูง การใช้โพรไบโอติกแบคทีเรียในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม จากอดีตถึงปัจจุบันดังแสดงผลการใช้ในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ใช้ในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม

จุลินทรีย์โพรไบโอติก	จุลินทรีย์ที่ใช้ในการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค	วิธีให้จุลินทรีย์โพรไบโอติก	ผลการศึกษา	รายการอ้างอิง
Bacillus subtilis E20	-	เติมในน้ำเพาะเลี้ยง	กระตุ้นภูมิคุ้มกัน	Liu และคณะ (2010)
Bacillus coagulans SC8168	-	เติมในน้ำเพาะเลี้ยง	เพิ่มการรอดชีวิตและเพิ่มการทำงานของเอนไซม์อะไมเลส ไลเปส	Zhou และคณะ (2009)
Bacillus subtilis E20	*Vibrio alginolyticus*	ผสมในอาหาร	เพิ่มการรอดชีวิต เพิ่มแอคทิวิตี้ของฟีนอลออกซิเดส และการกลืนทำลายสิ่งแปลกปลอม	Tseng และคณะ (2009)
Vibrio alginolyticus UTM 102 *Bacillus subtilis* UTM 126 *Roseobacter gallaeciensis* SLV03 *Pseudomonas aestumarina* SLV22	*Vibrio parahaemolyticus* PS-017	ผสมในอาหาร	ลดการเกิดโรดเมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วย *Vibrio parahaemolyticus* PS-017	Balcázar และคณะ (2007)
Bacillus OJ	White spot syndrome virus	ผสมในอาหาร	กระตุ้นภูมิคุ้มกัน และลดการตายเมื่อถูกเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย white spot syndrome virus	Li และคณะ (2009)
Vibrio P62 *Vibrio* P63 และ *Bacillus* P64	*Vibrio harveyi* (S2)	-	*Vibrio* P62 ที่แสดงคุณสมบัติในการเป็นโพรไบโอติก	Gullian และคณะ (2004)

Rhodosporidium paludigenum	-	ผสมในอาหาร	กุ้งโตเร็ว และเพิ่มสารต้านอนุมูลอิสระ	Yang และคณะ (2010)
Photosynthetic bacteria และ *Bacillus* sp	-	ผสมในอาหาร	กุ้งโตเร็ว และเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวกับการย่อยอาหาร โปรตีเอส อะไมเลส ไลเปส และเซลลูเลส	Yan-Bo Wang (2007)
Lactobacillus plantarum	*Vibrio alginolyticus*	ผสมในอาหาร	เพิ่มปริมาณเม็ดเลือดรวม การกลืนกินทำลายสิ่งแปลกปลอม แอคทิวิตี้ของฟีนอลออกซิเดส กระตุ้น respiratory bursts เพิ่มสารต้านอนุมูลอิสระ	Chiu และคณะ (2007)
Vibrio alginolyticus ร่วมกับ β-1,3/1,6-glucans	White spot syndrome virus	ผสมในอาหาร	เพิ่มการรอดชีวิต เพิ่มความเข้มข้นของพลาสมาโปรตีน ซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน สารต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย และเม็ดเลือดรวม	Rodríguez และคณะ (2007)
Commercial probiotics	-	-	ลดพิษของในโตรเจนและฟอสเฟสในตะกอนก้นบ่อ	Wang และ He (2009)

2.11 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Rengpipat และคณะ (1998a) รายงานการใช้ *Bacillus* S11 ที่คัดแยกได้จากทางเดินอาหารกุ้งกุลาดำจากอ่าวไทย เป็นโพรไบโอติกผสมกับอาหารสำหรับเลี้ยงกุ้งกุลาดำระยะโพสลาวา 30 (PL30) เป็นเวลา 100 วัน ในบ่อปูนซีเม็นต์ จากการศึกษาพบว่ากุ้งกุลาดำกลุ่มที่ให้อาหารเสริมโพรไบโอติกมีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) และหลังจากชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ D331 เป็นเวลา 10 วันพบว่า กุ้งกลุ่มที่ให้อาหารผสม *Bacillus* S11 มีการรอดชีวิต 100 % ขณะที่กลุ่มควบคุม มีการรอดชีวิตเพียง 26 %

Rengpipat และคณะ (1998b) รายงานการใช้ *Bacillus* S11 เป็นโพรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ โดยส่งผ่านทางอาร์ทีเมีย ซึ่งเป็นอาหารกุ้งกุลาดำด้วยวิธี Bioencapsulation หลังจากเลี้ยงกุ้งกุลาดำ หลังจากเลี้ยงกุ้งระยะโพสลาวา 10 (PL10) เป็นเวลา 14 วัน พบว่ากุ้งกุลาดำกลุ่มที่กินอาร์ทีเมียซึ่งมีโพรไบโอติกผสมอยู่ โตเร็วและมีปัญหาการเกิดโรคน้อยกว่ากุ้งกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

Rengpipat และคณะ (2000) ติดตาม Immune index จากเลือดกุ้งกุลาดำ พบว่ากุ้งกุลาดำที่เสริมด้วยโพรไบโอติก *Bacillus* S11 มีค่าของ Immunity Indexes โดยรวมมากกว่าที่ตรวจพบในกุ้งกุลาดำกลุ่มควบคุม โดยเฉพาะ Phagocytosis และ Phagocytic Indexs จากเลือดดุ้งกุลาดำ Immune indexs เพิ่มขึ้นตามอายุของกุ้งที่เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเจน และเมื่อทำการเหนี่ยวนำให้กุ้งกุลาดำเกิดโรคเรืองแสง ค่า Phagocytic Indexes การรอดชีวิต และน้ำหนักตัวของกุ้งกุลาดำในกลุ่มที่เสริมโพรไบโอติกสูงกว่าที่ตรวจพบในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

Rengpipat และคณะ (2003) รายงานการใช้โพรไบโอติก *Bacillus* S11 เสริมในอาหารสำหรับเลี้ยงกุ้งกุลาดำระยะโพสลาวา 30 (PL30) โดยเลี้ยงในกระชังขนาดพื้นที่ประมาณ 2 ตารางเมตรในบ่อดิน เป็นเวลา 100 วัน พบว่ากุ้งกลุ่มที่ให้อาหารเสริมโพรไบโอติกมีน้ำหนักตัว และการรอดชีวิตมากกว่ากุ้งกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) และจากการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคเรืองแสงด้วย *Vibrio harveyi* 1526 เป็นเวลา 8 วัน 2 ครั้ง พบว่ากุ้งกลุ่มควบคุมตายหมดในวันที่ 6 ในขณะที่กุ้งกลุ่มให้อาหารเสริมโพรไบโอติกยังรอดชีวิตอยู่ 5% และ 9% ตามลำดับ

ศิริเพ็ญ สังข์ชัย (2546) รายงานการใช้ *Bacillus* P11 ที่คัดแยกได้จากทางเดินอาหารแม่พันธ์กุ้งกุลาดำใน จ.ชลบุรี และ จ.ตรัง เป็นโพรไบโอติกผสมกับอาหารสำหรับเลี้ยงกุ้งกุลาดำระยะโพสลาวา 25 (PL25) เป็นเวลา 100 วัน ในบ่อปูนซีเม็นต์ขนาด 400 ลิตร จากการศึกษาพบว่ากุ้งกุลาดำกลุ่มที่ให้อาหารเสริมโพรไบโอติกมีการเจริญเติบโตและการรอดชีวิตสูงกว่ากุ้งกุลาดำกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) และหลังจากชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 639 เป็นเวลา 10 วันพบว่า กุ้งกลุ่มควบคุมจะมีการตายสะสม 50% ในวันที่ 5 และตายหมดบ่อในวันที่ 8 ในขณะที่กุ้งกลุ่มให้อาหารเสริม *Bacillus* P11 มีการตายสะสมน้อยกว่า 50 % หลังเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 639 เป็นเวลา 10 วัน

Gullian และคณะ (2004) รายงานผลการใช้ *Bacillus* P64 โดย แช่ *P. vannamei* หรือกุ้งขาวในน้ำซึ่งมี *Bacillus* P64 10^7CFU/ml พบว่า กุ้งกลุ่มโพรไบโอติกมีน้ำหนักมากขึ้น หลังการชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* กุ้งกลุ่มโพรไบโอติกมีจำนวนไฮยาลินเซลล์ และ ฟีนอลออกซิเดสปริมาณสูงขึ้น

พลพิสิฐ อุทิศวรรณกุล (2548) รายงานการใช้ *Bacillus subtilis* P11 ในการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* ระดับทดลอง พบว่า *B. subtilis* P11 สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำในการเพาะเลี้ยงกุ้ง โดยกุ้งกลุ่มที่ได้รับโพรไบโอติกมีการเติบโตเฉลี่ยมากกว่า และมีปริมาณเม็ดเลือดรวมและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในเลือดสูงกว่ากุ้งกลุ่มควบคุมกุ้งกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับโพรไบโอติกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) จากการทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 พบว่ากุ้งกลุ่มโพรไบโอติก มีการตายสะสมของกุ้งกลุ่มโพรไบโอติกต่ำกว่ากุ้งกลุ่มควบคุม

Yan-Bo Wang (2006) ได้ศึกษาผลของการใช้โพรไบโอติกต่อการเจริญ และเอนไซม์การย่อยอาหารของกุ้งขาว โดยการใช้ Photosynthetic bacteria ร่วมกับ *Bacillus* sp. หลังจากทำการเลี้ยงเป็นเวลา 28 วันพบว่ากุ้งที่ได้รับโพรไบโอติกมีการเจริญเติบโตที่เร็วขึ้น และพบว่าเอนไซม์ที่เกี่ยวกับการย่อยอาหาร โปรตีเอส อะไมเลส ไลเปส และเซลลูเลส มีค่าแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

สุมิตรา นามประดิษฐ์กุล(2551) รายงานการใช้ *Bacillus* S11 เสริมในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 16 โดยให้ผ่านทางอาร์ทีเมียเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าความยาวเฉลี่ยของกุ้งขาวที่ให้อาร์ทีเมียเสริมโพรไบโอติก 100 % มีความยาวเฉลี่ย น้ำหนักและการรอดชีวิตสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์ที่สำคัญ

1. เครื่องชั่งน้ำหนัก
2. หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave)
3. ตู้บ่มเชื้อ (incubator)
4. เครื่องเขย่า (Shaker)
5. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker)
6. เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Refeigerated centrifuge)
8. กล้องจุลทรรศน์ (Microscope)
9. สไลด์นับเม็ดเลือด (Hemacytometer)
10. เครื่องทำอนุภาคแตกโดยใช้คลื่นเสียง (Sonicator)
11. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophoto meter)
12. เครื่องผสมสาร (Vortex mixer)
13. เครื่องวัดค่าออกซิเจนละลายในน้ำ (DO meter)
14. เครื่องวัดค่าพีเอช (pH)
15. เครื่องวัดความเค็ม (Refractometer)
16. อ่างน้ำปรับอุณหภูมิ (Water bath)

3.2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปซอย (Tryptic soy broth; TSB) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งไทโอซัลเฟตซิเตรทบายซอลท์ซูโครส (Thiosulfate citrate bile salt sucrose agar; TCBS) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
3. ชุดตรวจสอบคุณภาพน้ำ คณะสัตว์แพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
4. ชุดทดสอบ API 50 CHB ของบริษัท biomerieux, France

3.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

1. Bacillus subtilis สายพันธุ์ S11 (*Bacillus* S11)

เป็นโพรไบโอติกแบคทีเรียที่แยกและคัดเลือกสายพันธุ์จากลำไส้กุ้งกุลาดำจากอ่าวไทย ที่มีสุขภาพดีโดย Rengpipat และคณะ (1998a) ใช้สำหรับเตรียมเซลล์เพื่อผสมในอาหารเลี้ยงกุ้งขาว

2. *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ P11 (*Bacillus* P11)

เป็นโพรไบโอติกแบคทีเรียที่แยกและคัดเลือกสายพันธุ์จากลำไส้กุ้งกุลาดำจากชายฝั่งทะเล จังหวัดชลบุรีโดย ศิริเพ็ญ สังข์ชัย (2546) ใช้สำหรับเตรียมเซลล์เพื่อผสมในอาหารเลี้ยงกุ้งขาว

3. *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 จากหน่วยวิจัยกุ้ง CENTEX ประเทศไทย

3.4 วิธีดำเนินการวิจัย

3.4.1 ตรวจสอบรูปร่างของ *Bacillus* S11 และ *Bacillus* P11 และสมบัติทางชีวเคมีโดยใช้ชุดทดสอบ API 50 CHB

1. ลักษณะการเจริญ

สังเกตลักษณะขอบ รูปร่าง และลักษณะการสร้างสี (pigment) ของโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็งทริปติกซอย และอาหารเหลวทริปติกซอย

2. การติดสีแกรม

นำแบคทีเรียที่เจริญในอาหารแข็งทริปติกซอยอายุ 24 ชั่วโมง มาย้อมดูการติดสีแกรม นำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

3. การย้อมเอ็นโดสปอร์

นำแบคทีเรียที่เจริญในอาหารแข็งทริปติกซอยอายุ 48 ชั่วโมง มาย้อมเอ็นโดสปอร์ นำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

4. สมบัติทางชีวเคมีโดยใช้ชุดทดสอบ API 50 CHB

เตรียม Strip ตามคู่มือการใช้ API 50 CHB นำมาทดสอบด้วยชุดทดสอบ API 50 CHB แล้วแปรผลการทดลองด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป APILAB V.1.2.1

3.4.2 ทดสอบปฏิสัมพันธ์ของ *Bacillus* S11 และ *Bacillus* P11 ในการเลี้ยงแบบ mixed culture ในระดับหลอดทดลอง

3.4.1.1 ทดสอบการยับยั้งการเจริญซึ่งกันและกันโดยวิธีการขีดไขว้ (Cross Streak)

นำ *Bacillus* S11 และ*Bacillus* P11 มาเลี้ยงในอาหารเหลวทริปติกซอยบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชม. ทดสอบการยับยั้งการเจริญของ *Bacillus* P11 โดย *Bacillus* S11 ด้วยการนำ *Bacillus* S11 มาขีดเป็นเส้นตรงนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงจากนั้นขีด *Bacillus* P11 ไขว้กันในแนวตั้งฉากนำไปบ่ม ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกผลการทดลองโดยดูการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ สำหรับการทดสอบการยับยั้งการเจริญของ *Bacillus* S11 โดย *Bacillus* P11 ก็ทำในวิธีเดียวกัน

3.4.1.2 ทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบในอาหารเหลวโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร (ดัดแปลงจาก Barefoot และ Klaenhammer, 1983)

1. การเตรียมส่วนน้ำใส *Bacillus* P11 เพื่อใช้ในการยับยั้ง *Bacillus* S11

เขี่ย *Bacillus* P11 จากอาหารแข็งทริปติกซอย 1 ลูปลงในอาหารเหลวทริปติกซอย 50 มิลลิลิตรสำหรับเตรียมหัวเชื้อ เขย่าที่ ที่ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ ต่อจากนั้นนำส่วนใสไปกรองผ่านแผ่นกรอง (Millipore membrane filter) ขนาด 0.45 ไมโครเมตร

2. การเตรียมหัวเชื้อ *Bacillus* S11 เพื่อวัดการเจริญ

เขี่ย *Bacillus* S11 จากอาหารแข็งทริปติกซอย 1 ลูปลงในอาหารเหลวทริปติกซอย 20 มิลลิลิตร เขย่าที่ ที่ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร ให้ได้ค่าประมาณ 0.03 เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ

3. ทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *Bacillus* S11 โดยส่วนน้ำใสของ *Bacillus* P11

ปิเปต *Bacillus* S11ที่ได้จากข้อ 2 มา 240 ไมโครลิตรถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปติกซอย 16 มิลลิลิตรและเติมส่วนน้ำใสที่ได้จากข้อ 1 ปริมาณ 8 มิลลิลิตร ส่วนกลุ่มควบคุม ปิเปตเชื้อ *Bacillus* S11 มา 240 ไมโครลิตรถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปติกซอย 24 มิลลิลิตร แต่ละกลุ่มทดลองทำ 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 200 รอบ วัดการดูดกลืนแสงและ spread plate ทุกๆ 1 ชม นำมาเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD660 กับเวลา และเปรียบเทียบค่า specific growth rate ระหว่างกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุม สำหรับการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *Bacillus* P11 โดยส่วนน้ำใสของ *Bacillus* S11 ก็ทำการทดลองเช่นเดียวกันแต่ใช้ส่วนน้ำใสของ *Bacillus* S11 และใช้หัวเชื้อ *Bacillus* P11 เป็นเชื้อเริ่มต้นในการติดตามการเจริญ

3.4.3 การเตรียม *Bacillus* S11 และ*Bacillus* P11 แบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกกับอาหารเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม

3.4.3.1 เลี้ยง *Bacillus* S11 ในอาหารเลี้ยง *Bacillus* S11 บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้องด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเซลล์ด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยสารละลายนอร์มัลซาไลน์ 2 ครั้งก่อน เก็บเซลล์สดที่ได้ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมงก่อนนำมาใช้

3.4.3.2 นำเซลล์สด *Bacillus* S11 ผสมกับอาหารกุ้งขาวแวนนาไมในอัตราส่วน 1:3 น้ำหนักต่อน้ำหนัก โดยใช้เซลล์สด 1 ส่วน อาหารกุ้ง 3 ส่วน ได้ปริมาณแบคทีเรียประมาณ 10^{10} CFU/กรัม (Rengpipat และคณะ, 1998a) คลุกให้อาหารกับเชื้อเข้ากันดี นำไปอบในตู้บ่ม 37°C เป็นเวลาประมาณ 1 วัน ให้อาหารแห้ง เก็บใส่ภาชนะที่สะอาดและเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

3.4.3.3 สำหรับการเตรียม *Bacillus* P11 ก็ทำในเช่นวิธีเดียวกันกับ *Bacillus* S11 แต่ใช้อาหารเลี้ยง *Bacillus* P11 เป็นอาหารเลี้ยง *Bacillus* P11 และผสมกับอาหารกุ้งขาวแวนนาไมในอัตราส่วน 1:4 น้ำหนักต่อน้ำหนักได้แบคทีเรียประมาณ 10^{10} CFU/กรัม (ศิริเพ็ญ สังข์ชัย, 2546)

3.4.3.4 นำอาหารที่ผสม *Bacillus* S11 และ อาหารที่ผสม *Bacillus* P11 ในมาผสมให้เข้ากันในอัตราส่วน 1:1, 1:2, 1:3, 2:1, 1:3 และ 3:2 และเพื่อให้ได้แบคทีเรีย *Bacillus* S11 ต่อ *Bacillus* P11 ในอัตราส่วน 1:1

3.4.3.5 ตรวจนับปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในอาหารกุ้งขาวแวนนาไม ปริมาณ *Bacillus* S11 และปริมาณ *Bacillus* P11ที่ผสมในอาหารกุ้งขาวแวนนาไมสูตรต่างๆทันที โดยวิธี total plate count ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทริปติกซอย

3.4.4 การเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในระดับบ่อปูน

3.4.4.1 การเพาะเลี้ยงครั้งที่ 1

การทดลองนี้ใช้กุ้งขาวแวนนาไมระยะวัยรุ่นจากฟาร์มเลี้ยงกุ้งเอกชนในจังหวัดปทุมธานี น้ำหนักตัวเฉลี่ยประมาณ 2.5 กรัม นำมาเลี้ยงในถังไฟเบอร์กลาสความจุ 1 ลูกบาศก์เมตร บรรจุน้ำเค็ม 20 ส่วนในพันส่วน ให้อากาศตลอดเวลา ปรับสภาพกุ้งให้คุ้นเคยกับสภาพบ่อทดลองเป็นเวลา 7 วัน โดยให้อาหารปกติที่ไม่มีการผสมแบคทีเรียโพรไบโอติกวันละ 3 ครั้ง ปริมาณที่ให้ต่อวันประมาณ 5% ของน้ำหนักตัว เมื่อปรับสภาพกุ้งแล้วจึงสุ่มคัดกุ้งลงในบ่อทดลอง การทดลองแบ่งเป็น 4 กลุ่มคือ

1. กลุ่มควบคุมเลี้ยงกุ้งขาวโดยให้อาหารปกติที่ไม่มีการผสมโพรไบโอติกแบคทีเรีย
2. กลุ่มทดลองที่ 1 เลี้ยงกุ้งขาวโดยให้อาหารที่ผสม *Bacillus* S11
3. กลุ่มทดลองที่ 2 เลี้ยงกุ้งขาวโดยให้อาหารที่ผสม *Bacillus* P11
4. กลุ่มทดลองที่ 3 เลี้ยงกุ้งขาวโดยให้อาหารที่ผสม *Bacillus* S11 ร่วมกับ *Bacillus* P11

ปล่อยกุ้ง 50 ตัวต่อบ่อ เลี้ยงกุ้งเป็นเวลา 60 วัน แต่ละกลุ่มมี 2 ซ้ำ ระบบเลี้ยงกุ้งเป็นระบบที่ประกอบด้วยระบบกรองชีวภาพอยู่ในบ่อเลี้ยง

3.4.4.2 การเพาะเลี้ยงครั้งที่ 2

การทดลองนี้ใช้กุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา (PL-15) จากโรงเพาะเลี้ยงลูกกุ้งขาวเอกชนในจังหวัดฉะเชิงเทรา นำมาเลี้ยงในถังไฟเบอร์กลาสความจุประมาณ 60 ลิตร บรรจุน้ำเค็ม 2 ส่วนในพันส่วน ให้อากาศตลอดเวลา ปรับสภาพกุ้งให้คุ้นเคยกับสภาพบ่อทดลองเป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยให้อาหารปกติที่ไม่มีการผสมแบคทีเรียโพรไบโอติกวันละ 3 ครั้ง ปริมาณที่ให้ต่อวันประมาณ 5% ของน้ำหนักตัว พร้อมกับค่อยๆปรับความเค็มขึ้นจนได้ความเค็มประมาณ 20 ส่วนในพันส่วน แล้วจึงสุ่มคัดกุ้งลงในบ่อทดลอง การทดลองแบ่งเป็น 3 กลุ่มคือ

1. กลุ่มควบคุมเลี้ยงกุ้งขาวโดยให้อาหารปกติที่ไม่มีการผสมแบคทีเรียโพรไบโอติก

2. กลุ่มทดลองที่ 1 เลี้ยงกุ้งขาวโดยให้อาหารที่ผสม *Bacillus* S11

3. กลุ่มทดลองที่ 2 เลี้ยงกุ้งขาวโดยให้อาหารที่ผสม *Bacillus* S11 ร่วมกับ *Bacillus* P11

ปล่อยกุ้ง 70 ตัวต่อบ่อ เลี้ยงกุ้งเป็นเวลา 90 วัน แต่ละกลุ่มมี 3 ซ้ำ ระบบเลี้ยงกุ้งเป็นระบบที่ประกอบด้วยระบบกรองชีวภาพอยู่ในบ่อเลี้ยง

การเพาะเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 จะทำการศึกษาเหมือนกันทุก 30 วันดังนี้

1. การรอดชีวิต (%)

2. น้ำหนักตัวกุ้ง (กรัม)

3. ปริมาณแบคทีเรียในน้ำเลี้ยงกุ้งได้แก่ แบคทีเรียทั้งหมด *Bacillus* S11 และ *Bacillus* P11 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทริปติกซอย และ *Vibrio* spp. ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งไทโอซัลเฟตซิเตรทบายซอลท์ซูโครส โดยวิธี Total plate counts

4. ตรวจสอบคุณภาพน้ำบางประการในระหว่างเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม

- แอมโมเนียม (NH_4^+) โดยใช้ ชุดทดสอบแอมโมเนีย
- ไนไตรท์ (NO_2) โดยใช้ ชุดทดสอบไนไตรท์
- อัลคาลินิตี (Alkalinity) โดยใช้ ชุดทดสอบความเป็นดาง
- อุณหภูมิ โดยใช้ thermometer
- ค่าออกซิเจนละลายน้ำ (DO) โดยใช้ DO meter
- พีเอช โดยใช้ pH meter
- ความเค็ม โดยใช้ Refractometer

เมื่อทำการเลี้ยงกุ้งในครั้งที่ 1 เป็นเวลา 60 วัน และครั้งที่ 2 เป็นเวลา 90 วันแล้วจะทำการศึกษา

1. ปริมาณแบคทีเรียในลำไส้กุ้งได้แก่ แบคทีเรียทั้งหมด *Bacillus* S11 และ *Bacillus* P11 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทริปติกซอย และ *Vibrio* spp. ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งไทโอซัลเฟตซิเตรทบายซอลท์ซูโครส โดยวิธี Total plate counts

2. ภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยสารน้ำได้แก่ เม็ดเลือดรวม เม็ดเลือดกรานูลลาร์ และฟีนอลออกซิเดส

3.4.5 การศึกษาภูมิคุ้มกันที่ป้องการสิ่งแปลกปลอมโดยสารน้ำ

3.4.5.1 การนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดรวม และเม็ดเลือดกรานูลลาร์ ของกุ้ง (total hemocyte and granular hemocyte count)

เจาะเลือดกุ้งจาก ventral sinus ปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร ผสมกับสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร ในอัตราส่วน 1:1 (เลือดกุ้งต่อสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด) (Tharp และ Woodman, 2002) ผสมให้เข้ากันเบาๆ หยดเม็ดเลือดปริมาณ 20 ไมโครลิตรลงบนไสด์นับเม็ดเลือด (hemacytometer) นับจำนวนเม็ดเลือดทั้งหมด และเม็ดเลือดกรานูลลาร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า

3.4.5.2 การหาปริมาณฟีนอลออกซิเดส

1. การเตรียมส่วนน้ำใสเซลล์เม็ดเลือดแตก (hemocyte lysate supernatant; HLS)

เจาะเลือดกุ้งจาก ventral sinus ปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร ผสมกับสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร ในอัตราส่วน 1:1 (เลือดกุ้งต่อสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด) นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที ปิเปตส่วนน้ำใสออกให้เหลือเฉพาะตะกอนเซลล์เม็ดเลือด นำเซลล์เม็ดเลือดที่ได้ละลายในสารละลายคาโคดิเลทบัฟเฟอร์ (cacodylate buffer; CAC buffer) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ทำให้เซลล์เม็ดแตกด้วยเครื่องทำอนุภาคแตกโดยใช้คลื่นเสียง (Sonicator) เป็นเวลา 10 วินาที นำไปปันเหวี่ยงที่ 15,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที แยกส่วนน้ำใส HLS นำไปทดสอบฟีนอลออกซิเดสทันที (ดัดแปลงจาก Smith และ Soderhall, 1991)

2. การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Bradford

ปิเปต HLS 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมน้ำยาทดสอบโปรตีน 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร สำหรับ blank ใช้สารละลายบัฟเฟอร์ CAC แทน HLS (Bradford, 1976) คำนวนปริมาณโปรตีนเป็น มิลลิกรัมต่อมิลลิตร เปรียบเทียบกับเส้นกราฟโปรตีนมาตราฐาน

3. วิเคราะห์ฟีนอลออกซิเดส

ใช้ HLS ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายทริปซิน 0.1% (trypsin 0.1% ในสารละลายบัฟเฟอร์ CAC, เตรียมก่อนใช้ทุกครั้ง) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที หลังจากนั้นผสมสารละลายแอด-ไดไฮดรอกซีฟีนิลอะลานีน 0.3% (L-dihihydroxyphenylalanine หรือ L-DOPA 0.3% ในสารละลายบัฟเฟอร์ CAC, เตรียมก่อนใช้ทุกครั้ง) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ CAC 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร ทันทีหลังผสมให้เข้ากัน และวัดอีกครั้งที่ 1 นาที นำค่าที่ได้มาคำนวนค่ากดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงไปต่อนาทีต่อมิลลิกรัมของโปรตีน (Smith และ Soderhall, 1991)

หนึ่งหน่วยของเอนไซม์ = ค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้น 0.001/ 1 นาที/ มิลลิกรัมโปรตีน

3.4.6 การทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค (challenge test)

เพาะเลี้ยง *V. harveyi* สายพันธุ์ 639 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปติกซอยที่เติมโซเดิมคลอไรด์ 2% (น้ำหนักต่อปริมาตร) บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเซลล์ด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที นำมาละลายด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 2% นำไปปรับความเข้มข้นในบ่อพลาสติกความจุประมาณ 40 ลิตรให้ได้ความเข้มข้นประมาณ 10^7 CFU/ml ใช้กุ้งในแต่ละบ่อการทดลองหลังการเพาะเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 1 และครั้งที่สองเป็นเวลา 60 วันและ 90 วัน ตามลำดับ กลุ่มละ 10 ตัวต่อบ่อ โดยติดตามผลดังนี้

1. อัตราการตายสะสม (cumulative mortality)

2. ปริมาณแบคทีเรีย *V. harveyi* ในน้ำด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งไทโอซัลเฟตซิเตรทบายซอลท์ซูโครส โดยวิธี Total plate counts

3. ปริมาณแบคทีเรียในลำไส้กุ้งได้แก่ แบคทีเรียทั้งหมด *Bacillus* S11 และ *Bacillus* P11 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทริปติกซอย และ *V. harveyi*. ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งไทโอซัลเฟตซิเตรทบายซอลท์ซูโครส โดยวิธี Total plate counts

3.4.7 วิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูลการทดลอง

โดยใช้ Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

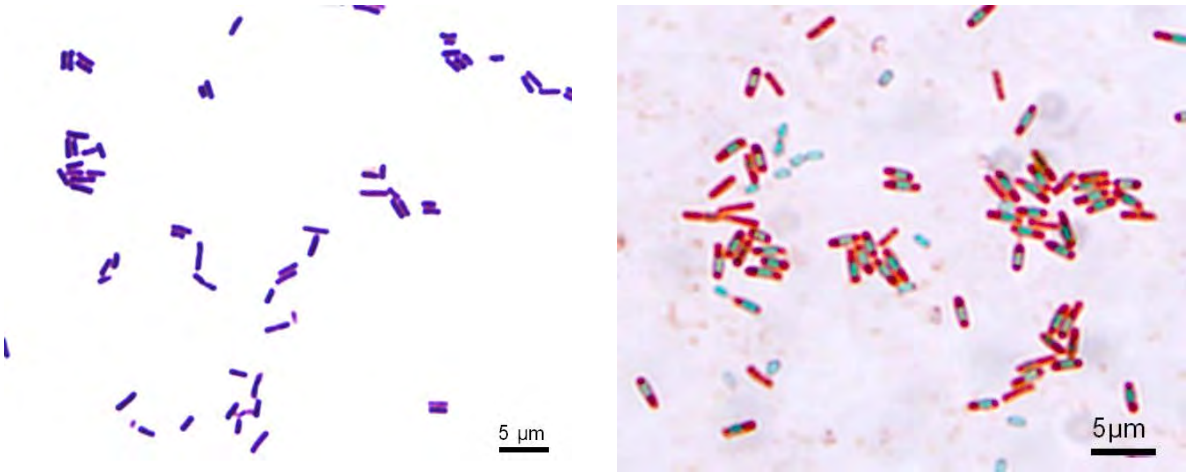
บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 รูปร่างของ *Bacillus* S11 และ *Bacillus* P11 และผลการจัดจำแนกสายพันธุ์โดยใช้ชุดทดสอบ API 50 CHB

4.1.1 รูปร่างของเชื้อ *Bacillus* S11 และผลการจัดจำแนกสายพันธุ์โดยใช้ชุดทดสอบ API 50 CHB

Bacillus S11 เมื่อนำมาตรวจลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็งทริปติกซอยพบว่าโคโลนีมีลักษณะไม่สม่ำเสมอ (irregular) แบนราบ (flat) ขอบหยัก (undulate) มีลักษณะสำคัญคือโคโลนีมีสีขาวอมชมพู เมื่อนำไปย้อมสีพบว่า ติดสีแกรมบวก เซลล์เป็นรูปท่อนตรงมีขนาดประมาณ 0.45-0.55 x 2.5-3.5 ไมโครเมตร เมื่อนำมาย้อมสีดูลักษณะสปอร์ พบสปอร์ติดสีเขียวดัง แสดงในรูปที่ 10 และนำมาจำแนกสายพันธุ์โดยใช้ชุดทดสอบ API 50 CHB พบว่าจัดจำแนกเป็น *Bacillus subtilis* โดยมีเปอร์เซ็นต์ความถูกต้อง (%ID) 99.9 เปอร์เซ็นต์ โดยแปรผลการทดลองด้วยโปรแกรม APILAB V.1.2.1 ดังแสดงในตารางที่ 6

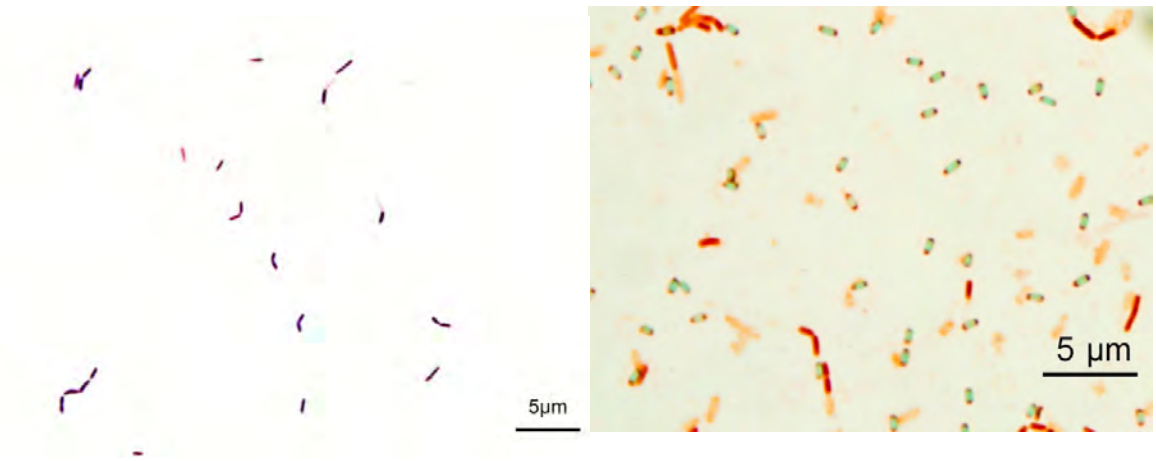


(ก) (ข)

รูปที่ 10 ลักษณะเซลล์ของ *Bacillus* S11 อายุ 24 ชม. (ก) และลักษณะของสปอร์ *Bacillus* S11 อายุ 48 ชม. (ข) ถ่ายจากกล้องโอลิมปัสรุ่น BX51 กำลังขยาย 1,000 เท่า

4.1.2 รูปร่างของเชื้อ *Bacillus* P11 และผลการจัดจำแนกสายพันธุ์โดยใช้ชุดทดสอบ API 50 CHB

Bacillus P11 เมื่อนำมาตรวจลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็งทริปติกซอยพบว่าโคโลนีมีลักษณะไม่สม่ำเสมอ (irregular) แบนราบ (flat) ขอบหยัก (undulate) มีลักษณะสำคัญที่แตกต่างจาก *Bacillus* S11 คือโคโลนีมีสีขาว เมื่อนำไปย้อมสีพบว่า ติดสีแกรมบวก เซลล์เป็นรูปท่อนตรงมีขนาดประมาณ 0.55-0.75 x 2.5-3.5 ไมโครเมตร เมื่อนำมาย้อมสีดูลักษณะสปอร์ พบสปอร์ติดสีเขียวดังแสดงในรูปที่ 11 และนำมาจำแนกสายพันธุ์โดยใช้ชุดทดสอบ API 50 CHB พบว่าจัดจำแนกเป็น *Bacillus subtilis* โดยมีเปอร์เซ็นต์ความถูกต้อง (%ID) 99.8 เปอร์เซ็นต์ โดยแปรผลการทดลองด้วยโปรแกรม APILAB V.1.2.1 ดังแสดงในตารางที่ 6



(ก) (ข)

รูปที่ 11 ลักษณะเซลล์ของ *Bacillus* P11 อายุ 24 ชม. (ก) และลักษณะของสปอร์ *Bacillus* P11 อายุ 48 ชม. (ข) ถ่ายจากกล้องโอลิมปัสรุ่น BX51 กำลังขยาย 1,000 เท่า

ตารางที่ 6 แสดงผลการจัดจำแนกสายพันธุ์โดยชุดทดสอบ API 50 CHB

Strip: API 50 CHB v.4.0

	Bacillus S11	*Bacillus* P11
Erythritol	+	+
D-Arabinose	-	-
L-Arabinose	-	-
Ribose	+	+
D- Xylose	+	+
L-Xylose	+	+
Adonitol	-	-
β -methyl-xyloside	-	-
Galactose	-	-
D-Glucose	-	-
D-Fructose	+	+
D-Manose	+	+
L-Sorbose	+	+
Rhamnose	-	-
Dulcitol	-	-
Inositol	-	-
Manitol	+	+
Sorbitol	+	+
α-methyl-D-Mannoside	+	+
α-methyl-D-Glucoside	-	-
NAcetyl glucosamine	+	+
Amygdaline	-	-
Arbutine	+	+
Esculine	+	+
Salicine	+	+
Cellubiose	+	+

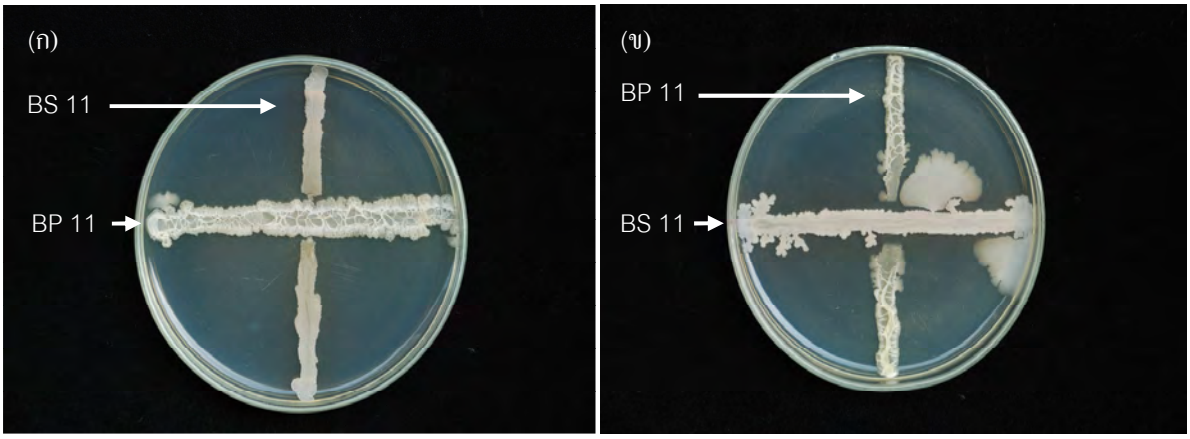
	Bacillus S11	*Bacillus* P11
Maltose	+	+
Lactose	+	+
Melibiose	-	+
Saccharose	+	-
Trehalose	+	+
Inuline	+	+
Melezitose	-	-
D-Raffinose	-	-
Amidon	+	+
Glycogene	-	+
Xylitol	-	+
β-Gentiobiose	-	-
DTuranose	-	-
D-Lyxose	+	-
D-Tagatose	-	-
D-Fucose	-	-
L-Fucose	-	-
D-arabitol	-	-
L-arabitol	-	-
Gluconate	-	-
2-ceto-gluconate	-	-
5-ceto-gluconate	-	-
Ortho-nitro-phenyl- β-D-gal-actopyranoside	+	-
Arginine	-	-
Lysine	-	-
Ornithine	-	-
Sodium citrate	+	+
Sodium thiosulfate	-	-
Urea	-	-

	Bacillus S11	*Bacillus* P11
Trytophane	-	-
Tryptopphane	-	-
Creatine sodium pyruvate	+	+
Kohn's gelatin	+	+
Glucose (fermentation/oxidation)	-	-
Potassium nitrate	+	-

4.2 ผลการทดลองปฏิสัมพันธ์ของ *Bacillus* S11 และ *Bacillus* P11 ในการเลี้ยงแบบ mixed culture ในระดับหลอดทดลอง

4.2.1 การยับยั้งการเจริญซึ่งกันและกันโดยวิธีการขีดไขว้ (Cross Streak)

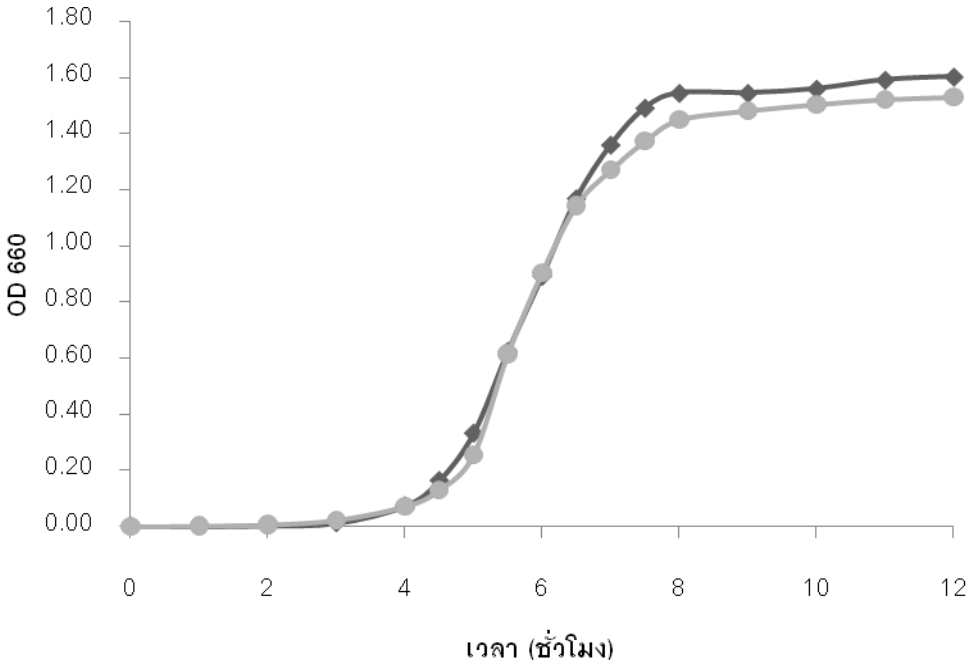
เมื่อนำ *Bacillus* S11 มาขีดเป็นเส้นตรงนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นขีด *Bacillus* P11 ไขว้กันในแนวตั้งฉากนำไปบ่ม ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเกิด clear zone ในขณะที่การทดสอบการยับยั้งการเจริญของ *Bacillus* S11 โดย *Bacillus* P11 พบว่าไม่มี clear zone เกิดขึ้น สามารถสรุปได้ว่า *Bacillus* S11 สามารถยับยั้งการเจริญของ *Bacillus* P11 ได้ดังแสดงในรูปที่ 12



รูปที่ 12 การยับยั้งการเจริญของ *Bacillus* S11 โดย *Bacillus* P11 (ก) และการยับยั้งการเจริญของ *Bacillus* P11 โดย *Bacillus* S11 (ข)

4.2.2 การยับยั้งการเจริญของ *Bacillus* S11 โดยส่วนน้ำใสของ *Bacillus* P11

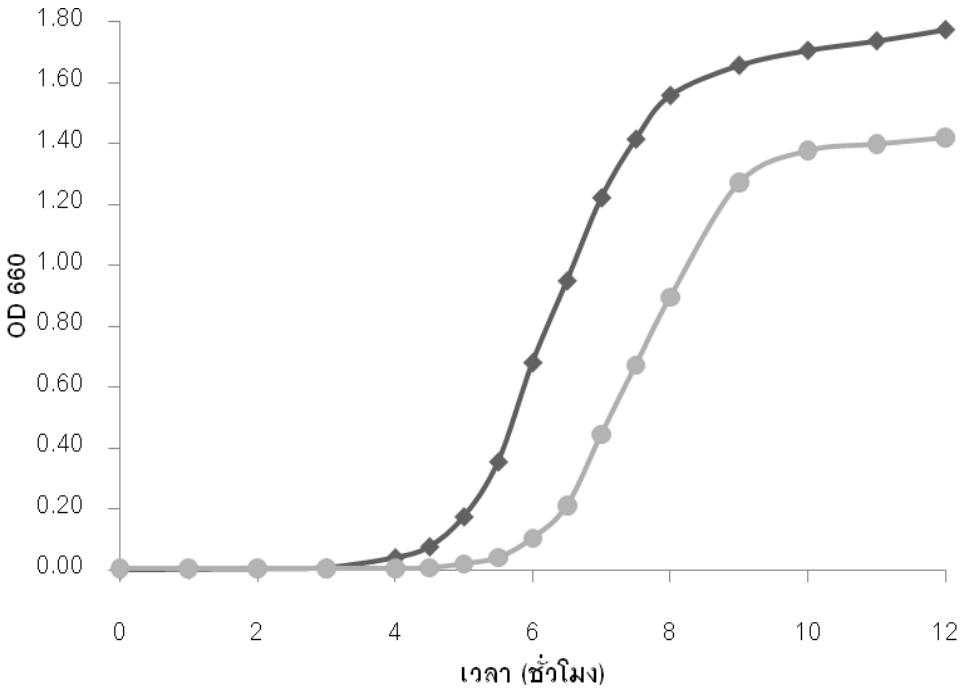
นำ *Bacillus* S11ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปติกซอย นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 200 รอบ มาตรวจวัดการเจริญโดยศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD660 กับเวลาดังแสดงในรูปที่ 13 พบว่า *Bacillus* S11 มีค่า specific growth rate (μ) เท่ากับ 0.905 hr^{-1} และที่เวลา 12 ชั่วโมงมีค่า OD 660 เท่ากับ 1.619 (ภาคผนวจ ฉ)ในขณะที่การเจริญของ *Bacillus* S11 ที่เติมด้วยส่วนน้ำใสของ *Bacillus* P11 มีค่า specific growth rate (μ) เท่ากับ 0.749 hr^{-1} และที่เวลา 12 ชั่วโมงมีค่า OD 660 เท่ากับ 1.531 (ภาคผนวจ ฉ) จึงสรุปได้ว่าส่วนน้ำใสของ *Bacillus* P11 มีผลต่ออัตราการเจริญของ *Bacillus* S11 และทำให้การเจริญที่ 12 ชั่วโมงมีค่าลดลง โดยมีค่า OD 660 ต่างจากกลุ่มควบคุมเท่ากับ 0.088



รูปที่ 13 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD660 กับเวลา ของ *Bacillus* S11 (—◆—) และ *Bacillus* S11 ที่เติมด้วยส่วนน้ำใสของ *Bacillus* P11 (—●—)

4.2.3 การยับยั้งการเจริญของ *Bacillus* P11 โดยส่วนน้ำใสของ *Bacillus* S11

นำ *Bacillus* P11ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปติกซอย นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 200 รอบ มาตรวจวัดการเจริญโดยศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD660 กับเวลาดังแสดงในรูปที่ 14 พบว่า *Bacillus* P11 มีค่า specific growth rate (μ) เท่ากับ 0.825 hr^{-1} และที่เวลา 12 ชั่วโมงมีค่า OD 660 เท่ากับ 1.776 (ภาคผนวจ ฉ) ในขณะที่การเจริญของ *Bacillus* P11 ที่เติมด้วยส่วนน้ำใสของ *Bacillus* S11 มีค่า specific growth rate (μ) เท่ากับ 0.718 hr^{-1} และที่เวลา 12 ชั่วโมงมีค่า OD 660 เท่ากับ 1.422 (ภาคผนวจ ฉ) จึงสรุปได้ว่าส่วนน้ำใสของ *Bacillus* S11 มีผลต่ออัตราการเจริญของ *Bacillus* P11 และทำให้การเจริญที่ 12 ชั่วโมงมีค่าลดลงโดยมีค่า OD 660 ต่างจากกลุ่มควบคุมเท่ากับ 0.354



รูปที่ 14 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD660 กับเวลา ของ *Bacillus* P11 (—◆—) และ *Bacillus* P11 ที่เติมด้วยส่วนน้ำใสของ *Bacillus* S11 (—●—)

4.3 ผลการทดลองการผสมแบคทีเรีย *Bacillus* S11 และ *Bacillus* P11 ที่ผสมในอาหารกุ้งขาวแวนนาไมในอัตราส่วนต่าง ๆ

เมื่อนำเซลล์สด *Bacillus* S11 ผสมกับอาหารกุ้งขาวแวนนาไมในอัตราส่วน 1:3 น้ำหนักต่อน้ำหนัก โดยใช้เซลล์สด 1 ส่วน อาหารกุ้ง 3 ส่วน และเซลล์สด *Bacillus* P11 ในอัตราส่วน 1:4 น้ำหนักต่อน้ำหนัก โดยใช้เซลล์สด 1 ส่วน อาหารกุ้ง 4 ส่วน หลังจากนั้นนำอาหารผสม *Bacillus* S11 และ อาหารผสม *Bacillus* P11 นำมาผสมให้เข้ากันในอัตราส่วนต่างๆ จากนั้นตรวจหา *Bacillus* S11 และ *Bacillus* P11 ต่อกรัมอาหารกุ้ง แสดงดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ปริมาณ *Bacillus* S11 และ *Bacillus* P11 ต่อกรัมในอาหารกุ้งขาวแวนนาไม

อัตราส่วนอาหารกุ้งที่ผสม *Bacillus* S11 (กรัม) : อาหารกุ้งที่ผสม *Bacillus* P11 (กรัม)	ปริมาณแบคทีเรีย/กรัมอาหารกุ้ง (CFU/g)	
	Bacillus S11	*Bacillus* P11
1 : 1	15.1×10^9	8.67×10^9
1 : 2	7.87×10^9	1.84×10^{10}
1 : 3	7.43×10^9	2.16×10^{10}
2 : 1	2.34×10^{10}	8.77×10^9
3 : 1	2.75×10^{10}	3.30×10^9
2 : 3	1.23×10^{10}	1.70×10^{10}

4.4 การเลี้ยงกุ้งขาวครั้งที่ 1

4.4.1 เปรียบเทียบผลของการเสริม *Bacillus* S11 และ *Bacillus* P11 และ ในการเพาะเลี้ยงกุ้งขาว

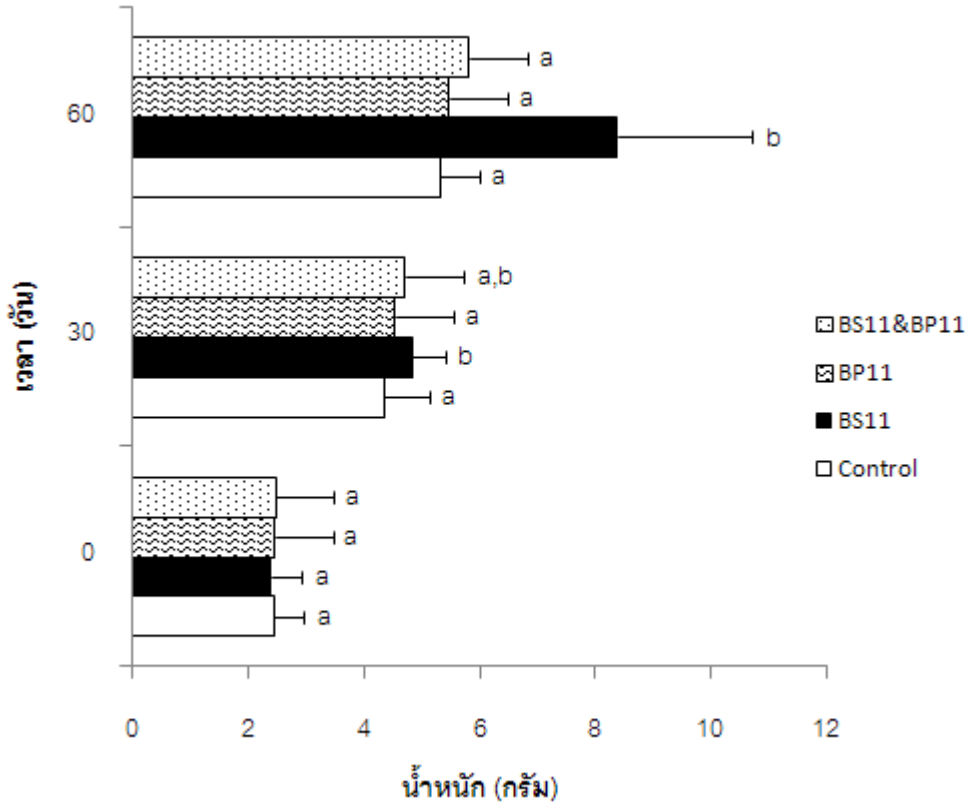
เลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมเป็นระยะเวลา 60 วัน แบ่งการทดลองออกเป็น 4 กลุ่ม (กลุ่มละ 2 บ่อ) ดังนี้

1. กลุ่มควบคุมเลี้ยงกุ้งขาวโดยให้อาหารปกติที่ไม่มีการผสมโพรไบโอติกแบคทีเรีย
2. กลุ่มทดลองที่ 1 เลี้ยงกุ้งขาวโดยให้อาหารที่ผสม *Bacillus* S11
3. กลุ่มทดลองที่ 2 เลี้ยงกุ้งขาวโดยให้อาหารที่ผสม *Bacillus* P11
4. กลุ่มทดลองที่ 3 เลี้ยงกุ้งขาวโดยให้อาหารที่ผสม *Bacillus* S11 ร่วมกับ *Bacillus* P11

เลี้ยงกุ้งขาวระยะวัยรุ่นที่มีน้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ยประมาณ 2.45 กรัม ในบ่อปูนซีเมนต์ บรรจุน้ำประมาณ 400 ลิตร จำนวน 50 ตัวต่อบ่อ ให้อากาศตลอดเวลา ติดตามผลการเจริญของกุ้งขาว พบว่าเมื่อทำการเลี้ยงกุ้งขาวเป็นเวลา 30 วัน กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* S11 มีน้ำหนักเฉลี่ยแตกต่างจากกลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) และกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* S11 ร่วมกับ *Bacillus* P11 มีน้ำหนักเฉลี่ยมากกว่ากลุ่มควบคุม และกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* P11 เมื่อทำการเลี้ยงกุ้งขาวเป็นเวลา 60 วัน กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* S11 มีน้ำหนักเฉลี่ยแตกต่างจากกลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 15 โดยที่คุณภาพน้ำระหว่างการเลี้ยงอยู่ในช่วงเกณฑ์ปกติที่ปลอดภัยสำหรับการเลี้ยงกุ้งขาวดังแสดงในตารางที่ 8

ผลการติดตามปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด และ *Vibrio* spp. ในน้ำระหว่างการเพาะเลี้ยงกุ้งขาว และลำไส้กุ้งขาวหลังทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน พบว่าในน้ำเลี้ยงกุ้งขาวจากทุกกลุ่มการทดลองตรวจพบแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง $2.40 \times 10^3 - 7.10 \times 10^4$ CFU/ml และ *Vibrio* spp อยู่ในช่วง $1.93 \times 10^2 - 2.37 \times 10^3$CFU/ml ดังแสดงในตารางที่ 9 ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในลำไส้กุ้งกลุ่มควบคุมหลังทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 60 วันเท่ากับ 6.6×10^6 CFU/g และปริมาณ *Vibrio* spp. เท่ากับ 3.2×10^4 CFU/g ลำไส้กุ้งกลุ่มที่เสริม *Bacillus* S11 ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดเท่ากับ 2.78×10^6 CFU/g ปริมาณ *Vibrio* spp. เท่ากับ 1.46×10^4 CFU/g และปริมาณ *Bacillus* S11 เท่ากับ 1.99×10^6 CFU/g ลำไส้กุ้งกลุ่มที่เสริม *Bacillus* P11 ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดเท่ากับ 2.08×10^6 CFU/g ปริมาณ *Vibrio* spp. เท่ากับ 7.93×10^4 CFU/g และปริมาณ *Bacillus* P11 เท่ากับ 1.12×10^6CFU/g สำหรับลำไส้กุ้งกลุ่มที่เสริม *Bacillus* S11 ร่วมกับ *Bacillus* P11 มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดเท่ากับ 1.12×10^6 CFU/g ปริมาณ *Vibrio* spp. เท่ากับ $.82 \times 10^6$ CFU/g ปริมาณ *Bacillus* S11 เท่ากับ 4.00×10^4 ตามลำดับ และมีปริมาณ *Bacillus* P11 ในลำไส้น้อยกว่า 10^4 CFU/g ดังแสดงในตารางที่ 10

หลังจากเลี้ยงกุ้งเป็นเวลา 60 วัน พบว่าการรอดชีวิตของกุ้งในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* S11 มีค่าเท่ากับ 82 % ซึ่งมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มทดลองอื่นๆ ตามด้วยกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* S11 ร่วมกับ *Bacillus* P11 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 77 % และกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* P11 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 66 และ 65 % ตามลำดับดังแสดงในรูปที่ 16



รูปที่ 15 น้ำหนักตัวเฉลี่ยของกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงอาหาร 4 ชนิด ในการทดลองครั้งที่ 1

หมายเหตุ ⊢ ค่าเบี่ยงเบนมาตราฐานของกลุ่มประชากร (SD)

$^{a, b}$ แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองที่ความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 8 คุณภาพน้ำระหว่างการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในการทดลองครั้งที่ 1

คุณภาพน้ำ	ช่วงคุณภาพน้ำ (ต่ำสุด-สูงสุด)			
	กลุ่มควบคุม	กลุ่มที่เสริม BS11	กลุ่มที่เสริม BP11	กลุ่มที่เสริม BS11&BP11
แอมโมเนีย (mg/l)	0.25 - 0.50	0 - 0.50	0 - 0.50	0 - 0.50
ไนไตรท์ (mg/l)	0.05 - 0.50	0 - 0.25	0 - 0.50	0 - 0.50
อัลคาไลน์นิตี้ (m/l)	110 - 130	110 - 120	110 - 120	110 - 120
อุณหภูมิ(°C)	29.0 - 29.7	28.9 - 29.5	28.8 - 29.6	29.0 - 29.8
พีเอช (pH)	7.89 - 8.31	8.03 - 8.22	7.96 - 8.32	8.02 - 8.40
ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ(mg/l)	6.11 - 6.82	6.32 - 6.71	6.20 - 6.60	6.15 - 6.45
ความเค็ม(ppt)	20	19 - 20	20	20

ตารางที่ 9 ปริมาณแบคทีเรียในน้ำระหว่างการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในการทดลองครั้งที่ 1

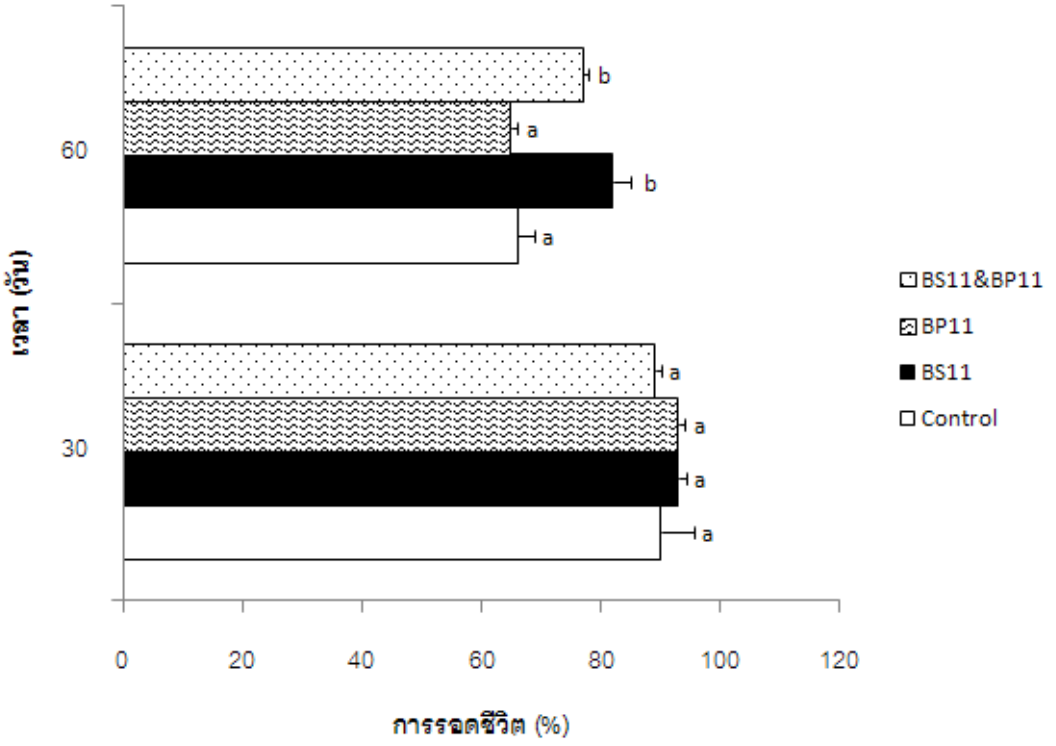
ชนิดแบคทีเรีย	กลุ่มทดลอง	ปริมาณแบคทีเรีย(CFU/ml)
แบคทีเรียทั้งหมด	กลุ่มควบคุม	$3.73 \times 10^3 – 6.70 \times 10^4$
	กลุ่มที่เสริม BS11	$2.40 \times 10^3 – 1.23 \times 10^4$
	กลุ่มที่เสริม BP11	$3.07 \times 10^3 – 7.10 \times 10^4$
	กลุ่มที่เสริม BS11&BP11	$2.93 \times 10^3 – 4.33 \times 10^4$
Bacillus S11	กลุ่มควบคุม	ND
	กลุ่มที่เสริม BS11	$5.90 \times 10^3 – 5.27 \times 10^3$
	กลุ่มที่เสริม BP11	ND
	กลุ่มที่เสริม BS11&BP11	$2.87 \times 10^3 – 1.57 \times 10^4$
Bacillus P11	กลุ่มควบคุม	ND
	กลุ่มที่เสริม BS11	ND
	กลุ่มที่เสริม BP11	$2.60 \times 10^3 – 5.93 \times 10^3$
	กลุ่มที่เสริม BS11&BP11	$5.30 \times 10^2 – 1.10 \times 10^3$
Vibrio spp.	กลุ่มควบคุม	$1.93 \times 10^2 – 2.37 \times 10^3$
	กลุ่มที่เสริม BS11	$2.07 \times 10^2 – 1.38 \times 10^3$
	กลุ่มที่เสริม BP11	$2.10 \times 10^2 – 2.25 \times 10^3$
	กลุ่มที่เสริม BS11&BP11	$2.57 \times 10^2 – 1.74 \times 10^3$

หมายเหตุ ND = not detected

ตารางที่ 10 ปริมาณแบคทีเรียในลำไส้กุ้งขาวแวนนาไมหลังทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 60 วันในการทดลองครั้งที่ 1 (แสดงผลค่าเฉลี่ย ± SD)

ชนิดแบคทีเรีย	กลุ่มทดลอง	ปริมาณแบคทีเรีย (CFU/g)
แบคทีเรียทั้งหมด	กลุ่มควบคุม	$6.60 \pm 1.08 \times 10^6$
	กลุ่มที่เสริม BS11	$2.78 \pm 0.11 \times 10^6$
	กลุ่มที่เสริม BP11	$2.08 \pm 0.34 \times 10^6$
	กลุ่มที่เสริม BS11&BP11	$1.82 \pm 0.17 \times 10^6$
Bacillus S11	กลุ่มควบคุม	ND
	กลุ่มที่เสริม BS11	$1.99 \pm 0.13 \times 10^6$
	กลุ่มที่เสริม BP11	ND
	กลุ่มที่เสริม BS11&BP11	$4.00 \pm 1.00 \times 10^4$
Bacillus P11	กลุ่มควบคุม	ND
	กลุ่มที่เสริม BS11	ND
	กลุ่มที่เสริม BP11	$1.12 \pm 0.13 \times 10^6$
	กลุ่มที่เสริม BS11&BP11	$< 10^4$
Vibrio spp.	กลุ่มควบคุม	$3.20 \pm 0.30 \times 10^4$
	กลุ่มที่เสริม BS11	$1.46 \pm 0.22 \times 10^4$
	กลุ่มที่เสริม BP11	$7.93 \pm 1.63 \times 10^4$
	กลุ่มที่เสริม BS11&BP11	$1.16 \pm 0.08 \times 10^4$

หมายเหตุ ND = not detected



รูปที่ 16 การรอดชีวิตเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วันและ 60 วันของกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงด้วยอาหาร 4 ชนิด ในการทดลองครั้งที่ 1

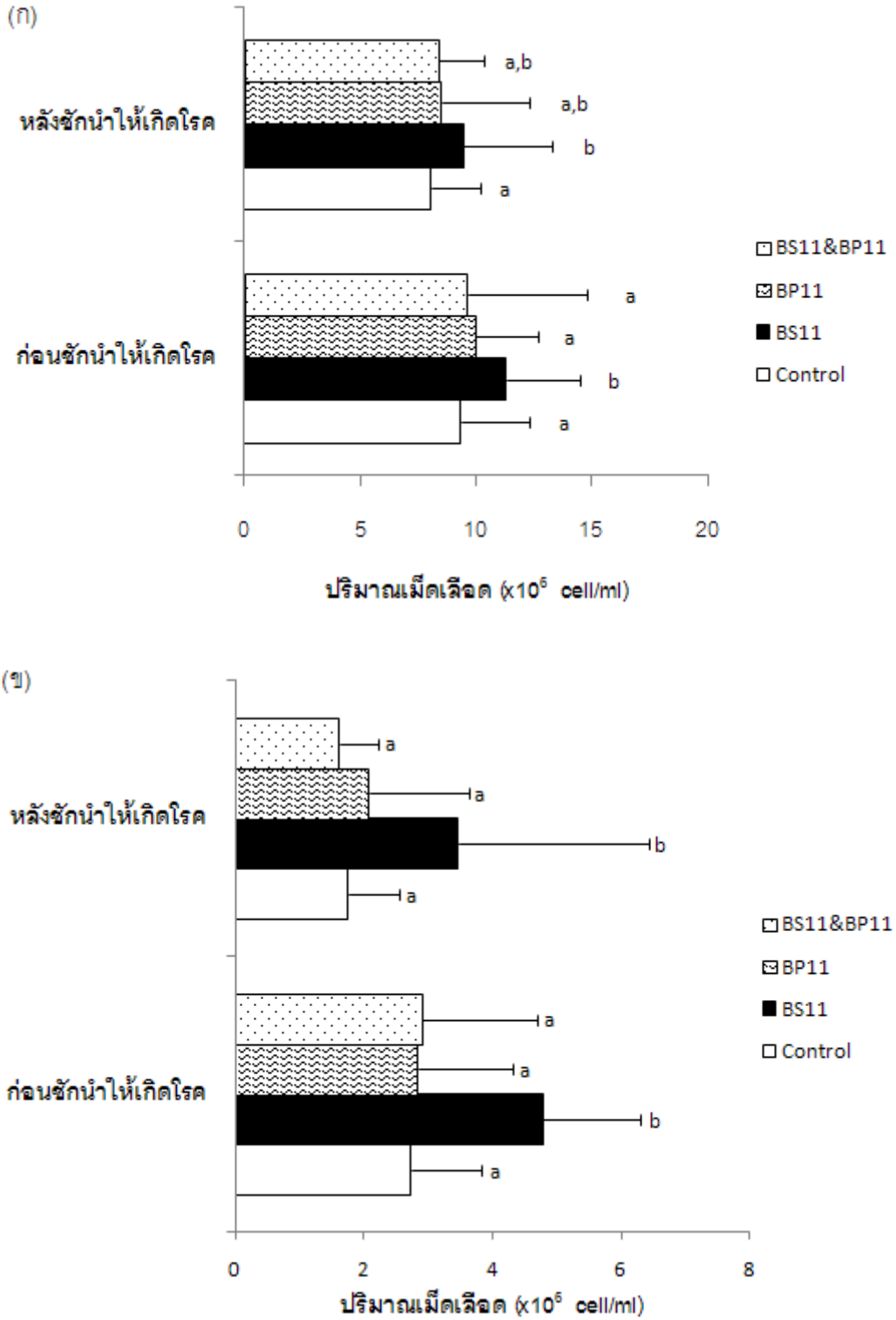
4.4.2 ผลการศึกษาภูมิคุ้มกันที่ป้องการสิ่งแปลกปลอมโดยสารน้ำและความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค

จากการทดลองเปรียบเทียบความสามารถในการสร้างภูมิคุ้มกันที่ป้องการสิ่งแปลกปลอมโดยสารน้ำโดยเปรียบเทียบจากปริมาณเม็ดเลือดรวม ปริมาณเม็ดเลือดกรานูลาร์ และปริมาณฟีนอลออกซิเดสพบว่า เมื่อหลังจากเลี้ยงกุ้งเป็นเวลา 60 วัน (ก่อนชักนำให้เกิดโรค) กุ้งกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* S11 มีปริมาณเม็ดเลือดรวม เม็ดเลือดกรานูลาร์ และปริมาณฟีนอลออกซิเดสแตกต่างจากกลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 17 และ รูปที่ 18

รวบรวมกุ้งในกลุ่มที่เหลือจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน ในแต่ละกลุ่มทดลองมาทดลองความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค ด้วย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 ปริมาณ 10^7 CFU/ml โดยแช่กุ้งในแต่ละกลุ่ม จำนวน 10 ตัวต่อบ่อ (กลุ่มละ 2 บ่อ) ในบ่อพลาสติกความจุ 40 ลิตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

พบว่าหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคเป็นเวลา 72 ชั่วโมง กลุ่มควบคุมมีการตายสะสม 55% ในขณะที่กุ้งกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* S11 มีการตายสะสมน้อยสุดเท่ากับ 20% กลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* S11 ร่วมกับ *Bacillus* P11 และกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* P11 มีการตายสะสมเท่ากับ 35 และ 42.5 % ตามลำดับดังแสดงในรูปที่ 19 เปรียบเทียบจากปริมาณเม็ดเลือดรวม ปริมาณเม็ดเลือดกรานูลาร์ และปริมาณฟีนอลออกซิเดสหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคเป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่ากุ้งกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* S11 มีปริมาณปริมาณเม็ดเลือดรวม เม็ดเลือดกรานูลาร์ และปริมาณฟีนอลออกซิเดสแตกต่างจากกลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) (รูปที่ 17 และรูปที่ 18) ในขณะที่กุ้งกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* S11 ร่วมกับ *Bacillus* P11 และกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* P11 มีปริมาณเม็ดเลือดรวมเดสแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) นอกจากนี้พบว่าเมื่อทำการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคเป็นเวลา 120 ชั่วโมง กลุ่มควบคุมมีการตายสะสม 100% ในขณะที่กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* S11 มีการตายสะสมน้อยสุดเท่ากับ 30%

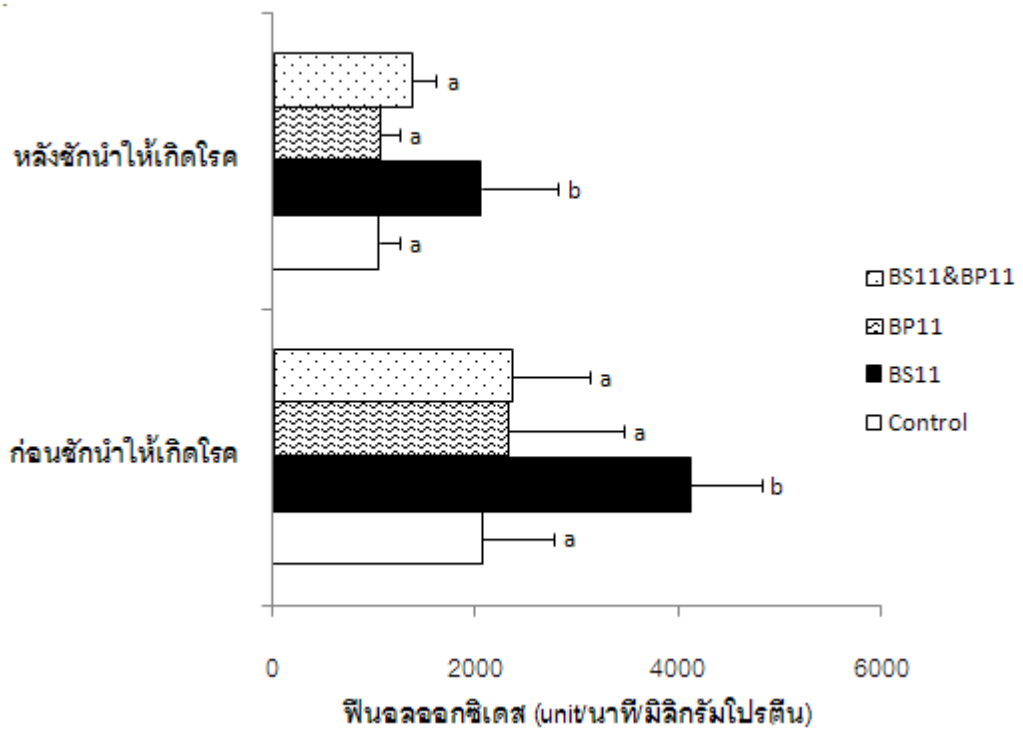
ผลการติดตามปริมาณ *Vibrio* spp. ในลำไส้กุ้งขาวหลังทำการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 เป็นเวลา 72 ชั่วโมงพบว่ามี *Vibrio* spp. อยู่ในช่วง 1.17×10^4 - 7.43×10^4 CFU/g ดังแสดงในตารางที่ 11



รูปที่ 17 ปริมาณเม็ดเลือดรวม (total hemocyte) (ก) และปริมาณเม็ดเลือดกรานูลาร์ (granular hemocyte) (ข) ของกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงด้วยอาหาร 4 ชนิด ก่อนและหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* 639 ในการทดลองครั้งที่ 1เมื่อกุ้งอายุ 60 วัน

หมายเหตุ ⊢ ค่าเบี่ยงเบนมาตราฐานของกลุ่มประชากร (SD)

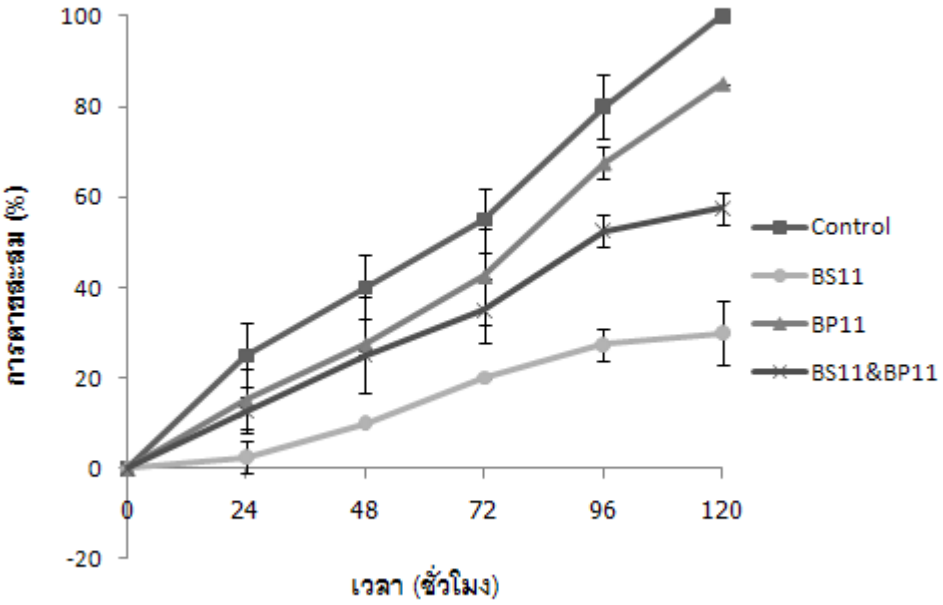
$^{a, b}$ แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองที่ความเชื่อมั่น 95%



รูปที่ 18 ปริมาณฟีนอลออกซิเดส (unit/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน) ของกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงด้วยอาหาร 4 ชนิด ก่อนและหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* 639 ในการทดลองครั้งที่ 1 เมื่อกุ้งอายุ 60 วัน

หมายเหตุ ⊢ ค่าเบี่ยงเบนมาตราฐานของกลุ่มประชากร (SD)

$^{a, b}$ แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองที่ความเชื่อมั่น 95%



รูปที่ 19 การตายสะสมของกุ้งขาวแวนนไม เมื่อชักนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* 639 จากการทดลองครั้งที่ 1

ตารางที่ 11 ปริมาณ *Vibrio* spp. ในลำไส้กุ้งขาวแวนนาไมหลังทำการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 639 เป็นเวลา 72 ชั่วโมงในการทดลองครั้งที่ 1 (แสดงผลค่าเฉลี่ย ± SD)

ชนิดแบคทีเรีย	กลุ่มทดลอง	ปริมาณแบคทีเรีย (CFU/g)
Vibrio spp.	กลุ่มควบคุม	$4.43 \pm 0.12 \times 10^4$
	กลุ่มที่เสริม BS11	$1.17 \pm 0.67 \times 10^4$
	กลุ่มที่เสริม BP11	$7.43 \pm 1.00 \times 10^4$
	กลุ่มที่เสริม BS11&BP11	$3.67 \pm 0.64 \times 10^4$

4.5 การเลี้ยงกุ้งขาวครั้งที่ 2

4.5.1 เปรียบเทียบผลของการเสริม *Bacillus* S11 และ *Bacillus* P11 และ ในการเพาะเลี้ยงกุ้งขาว

เลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมเป็นระยะเวลา 90 วัน แบ่งการทดลองออกเป็น 3 กลุ่ม (กลุ่มละ 3 บ่อ) ดังนี้

1. กลุ่มควบคุมเลี้ยงกุ้งขาวโดยให้อาหารปกติที่ไม่มีการผสมแบคทีเรียโพรไบโอติก
2. กลุ่มทดลองที่ 1 เลี้ยงกุ้งขาวโดยให้อาหารที่ผสม *Bacillus* S11
3. กลุ่มทดลองที่ 2 เลี้ยงกุ้งขาวโดยให้อาหารที่ผสม *Bacillus* S11 ร่วมกับ *Bacillus* P11

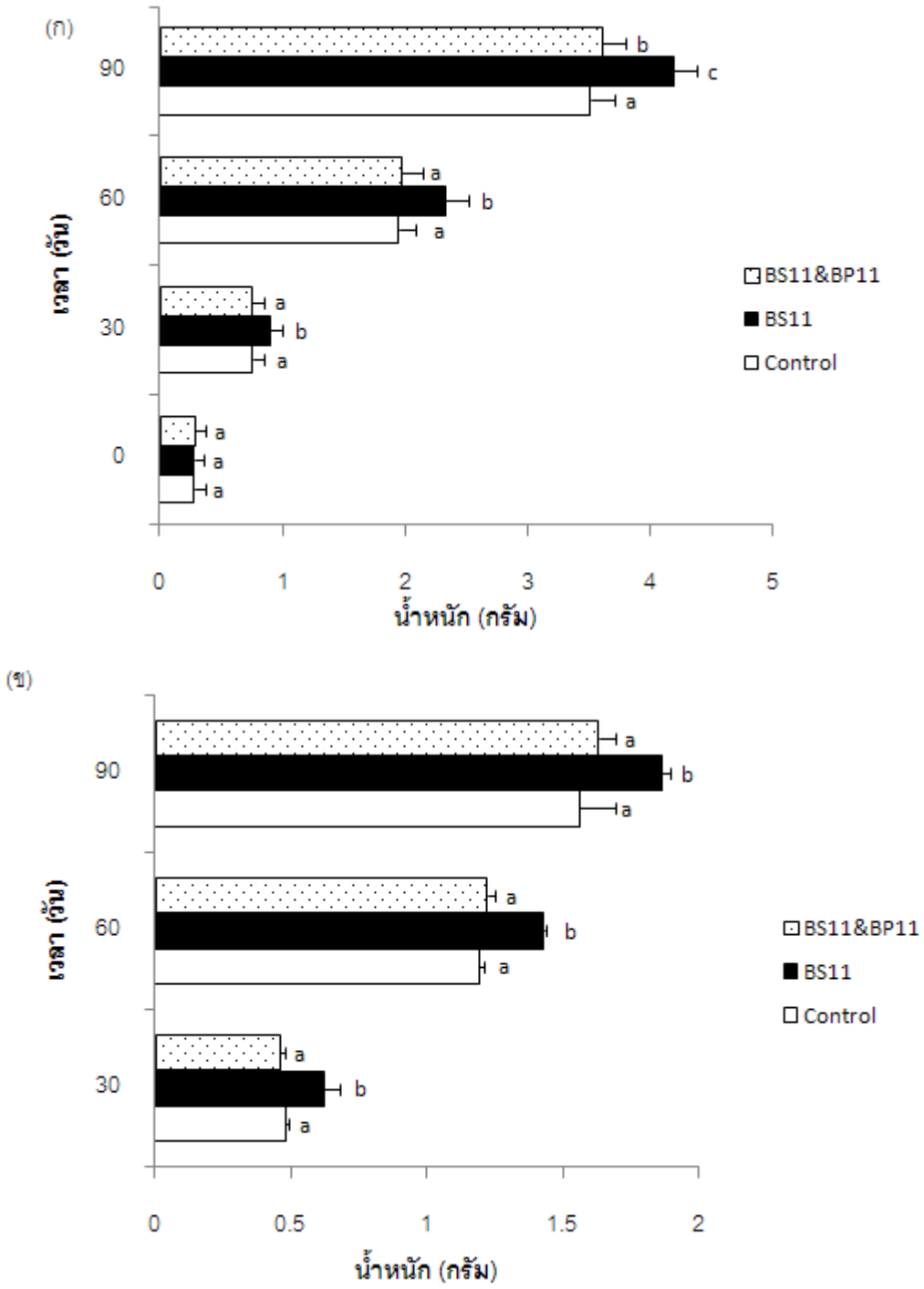
เลี้ยงกุ้งขาวระยะวัยรุ่นที่น้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ยประมาณ 0.28 กรัม ในบ่อปูนซีเมนต์ บรรจุน้ำประมาณ 400 ลิตร จำนวน 70 ตัวต่อบ่อ ให้อากาศตลอดเวลา ติดตามผลการเจริญของกุ้งขาว พบว่าเมื่อทำการเลี้ยงกุ้งขาวเป็นเวลา 30 และ 60 วัน กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* S11 มีน้ำหนักเฉลี่ยแตกต่างจากกลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยเมื่อครบ 90 วัน กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* S11 มีน้ำหนักเฉลียแตกต่างจากกลุ่มอื่นมากที่สุด และที่กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* S11 ร่วมกับ *Bacillus* P11 มีน้ำหนักเฉลี่ยมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) และน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* S11 ตลอดการทดลองมีค่ามากกว่ากลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 20 โดยที่คุณภาพน้ำระหว่างการเลี้ยงอยู่ในช่วงเกณฑ์ปกติที่ปลอดภัยสำหรับการเลี้ยงกุ้งขาวดังแสดงในตารางที่ 12

ผลการติดตามปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด และ *Vibrio* spp. ในน้ำระหว่างการเพาะเลี้ยงกุ้งขาว และลำไส้กุ้งขาวหลังทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 90 วัน พบว่าในน้ำเลี้ยงกุ้งขาวจากทุกกลุ่มการทดลองตรวจพบแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง $1.32 \times 10^4 - 8.80 \times 10^4$ CFU/ml และ *Vibrio* spp อยู่ในช่วง $1.36 \times 10^3 - 2.70 \times 10^4$ CFU/ml ดังแสดงในตารางที่ 13

ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในลำไส้กุ้งกลุ่มควบคุมหลังทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 90 วัน เท่ากับ 1.51×10^6 CFU/g และปริมาณ *Vibrio* spp. เท่ากับ 8.57×10^4 CFU/g ลำไส้กุ้งกลุ่มที่เสริม *Bacillus* S11 ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดเท่ากับ 1.30×10^6 CFU/g ปริมาณ *Vibrio* spp. เท่ากับ 7.77×10^4 CFU/g และปริมาณ *Bacillus* S11 เท่ากับ 4.70×10^6 CFU/g และกลุ่มที่เสริม *Bacillus* S11 ร่วมกับ *Bacillus* P11 มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดเท่ากับ 5.33×10^6 CFU/g ปริมาณ *Vibrio* spp. เท่ากับ 1.19×10^5 CFU/g ปริมาณ *Bacillus* S11 เท่ากับ 1.40×10^5 ตามลำดับ และมีปริมาณ *Bacillus* P11 ในลำไส้น้อยกว่า 10^4 CFU/g ดังแสดงในตารางที่ 14

เมื่อเลี้ยงกุ้งเป็นเวลา 60 วัน พบว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* S11 มีการรอดชีวิตแตกต่างกับกลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) และเมื่อเลี้ยงกุ้งเป็นเวลา 90 วันพบว่ากุ้งที่เลี้ยง

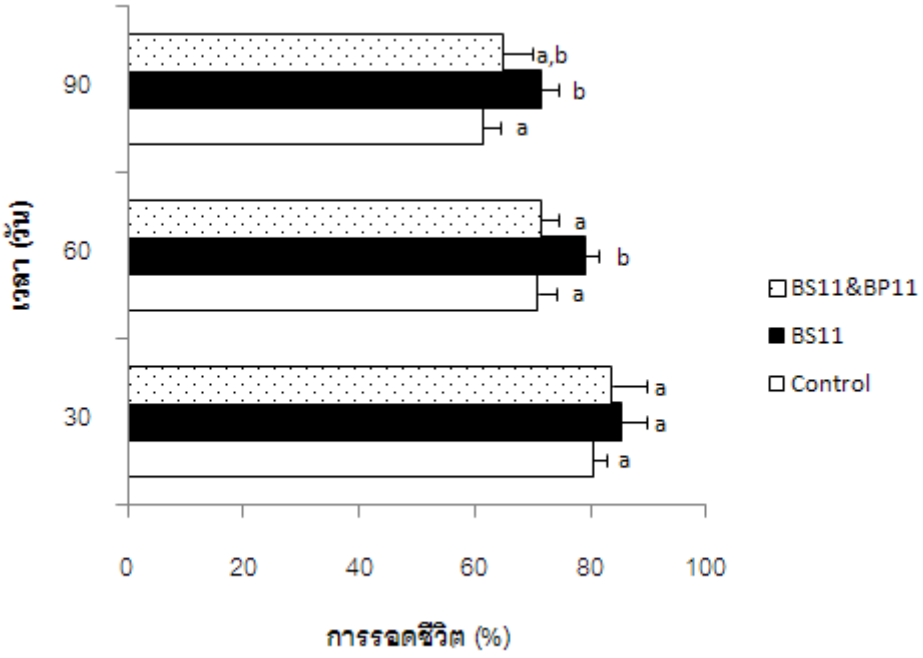
ด้วยอาหารผสม *Bacillus* มีการรอดชีวิตมากที่สุด และที่กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* S11 ร่วมกับ *Bacillus* P11 มีการรอดชีวิตมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 21



รูปที่ 20 น้ำหนักตัวเฉลี่ย (ก) และน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (ข) ของกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงด้วยอาหาร 3 ชนิด ในการทดลองครั้งที่ 2

หมายเหตุ ⊢ ค่าเบี่ยงเบนมาตราฐานของกลุ่มประชากร (SD)

$^{a, b}$ แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองที่ความเชื่อมั่น 95%



รูปที่ 21 การรอดชีวิตเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30, 60 และ 90 วันของกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงด้วย 4 ชนิด ในการทดลองครั้งที่ 2

หมายเหตุ ⊢ ค่าเบี่ยงเบนมาตราฐานของกลุ่มประชากร (SD)

$^{a, b}$ แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองที่ความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 12 คุณภาพน้ำระหว่างการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในการทดลองครั้งที่ 2

คุณภาพน้ำ	ช่วงคุณภาพน้ำ (ต่ำสุด-สูงสุด)		
	กลุ่มควบคุม	กลุ่มที่เสริม BS11	กลุ่มที่เสริม BS11&BP11
แอมโมเนีย (mg/l)	0 - 0.50	0 - 0.50	0 - 0.50
ไนไตรท์ (mg/l)	0- 0.50	0 - 0.50	0 - 0.50
อัลคาไลน์นิตี้ (m/l)	110 - 130	110 - 130	110 - 130
อุณหภูมิ(°C)	25.1 - 29.8	25.3 - 29.9	25.3 - 29.7
พีเอช (pH)	7.89 - 8.31	8.03 - 8.22	8.02 - 8.40
ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ(mg/l)	6.02 - 6.97	6.08 - 6.67	6.10 - 6.47
ความเค็ม(ppt)	20	18 - 20	20

ตารางที่ 13 ปริมาณแบคทีเรียในน้ำระหว่างการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในการทดลองครั้งที่ 2

ชนิดแบคทีเรีย	กลุ่มทดลอง	ปริมาณแบคทีเรีย(CFU/ml)
แบคทีเรียทั้งหมด	กลุ่มควบคุม	$1.32 \times 10^4 – 4.50 \times 10^4$
	กลุ่มที่เสริม BS11	$1.56 \times 10^4 – 8.63 \times 10^4$
	กลุ่มที่เสริม BS11&BP11	$1.30 \times 10^4 – 8.80 \times 10^4$
Bacillus S11	กลุ่มควบคุม	ND
	กลุ่มที่เสริม BS11	$3.60 \times 10^3 – 7.20 \times 10^4$
	กลุ่มที่เสริม BS11&BP11	$6.00 \times 10^2 – 1.27 \times 10^4$
Bacillus P11	กลุ่มควบคุม	ND
	กลุ่มที่เสริม BS11	ND
	กลุ่มที่เสริม BS11&BP11	$< 10^2 – 3.00 \times 10^3$
Vibrio spp.	กลุ่มควบคุม	$1.60 \times 10^3 – 2.70 \times 10^4$
	กลุ่มที่เสริม BS11	$1.36 \times 10^3 – 7.30 \times 10^3$
	กลุ่มที่เสริม BS11&BP11	$1.65 \times 10^3 – 9.80 \times 10^3$

หมายเหตุ ND = not detected

ตารางที่ 14 ปริมาณแบคทีเรียในลำไส้กุ้งขาวแวนนาไมหลังทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 90 วันในการทดลองครั้งที่ 2 (แสดงผลค่าเฉลี่ย ± SD)

ชนิดแบคทีเรีย	กลุ่มทดลอง	ปริมาณแบคทีเรีย (CFU/g)
แบคทีเรียทั้งหมด	กลุ่มควบคุม	$1.51 \pm 0.13 \times 10^{6}$
	กลุ่มที่เสริม BS11	$1.30 \pm 0.16 \times 10^{7}$
	กลุ่มที่เสริม BS11&BP11	$5.33 \pm 0.12 \times 10^{6}$
Bacillus S11	กลุ่มควบคุม	ND
	กลุ่มที่เสริม BS11	$4.70 \pm 0.56 \times 10^{6}$
	กลุ่มที่เสริม BS11&BP11	$1.40 \pm 0.26 \times 10^{5}$
Bacillus P11	กลุ่มควบคุม	ND
	กลุ่มที่เสริม BS11	ND
	กลุ่มที่เสริม BS11&BP11	$< 10^{4}$
Vibrio spp.	กลุ่มควบคุม	$8.57 \pm 0.71 \times 10^{4}$
	กลุ่มที่เสริม BS11	$7.77 \pm 0.81 \times 10^{5}$
	กลุ่มที่เสริม BS11&BP11	$1.19 \pm 0.16 \times 10^{5}$

หมายเหตุ ND = not detected

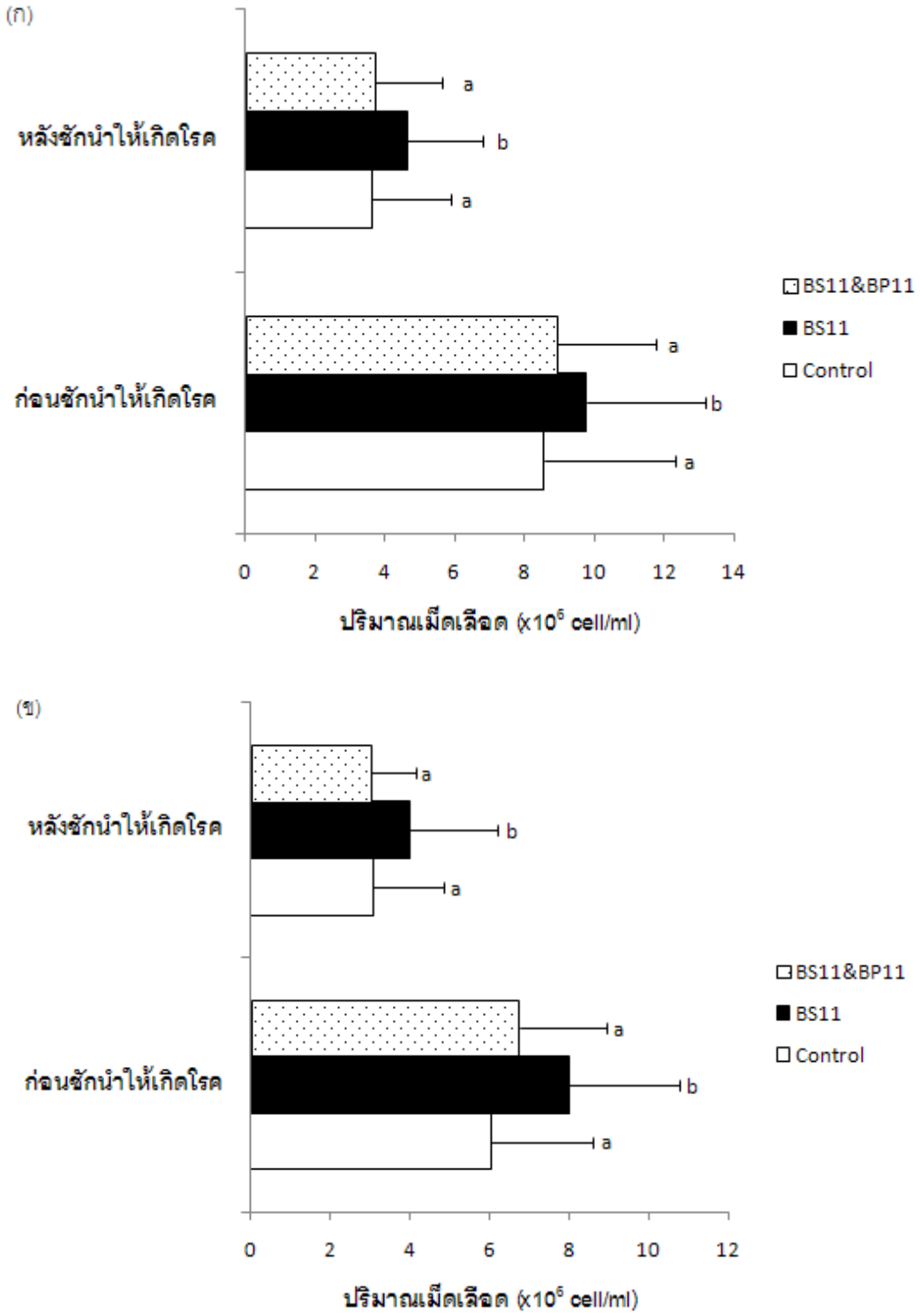
4.5.2 ผลการศึกษาภูมิคุ้มกันที่ป้องการสิ่งแปลกปลอมโดยสารน้ำและความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค

จากการทดลองเปรียบเทียบความสามารถในการสร้างภูมิคุ้มกันที่ป้องการสิ่งแปลกปลอมโดยสารน้ำโดยเปรียบเทียบจากปริมาณเม็ดเลือดรวม ปริมาณเม็ดเลือดกรานูลาร์ และปริมาณฟีนอลออกซิเดสพบว่า เมื่อหลังจากเลี้ยงกุ้งเป็นเวลา 90 วัน (ก่อนชักนำให้เกิดโรค) กุ้งกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* S11 มีปริมาณเม็ดเลือดรวม เม็ดเลือดกรานูลาร์ และปริมาณฟีนอลออกซิเดสแตกต่างจากกลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 22 และ รูปที่ 23

รวบรวมกุ้งในกลุ่มที่เหลือจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 90 วัน ในแต่ละกลุ่มทดลองมาทดลองความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค ด้วย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 ปริมาณ 10^6 CFU/ml โดยแช่กุ่งในแต่ละกลุ่ม จำนวน 10 ตัวต่อบ่อ (กลุ่มละ 3 บ่อ) ในบ่อพลาสติกความจุ 40 ลิตรที่มี ในลำไส้กุ้งขาวแวนนาไมหลังทำการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 639 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

พบว่าหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคเป็นเวลา 72 ชั่วโมงพบว่า กุ้งกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* S11 มีการตายสะสมแตกต่างจากกลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยมีค่าเท่ากับ 23.33 % ในขณะที่กลุ่มควบคุม และกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* S11 ร่วมกับ *Bacillus* P11 มีการตายสะสมเท่ากับ 53.33 และ 40 % ตามลำดับดังแสดงในตารางที่ 15 และรูปที่ 24 เปรียบเทียบจากปริมาณเม็ดเลือดรวม ปริมาณเม็ดเลือดกรานูลาร์ และปริมาณฟีนอลออกซิเดสหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคเป็นเวลา 72 ชั่วโมงพบว่ากุ้งกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* S11 มีปริมาณปริมาณเม็ดเลือดรวม เม็ดเลือดกรานูลาร์ และปริมาณฟีนอลออกซิเดสแตกต่างจากกลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 22 และ รูปที่ 23

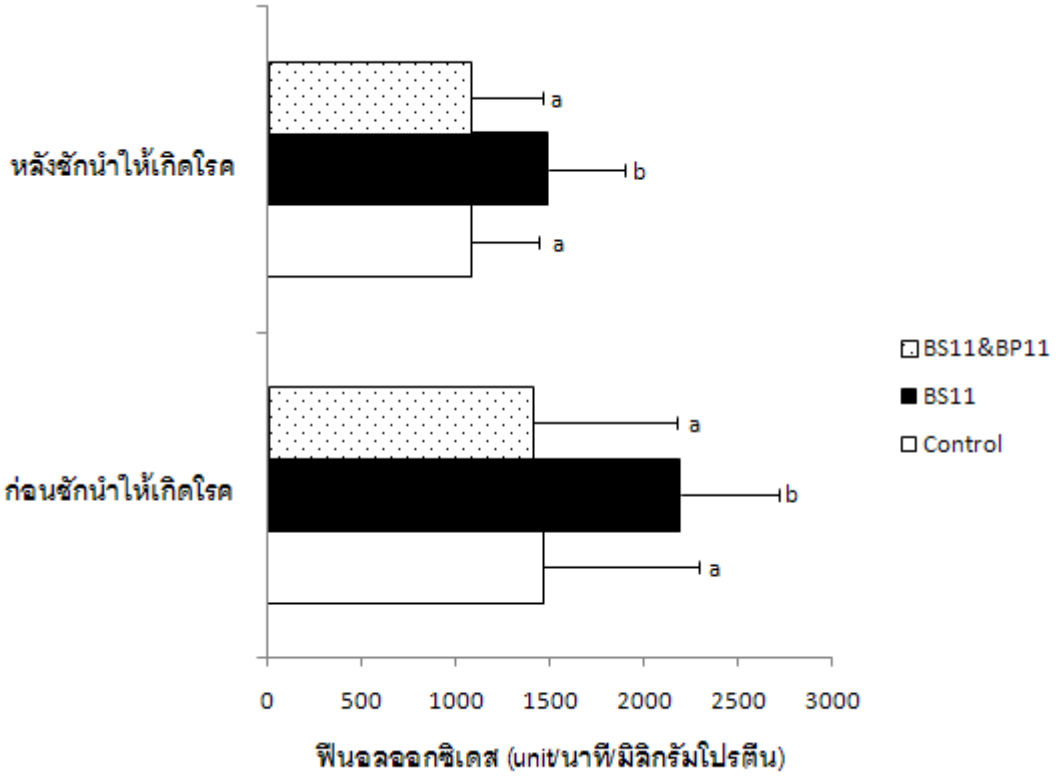
ผลการติดตามปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในลำไส้กุ้งกลุ่มควบคุมหลังทำการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 เป็นเวลา 72 ชั่วโมงพบว่า ลำไส้กุ้งกลุ่มควบคุมมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดเท่ากับ 5.57×10^6 CFU/g ปริมาณ *Vibrio* spp. เท่ากับ 3.73×10^6 CFU/g ลำไส้กุ้งกลุ่มที่เสริม *Bacillus* S11 ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดเท่ากับ 2.10×10^6 CFU/g ปริมาณ *Vibrio* spp. เท่ากับ 1.15×10^6 CFU/g และปริมาณ *Bacillus* S11 เท่ากับ 1.18×10^6 CFU/g และกลุ่มที่เสริม *Bacillus* S11 ร่วมกับ *Bacillus* P11 มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดเท่ากับ 3.23×10^6 CFU/g ปริมาณ *Vibrio* spp. เท่ากับ 2.22×10^6 CFU/g ปริมาณ *Bacillus* S11 เท่ากับ 1.30×10^5 ตามลำดับ และมีปริมาณ *Bacillus* P11 ในลำไส้น้อยกว่า 10^4 CFU/g ดังแสดงในตารางที่ 16



รูปที่ 22 ปริมาณเม็ดเลือดรวม (total hemocyte) (ก) และปริมาณเม็ดเลือดกรานูลาร์ (granular hemocyte) (ข) ของกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงด้วยอาหาร 3 ชนิด ก่อนและหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* 639 ในการทดลองครั้งที่ 2 เมื่อกุ้งอายุ 90 วัน

หมายเหตุ ⊢ ค่าเบี่ยงเบนมาตราฐานของกลุ่มประชากร (SD)

$^{a, b}$ แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองที่ความเชื่อมั่น 95%



รูปที่ 23 ปริมาณฟีนอลออกซิเดส (unit/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน) ของกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงด้วยอาหาร 3 ชนิด ก่อนและหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* 639 ในการทดลองครั้งที่ 2 เมื่อกุ้งอายุ 90 วัน

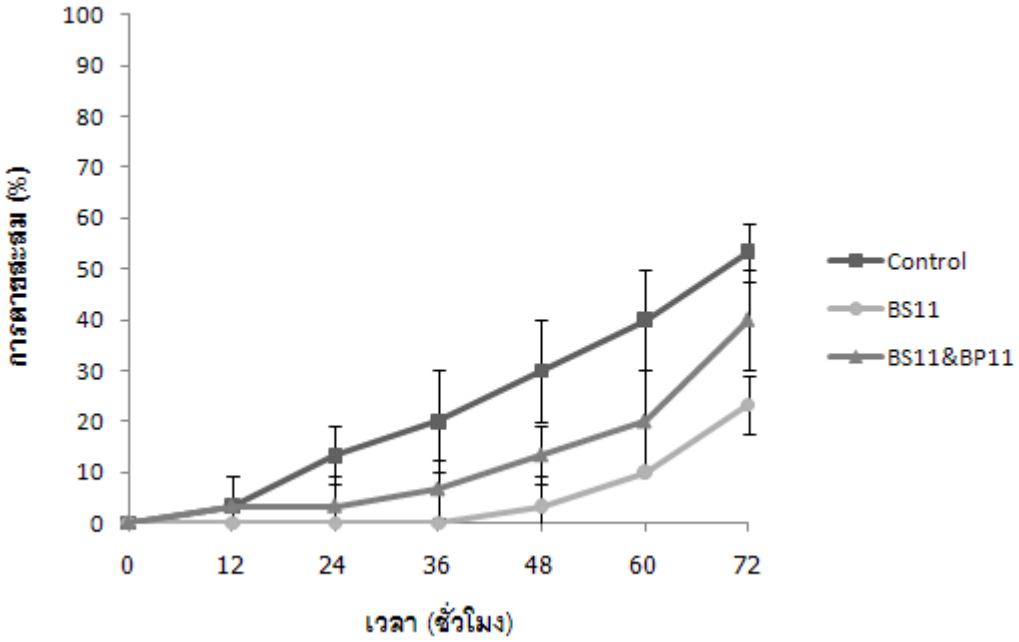
หมายเหตุ ⊢ ค่าเบี่ยงเบนมาตราฐานของกลุ่มประชากร (SD)

$^{a, b}$ แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองที่ความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 15 การตายสะสม (%) ของกุ้งขาวแวนนาไม เมื่อชักนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* 639 จากการทดลองครั้งที่ 2 เมื่อเวลา 72 ชั่วโมง (แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± SD)

กลุ่มทดลอง	การตายสะสม (%)
กลุ่มควบคุม	53.33 ± 5.77[a]
กลุ่มที่เสริม BS11	23.33 ± 5.77[b]
กลุ่มที่เสริม BS11&BP11	40.00 ± 10.00[a]

[a, b] แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองที่ความเชื่อมั่น 95%



รูปที่ 24 การตายสะสมของกุ้งขาวแวนนาไม เมื่อชักนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* 639 จากการทดลองครั้งที่ 2

ตารางที่ 16 ปริมาณแบคทีเรียในลำไส้กุ้งขาวแวนนาไมหลังทำการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 639 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในการทดลองครั้งที่ 2 (แสดงผลค่าเฉลี่ย ± SD)

ชนิดแบคทีเรีย	กลุ่มทดลอง	ปริมาณแบคทีเรีย (CFU/g)
แบคทีเรียทั้งหมด	กลุ่มควบคุม	$5.57 \pm 1.10 \times 10^6$
	กลุ่มที่เสริม BS11	$2.10 \pm 0.09 \times 10^6$
	กลุ่มที่เสริม BS11&BP11	$3.23 \pm 0.15 \times 10^6$
Bacillus S11	กลุ่มควบคุม	ND
	กลุ่มที่เสริม BS11	$1.18 \pm 0.03 \times 10^6$
	กลุ่มที่เสริม BS11&BP11	$1.30 \pm 0.10 \times 10^5$
Bacillus P11	กลุ่มควบคุม	ND
	กลุ่มที่เสริม BS11	ND
	กลุ่มที่เสริม BS11&BP11	$< 10^4$
Vibrio spp.	กลุ่มควบคุม	$3.73 \pm 0.60 \times 10^6$
	กลุ่มที่เสริม BS11	$1.15 \pm 0.06 \times 10^6$
	กลุ่มที่เสริม BS11&BP11	$2.22 \pm 0.02 \times 10^6$

หมายเหตุ ND = not detected

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

1. พิสูจน์เอกลักษณ์ของ *Bacillus* S11 และ *Bacillus* P11

ได้ยืนยันความถูกต้องของชนิดโพรไบโอติกแบคทีเรียโดยการตรวจลักษณะและสมบัติทางชีวเคมีของ *Bacillus* S11 และ *Bacillus* P11 โดยใช้ชุดทดสอบ API 50 CHB พบว่า *Bacillus* S11 ที่คัดแยกโดย Rengpipat และคณะ (1998a) และ *Bacillus* P11 ที่คัดแยกได้โดย ศิริเพ็ญ สังข์ชัย (2546) จัดเป็น *Bacillus subtilis* โดยมีเปอร์เซ็นต์ความถูกต้อง (%ID) 99.9 % และ 99.8 % ตามลำดับ

เนื่องจาก *Bacillus* S11 เป็นโพรไบโอติกที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นการเจริญเติบโต เสริมภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์และสารน้ำในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* (Rengpipat และคณะ, 2000) และ *Bacillus* P11 ได้รับการทดสอบว่าเป็นโพรไบโอติกที่มีคุณสมบัติเด่นในการกระตุ้นการเจริญเติบในกุ้งกุลาดำได้ดี (ศิริเพ็ญ, 2546; พลพิสิฐ, 2548) งานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายที่จะติดตามและประเมินผลการนำโพรไบโอติกแบคทีเรียทั้งสองชนิดมาเตรียมเป็นโพรไบโอติกผสมลงในอาหารกุ้งและนำมาเลี้ยงกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei*

2. ศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่าง *Bacillus* S11 และ *Bacillus* P11

จากเหตุผลที่จะนำโพรไบโอติกทั้งสองมาใช้ร่วมกันจึงได้มีการศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่าง *Bacillus* S11 และ *Bacillus* P11 ในการเลี้ยงแบบ mixed culture โดยทดสอบการยับยั้งการเจริญซึ่งกันและกันโดยวิธีการขีดไขว้ และความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบในอาหารเหลวโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร พบว่า *Bacillus* S11 สามารถยับยั้งการเจริญของ *Bacillus* P11 ได้ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Rengpipat และคณะ (1998a) ที่พบว่าส่วนน้ำใสของ *Bacillus* S11 สามารถยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* ได้ ในขณะที่เมื่อ *Bacillus* P11 ไม่ยับยั้งการเจริญ แต่มีผลต่ออัตราการเจริญของ *Bacillus* S11

3. อภิปรายผลการทดลอง

จากการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่าแบคทีเรีย *Bacillus* S11 มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกในการเสริมการเติบโต และการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ (Rengpipat และคณะ, 1998a; Rengpipat และคณะ, 1998b) แลต่อมาศิริเพ็ญ สังข์ชัย (2546) ได้รายงานถึงการใช้โพรไบโอติก *Bacillus* P11 ผสมในอาหารกุ้งในการเสริมการเติบโต และกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำเช่นเดียวกัน โดยโพรไบโอติกจะช่วยในการปรับปรุงสมดุลของจุลินทรีย์ ช่วยย่อยอาหาร ยึดเกาะในทางเดินอาหารกุ้ง ช่วยกระตุ้นกลไกของระบบภูมิต้านทาน และพัฒนาการตอบสนองต่อโรค (Reuter, 1997; Verchuere, 2000) *Bacillus* sp. เป็นแบคทีเรียอีกสายพันธุ์ที่นิยมใช้เป็นโพรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้ง ทั้งนี้เนื่องมาจาก *Bacillus* sp เป็นแบคทีเรียที่สามารถพบได้ทั่วไปในดิน ประกอบกับกุ้งเป็นสัตว์ที่หากินตามพื้นทะเลจึงมีโอกาสที่จะได้รับแบคทีเรียกลุ่มนี้เข้าไปในร่างกาย (ศิริเพ็ญ สังข์ชัย, 2546) อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานถึงการใช้โพรไบโอติกทั้งสองชนิดในการเสริมการเติบโต ในกุ้งขาวแวนนาไม นอกจากนี้การทดลองครั้งนี้ยังได้นำโพรไบโอติกทั้งสองมาใช้ร่วมกันในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนไมอีกด้วย

จากการทดลองเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 1 พบว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* S11 เป็นเวลา 30 และ 60 วันมีน้ำหนักเฉลี่ยแตกมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มทดลองอื่นๆ กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* P11 ร่วมกับ *Bacillus* S11 เป็นเวลา 30 วันมีน้ำหนักเฉลี่ยมากกว่ากลุ่มควบคุม แต่ไม่พบความแตกต่างในกุ้งที่เลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน การรอดชีวิตของกุ้งเมื่อทำการเลี้ยงด้วยอาหารชนิดต่างๆเป็นเวลา 60 วันพบว่า กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* S11 และกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* P11 ร่วมกับ *Bacillus* S11 มีการรอดชีวิต (%) มากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) แต่ไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* P11 อย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$)

เปรียบเทียบจากปริมาณเม็ดเลือดรวม ปริมาณเม็ดเลือดกรานูลาร์ และปริมาณฟีนอลออกซิเดสเดสพบว่าก่อนชักนำให้เกิดโรค กุ้งกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* S11 มีปริมาณเม็ดเลือดรวม เม็ดเลือดกรานูลาร์ และปริมาณฟีนอลออกซิเดสแตกต่างจากกลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ในขณะที่ไม่พบความแตกต่างของปริมาณเม็ดเลือดรวม เม็ดเลือดกรานูลาร์ และปริมาณฟีนอลออกซิเดสระหว่างกลุ่มควบคุมกับกุ้งกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาการผสม *Bacillus* P11 อย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) เมื่อทำการหาปริมาณแบคทีเรีย *Bacillus* P11 ในลำไส้กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาการผสม *Bacillus* P11 พบว่ามีปริมาณเท่ากับ 1.12×10^6 CFU/g จากผลการทดลองข้างต้นถึงแม้ว่า *Bacillus* P11 ไม่เป็นแบคทีเรียก่อโรคต่อกุ้ง และสามารถมีชีวิตอยู่รอดในกระเพาะได้ แต่ไม่แสดงคุณสมบัติในการเป็นโพรไบโอติกในกุ้งขาวแวนนาไมเนื่องจากไม่ก่อนประโยชน์ต่อกุ้ง เช่น

เพิ่มการเติบโต หรือกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน (Fuller, 1989; Verchuere, 2000) ในการเลี้ยงกุ้งครั้งที่สองจึงได้ทำการตัดกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* P11 ออกจากการทดลองเพื่อให้มีจำนวนบ่อทดลองต่อกลุ่มทดลองมากขึ้น

การเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 2 พบว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* S11 มีน้ำหนักเฉลี่ยแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) จึงสรุปได้ว่าโพรไบโอติก *Bacillus* S11 สามารถกระตุ้นการเจริญในกุ้งขาวแวนนาไมได้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Yan-bo Wang (2007) ที่ใช้โพรไบโอติก *Bacillus* coagulans ผสมในอาหารกุ้งในการกระตุ้นการเติบโตในกุ้งขาวแวนนาไม

กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* S11 มีการรอดชีวิตมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มทดลองอื่นๆ ซึ่งสอดคล้องกับผลงานของ Zhou และคณะ (2009) ที่รายงานการใช้โพรไบโอติก *Bacillus coagulans* SC8168 โดยเติมในน้ำเพาะเลี้ยงในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม ที่พบทั้งการเพิ่มอัตราการรอดชีวิต และโพรไบโอติกยังกระตุ้นการทำงานของอะไมเลส และไลเปสได้ ทั้งนี้การเลี้ยงกุ้งทั้งสองครั้งก็สามารถตรวจพบแบคทีเรียโพรไบโอติกในน้ำเพาะเลี้ยงกุ้งขาวเช่นเดียวกัน

กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* S11 ร่วมกับ *Bacillus* P11 พบว่าการรอดชีวิตมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) แต่น้อยกว่ากลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* S11 สาเหตุดังกล่าวน่าจะเกิดจากปริมาณของ *Bacillus* S11 โดยในการทดเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 2 พบปริมาณ *Bacillus* S11 ในลำไส้กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* S11 เพียงอย่างเดียวเท่ากับ 4.70×10^6 CFU/ml ในขณะที่ลำไส้กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* S11 ร่วมกับ *Bacillus* P11 พบปริมาณ *Bacillus* S11 เท่ากับ 1.40×10^5 CFU/ml

นำกุ้งหลังจากการเพาะเลี้ยงทั้งสองครั้ง มาทดลองความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค ด้วย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 หลังการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค พบว่ากุ้งกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* S11 มีการตายสะสมน้อยที่สุดอย่างมีนัยสำคัญเปรียบเทียบกับกลุ่มทดลองอื่นๆ ($P < 0.05$) ในขณะที่กุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* S11 ร่วมกับ *Bacillus* P11 มีการตายสะสม น้อยกว่ากลุ่มควบคุมแต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ทั้งนี้น่าจะเป็นผลมาจากปริมาณ *Bacillus* S11 เช่นเดียวกับการรอดชีวิต จึงสรุปได้ว่าการเสริมการเลี้ยงกุ้งขาวด้วยโพรไบโอติก *Bacillus* S11 สามารถทำให้การตายสะสมลดลงเมื่อถูกเหนี่ยวนำให้เกิดโรคได้ ดังการทดลองของ Tseng และคณะ (2009) ที่รายงานการใช้โพรไบโอติก *Bacillus subtilis* E20 ผสมในอาหารในการเลี้ยงกุ้งขาว พบว่าการตายสะสมลดลงเมื่อเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio algimolyticus* ได้

เปรียบเทียบจากปริมาณเม็ดเลือดรวม ปริมาณเม็ดเลือดกรานูลาร์ และปริมาณฟีนอลออกซิเดสเดสพบว่าก่อนชักนำให้เกิดโรค กุ้งกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* S11 มีปริมาณ

เม็ดเลือดรวม เม็ดเลือดกรานูลาร์ และปริมาณฟีนอลออกซิเดสแตกต่างจากกลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยมีปริมาณเม็ดเลือดรวมประมาณ 10^6 cell/ml หลังจากเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 พบว่าปริมาณเม็ดเลือดรวมและฟีนอลออกซิเดสมีค่าลดลง สอดคล้องกับขวัญดาว จันทโชติ (2551) ซึ่งรายงานปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งขาวมีประมาณ 10^6 cell/ml เม็ดเลือดรวมและปริมาณฟีนอลออกซิเดสมีค่าลดลงหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 1526 จำนวนเม็ดเลือดที่สดลงชี้ให้เห็นว่าเกิดการตอบสนองป้องกันสิ่งแปลกปลอมของเซลล์เม็ดเลือดกับเชื้อก่อโรค สอดคล้องกับ Smith และ Söderhäll (1993) ที่รายงานว่า จำนวนเม็ดเลือดรวมในกุ้งน้ำจืด *Astacus astacus* และปู *Carcinus maenas* มีจำนวนลดลงเมื่อฉีดสิ่งแปลกปลอมเข้าในตัวสัตว์ แสดงถึงการตอบสนองทางเซลล์กับสิ่งแปลกปลอม สำหรับการใช้โพรไบโอติกกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งขาวนั้นยืนยันการรายงานของ Chiu และคณะ (2007) ที่แสดงผลของโพรไบโอติก *Lactobacillus plantarum* สามารถเพิ่มปริมาณเม็ดเลือดรวม การกลืนทำลายสิ่งแปลกปลอม และแอคทิวิตี้ของฟีนอลออกซิเดสได้

ในการทดลองเลี้ยงกุ้งทั้ง 2 ครั้งแสดงให้เห็นว่า *Bacillus* S11 สามารถให้คุณสมบัติของการเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกของกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei* แม้ว่ากุ้งขาวไม่ใช่สัตว์เจ้าบ้านที่เป็นที่มาของโพรไบโอติก ทั้งนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Liu และคณะ (2010) ที่ใช้ *Bacillus subtilis* E20 แยกได้จาก Natto และ Yan-bo Wang (2007) ที่ใช้ *Bacillus* coagulans แยกได้จากบ่อปลาคราฟเป็นโพรไบโอติกผสมในอาหารกุ้งขาวแวนนาไม

จากการทดสอบคุณภาพน้ำบางประการในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำทั้ง 2 ครั้ง (ตารางที่ 7 และตารางที่ 12) ได้แก่ แอมโมเนีย ไนไตรท์ อัลคาไลน์นิตี้ อุณหภูมิ พีเอช ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ และความเค็ม พบว่าคุณภาพน้ำอยู่ในเกณฑ์ที่ปลอดภัยสำหรับการเลี้ยงกุ้งขาว ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าโพรไบโอติก *Bacillus* S11 และ *Bacillus* P11 ที่ใช้ในการเลี้ยงกุ้งขาว ไม่ได้ส่งผลต่อคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งขาว ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ พลพิสิฐ อุทิศวรรณกุล (2548) ซึ่งพบกว่าการใช้โพรไบโอติก *Bacillus* P11 ไม่ได้ส่งผลต่อคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

สรุปผลการทดลอง

1. โพรไบโอติก *Bacillus* S11 สามารถกระตุ้นการเจริญ และการรอดชีวิตของกุ้งขาวแวนนาไมได้อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)
2. เมื่อทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคเรืองแสงด้วย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 พบว่ากุ้งกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* S11 มีการตายสะสมน้อยที่สุดอย่างมีนัยสำคัญเปรียบเทียบกับกลุ่มทดลองอื่นๆ ($P < 0.05$)
3. การทดลองเปรียบเทียบความสามารถในการสร้างภูมิคุ้มกันที่ป้องการสิ่งแปลกปลอมโดยสารน้ำโดยเปรียบเทียบจากปริมาณเม็ดเลือดรวม ปริมาณเม็ดเลือดกรานูลาร์ และปริมาณฟีนอลออกซิเดสพบว่าโพรไบโอติก *Bacillus* S11 สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งให้สูงขึ้นได้
4. การใช้โพร *Bacillus* S11 ร่วมกับ *Bacillus* P11 เป็น mixed culture พบว่าไม่เสริมประสิทธิภาพในการเลี้ยงกุ้งขาวทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก *Bacillus* S11 สามารถยับยั้งการเจริญของ*Bacillus* P11 และ *Bacillus* P11 ไม่เป็นแสดงคุณสมบัติในการเป็นโพรไบโอติกในกุ้งขาว
5. *Bacillus* S11 มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกที่ดีเหมาะสำหรับการนำไปใช้เลี้ยงกุ้งขาวได้

ข้อเสนอแนะ

จากการทดลองการเสริมแบคทีเรีย *Bacillus* P11 และ *Bacillus* S11 ในการเพาะเลี้ยงกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei* มีข้อเสนอแนะว่าควรทำการศึกษาเพิ่มเติมดังนี้

1. ศึกษาปริมาณของ *Bacillus* S11 ที่แน่นอนและปริมาณต่ำสุดอันมีผลเสริมการเจริญเติบโตและกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรคให้แก่กุ้ง
2. ศึกษาการใช้พรีไบโอติกเพื่อเสริมประสิทธิภาพของโพรไบโอติก *Bacillus* S11 ในการเลี้ยงกุ้งขาว

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กิจการ ศุภมาตย์, วุฒิพร พรหมขุนทอง, ชุติมา ตันติกิตติ และRudolf Hoffmann. 2543. ภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ เซลล์และเนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมในกุ้งกุลาดำ. วารสารสงขลานครินทร์. ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22 (ฉบับพิเศษ): 581-588.

กรรณิการ์ สิริสิงห์. 2525. เคมีของน้ำ น้ำโสโครกและการวิเคราะห์. กรุงเทพมหานคร: คณะสาธารณะสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ขวัญดาว จันทโชติ. 2551. ผลของสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อการเติบโต การรอดตาย และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei*. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ฉัทชนัน ศิริไพศาล, นนทวิทย์ อารีย์ชน, เรืองวิชญ์ ยุ้นพันธ์ และนิติ ชูเชิด. 2549. การใช้เบต้ากลูแคนเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei* Boone). รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44, 279-290. กรุงเทพมหานคร : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ชนกันต์ จิตมนัส. 2547.งานประชุมสัมมนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำโลกปี 2002 ณ กรุงปักกิ่ง ประเทศจีน วารสารการประมง 56 (มกราคม – กุมภาพันธ์): 1

ชลอ ลิ้มสุวรรณ และพรเลิศ จันทร์รัชชกูล. 2547. อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย. กรุงเทพมหานคร: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ชัยชาญ ไตรศรีศิลป์. 2545. ฟีนอลออกซิเดสที่เกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon*. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ถิรประภา รัตนโชติ, นิติ ชูเชิด และ ชลอ ลิ้มสุวรรณ. 2550. การเปรียบเทียบการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมเพื่อให้ได้ผลตอบแทนสูงสุดที่ความหนาแน่นแตกต่างกันในน้ำความเค็มต่ำ. รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45, 237-244. กรุงเทพมหานคร : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ทวีศักดิ์ ศรีชนะ. 2547. องค์ประกอบบางประการของระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือดของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*, Fabricius) ที่ระยะต่าง ๆ. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต วิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ทินรัตน์ ศรีสุวรรณ์. 2551. คู่มือการตรวจและวินิจฉัยโรคในกุ้งทะเล. กรุงเทพมหานคร: ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย

ทีมงานข่าวกุ้ง. 2548. ส.กุ้งไทย โวยศุลกากรสหรัฐฯ เก็บซี-บอนด์โหด เก็บดองข้ามปี แถมยังต้องวางใหม่เพิ่มอื้อ. วารสารเครือเจริญโภคภัณฑ์ ข่าวกุ้ง 209: 1, 4.

ทีมงานข่าวกุ้ง. 2551. ราคากุ้งเดือนเมษายน 2551. วารสารเครือเจริญโภคภัณฑ์ ข่าวกุ้ง 237: 4.

ทีมงานข่าวกุ้ง. 2553. ราคากุ้งเดือนมิถุนายน 2553. วารสารเครือเจริญโภคภัณฑ์ ข่าวกุ้ง 218: 4.

ธนพงศ์ แสงซื่อ. 2456. พื้นฐานทั่วไปของกุ้งขาวแวนนาไม. กุ้งขาวอินเทคค์. กรุงเทพมหานคร: อินเทคค์และแลบอินเตอร์

ปิยะบุตร วินิชพงษ์พันธุ์. 2545. ศาสตร์ของกุ้งขาวลิโทพีเนียสแวนนาไม. วารสารสัตว์น้ำ 160: 121 - 124.

ประพันธ์ โนระดี. 2554. การค้าสินค้าประมงในรอบ 10 ปี (2544-2553). จุลสารการค้าสินค้าประมงระหว่างประเทศ 6 (มกราคม – มีนาคม 2554): 1.

พลพิสิฐ อุทิศวรรณกุล. 2548. การเสริม *Bacillus subtilis* BP11 ในการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* ในภาคสนาม. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

มั่นสิน ตัณฑุลเวศม์ และไพพรรณ พรประภา. 2554. การจัดการคุณภาพน้ำและการบำบัดน้ำเสียในบ่อเลี้ยงปลาและสัตว์น้ำ. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วัลลภ คงเพิ่มพูล. 2534. กุ้งกุลาดำ. กรุงเทพมหานคร: โครงการหนังสือเกสรชุมชน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ศิริเพ็ญ สังข์ชัย. 2546. โพรไบโอติก *Bacillus subtilis* BP11 สำหรับเสริมในอาหารกุ้งกุลาดำเพื่อป้องกัน *Vibrio harvey*. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุมิตรา นามประดิษฐ์กุล. 2551. ผลของการเสริมโปรไบโอติกต่อการเจริญเติบโตและอัตรารอดของกุ้งขาวแวนนาไม *Litopenaeus vannamei*. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อัญชลี ทัศนาขจร. สถานภาพงานวิจัยด้านระบบภูมิคุ้มกันในกุ้ง [ออนไลน์]. 2553. แหล่งที่มา: http://home.biotec.or.th/NewsCenter/my_documents/my_files/24288_Unchalee_29March.pdf [2554, เมษายน 2]

อรอนงค์ ประวิทย์วิไลกุล. 2547. การเปรียบเทียบการเลี้ยงกุ้งขาวแปซิฟิก *(Litopenaeus vannamei* Boone, 1931) ในบ่อดินและบ่อที่ปูด้วยโพลีเอททีลีน. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิตมหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์.

ภาษาอังกฤษ

Allan, G.L., Maguire, G.B. 1991. Lethal levels of low dissolved oxygen and effects of short-term oxygen stress on subsequent growth of juvenile *Penaeus monodon*. Aquaculture 94: 27–37.

Bacázer,J.L., Rojas-Luna,T., Cunningham,D.P. 2007. Effect of the addition of four potential probiotic strains on the survival of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following immersion challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. Journal of Invertebrate Pathology 96:147-150

Bauchau, A.G., 1980. Crustaceans. In: Ratcliffe, N.A., Rowley, A.F. (eds.), Invertebrate Blood Cells. pp. 385–420. New York: Academic Press

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantitives of protein utilizing the principle of dye binding. Analytical Biochemistry. 72: 248-254.

Brock, J.A., Main, K. 1994. A guide to the common problems and diseases of Cultured *Penaeus vannamei*. The Oceanic Institute, Makapuu Point, Honolulu.

Cheng, W., Liu, C.H., Kuo, C.M. and Chen, J.C. 2005. Dietary administration of sodium alginate enhances the immune ability of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. Fish and Shellfish Immunology. 18: 1-12.

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

Clark, J.V. 1986. Inhibition of moulting in *Penaeus semisulcatus* (De Haan) by long-term hypoxia. Aquaculture. 52: 253–254.

Coman, G.J., Crocos, P.J., Preston, N.P., Fielder, D., 2002. The effects of temperature on the growth, survival and biomass of different families of juvenile *Penaeus japonicus* Bate. Aquaculture. 214: 185–199.

Diaz, J.R., Rosenberg, R. 1995. Marine benthic hypoxia: a review its ecological effects and the behavioural responses of benthic macrofauna. Oceanography and Marine Biology. 33: 245–303.

FAO. 1994. Aquaculture Production 1986-1992. FAO Fisheries Circular. 815: 216

Farfante, I.P. and Kensley, B. 1997. Penaeoid and sergestoid shrimps and prawns of the world keys and Diagnoses for the Families and Genera. Paris: Editions du Muséum.

Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. Journal of Applied Bacteriology. 66: 365-378.

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

Gram, L., Melchiorsen, J., Spanggard, B., Huber, I., and Nielsen, T.F. 1999. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, possible probiotic treatment of fish. Applied and Environmental Microbiology. 65: 969-973.

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

Hamilton-Miller, J.M. 2003. The role of probiotics in the treatment of and prevention of Helicobacter pylori infection. International Journal of Antimicrobial Agents. 22: 360-366.

Havenaar, R. and Huis in't Veld, J.H.J. 1992. Probiotics: a general view. In Wood, B.J.W. (ed.) The lactic acid bacteria in health & disease, vol 1, pp. 151-170. London: Elsevier Applied Science.

Hewitt, D.R., Duncan, P.F., 2001. Effect of high water temperature on the survival, moulting and food consumption of *Penaeus (Marsupenaeus) japonicus* (Bate, 1888). Aquaculture. 32: 305–313.

Jackson, C.J., Wang, Y.G. 1998. Modelling growth rate of *Penaeus monodon* Fabricius in intensively managed ponds: effects of temperature, pond age and stocking density. Aquaculture. 29: 27–36.

Johansson, M.W. and Söderhäll, K. 1989. Cellular immunity in crustaceans and the proPO system. Parasitol Today. 5: 171-176.

Lackie, A.M. 1980. Invertebrate immunity. Parasitology 80: 393–412.

Lebel, L., Mungkung, R., Gheewala, H.S., Lebel, P., 2010. Innovation cycles, niches and sustainability in the shrimp aquaculture industry in Thailand. Environmental science and policy. 13: 291–302.

Lee, Y.K. 1999. Handbook of Probiotics. New York: John Wiley & Sons.

Li, C.C., and Chen, J.C. 2008. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under low and high pH stress. Fish and Shellfish Immunology. 25: 701-709

Li, J., Tan, B. and Mai, K. 2009. Dietary probiotic *Bacillus* OJ and isomaltooligosaccharides influence the intestine microbial populations, immune responses and resistance to white spot syndrome virus in shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Aquaculture. 291: 35-40

Liao, I.C. and Chen, Y.P. 1983. Maturation and spawning of penaeid prawns in Tungkang marine laboratory, Taiwan, In J.P. McVey (ed.), Handbook of mariculture, Vol. 1 Crustacean aquaculture, pp. 155-160. Florida : CRC Press.

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

Lilly, D.M. and Stillwell, R.H. 1965. Probiotics: Growth promoting factors produced by Microorganism. Science. 147: 747-748.

McGraw, W., Teichert-Coddington, D.R., Rouse, D.B., Boyd, C.E. 2001. Higher minimum dissolved oxygen concentrations increase penaeid shrimp yields in earthen ponds. Aquaculture. 199: 311–321.

Menasveta, P., Aranyakanonda, P., Rungsupa, S. and Moree, N. 1989. Maturation and larviculuture of penaeid prawns in closed recirculation seawater system. Aquaculture Enginerring. 10: 173-181.

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

Motte, E., Yugcha, E., Luzardo, J., Castro, F. and 12 others. 2003. Prevention of IHHNV vertical transmission in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture. 219: 57-70.

Moullac, G.L., Soyez, C., Saulnier, D., Ansquer, D., Avarre, J.C., Levy, P. 1998. Effect of hypoxic stress on the immune response and the resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris*. Fish Shellfish Immunol. 8: 621–629.

Mugnier, C., Soyez, C. 2005. Response of the blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* to temperature decrease and hypoxia in relation to molt stage. Aquaculture. 244: 315–322.

Nunan, L.M. and Lightner, D.V. 1997. Development of a non-radioactive gene probe by PCR for detection of white spot syndrome virus (WSSV). Journal of Virological Methods. 63: 193.201.

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

Ponce-Palafox, J., Martinez-Palacios, C.A., Ross, L.G., 1997. The effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp *Penaeus vannamei* Boone 1931. Aquaculture. 157: 107–115.

Poulos, B.T., Pantoja, C.R., Bradley-Dunlop, D., Aguilar, J. and Lightner, D.V. 2001. Development and application of monoclonal antibodies for the detection of white spot syndrome virus of penaeid shrimp. Diseases of Aquatic Organisms. 47: 13-23.

Ratanapo, S. and M. Chulavatnatol. 1990. Monodin, a new sialic acid-specific lectin from black tiger prawn (*Penaeus monodon*). Comparative Biochemistry and Physiology. 97: 515-520.

Raa, J. 2000. The use of immunestimulants in fish and shellfish feeds. In: Cruz-Suarez, L.E.; Ricque-Marie, D.; Tapia-Salazar, M.; Olvera-Novoa, M.A.Y. and Civera-Cerecedo, R. (eds.). Avances en Nutrici**Ó**n Acu**Í**c**Ó**la V. Memorias del V Simposium International de Nutrici**Ó**n Acu**Í**c**Ó**la. Yucatan, Mexico: Merida

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

Renaud, M.L. 1986. Detecting and avoiding oxygen deficient sea water by brown shrimp, *Penaeus aztecus* (Ives), and white shrimp, *Penaeus setiferus* (Linnaeus). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 98: 283–292.

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

Renapipat, S., Rukprataporn, S., Piyatiratitivorakul, S. and Menasveta, P. 1998b. Probiotics in aquaculture: a case study of probiotics for larvae of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). In T. W. Flegel (ed.), Advances in shrimp biotechnology, pp. 177-181. Bangkok: National Center for Genetic Engineering and Biology.

Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitivorakul, S., Menasveta, P. 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp *Penaeus monodon* by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). Aquaculture. 19: 271– 288.

Rengpipat, S., Tunyanun, A., Fast, A.W., Piyatiratitivorakul, S., Menasveta, P. 2003. Enhance growth and resistance to *Vibrio* challenge in pond-reard black tiger shrimp *Penaeus monodon* fed a *Bacillus* probiotic. DAO. 55: 169-173.

Rodríguez, J., Espinosa, Y., Echeverría, F., Cárdenas, G., Román, R., and Stern, S. 2007. Exposure to probiotics and β -1,3/1,6-glucans in larviculture modifies the immune response of *Penaeus vannamei* juveniles and both the survival to White Spot Syndrome Virus challenge and pond culture. Aquaculture. 273: 405-415.

Rosenberry, B. 2005. World shrimp farming 2005. Shrimp News International, San Diego, California: Academic Press.

Rosenberry, R. 1993. World shrimp farming 1993. Aquaculture Digest. December: 52.

Salminen, S., Ouwehand, A., Benno, Y., and Lee, Y.K. 1999. Probiotics: How should they be defined? Trends in Food Science and Technology. 10: 107–110.

Santarem, M. and A. Figueras. 1995. Basic studies on defense mechanisms of mussels.. *In* J.S. Stolen, T.C. Fletcher, S.A. Smith, J.T. Zeelikoff, S.L. Kaattari, R.S. Anderson, K. Söderhäll and B.A. Weeks-Perkins (eds.). Techniques in Fish Immunology-4: Immunology and Pathology of Aquatic Invertebrate. pp. 87-92. Fair Haven, New Jersey, USA: SOS Publications

Schrezenmeir, J. and M. de Vrese, 2001. Probiotics,prebiotics and synbiotics: approaching a definition. The American Journal of Clinical Nutrition. 73: 361-364.

Sindermann, C.J. 1990. Principal diseases of marine fish and shellfish. San Diego, California: Academic Press.

Smith, V.J., Chisholm, J.R.S. 1992. Non-cellular immunity in crustaceans. Fish Shellfish Immunol. 2: 1–31.

Smith, V.J. and Söderhäll, K., 1991. A comparison of phenoloxidase activity in the blood of marine invertebrates. Developmental and Comparative Immunology. 15: 251-261.

Smith, V.J. and Söderhäll, K., 1983. β -1,3-Glucan activation of crustacean hemocytes in vitro and in vivo. The Biological Bulletin. 164: 299–314.

Söderhäll, K. and Cerenius, L. 1992. Crustacean immunity. Annual Review of Fish Diseases. 2: 3-23.

Spanopoulos-Hernández, M., Martínez-Palacios, C.A., Vanegas-Pérez, R.C., Rosas, C., Ross, L.G. 2005. The combined effects of salinity and temperature on the oxygen consumption of juvenile shrimps *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson, 1874). Aquaculture. 244: 341–348.

Tang, K.F.J. and Lightner, D.V. 2000. Quantification of white spot syndrome virus DNA through a competitive polymerase chain reaction. Aquaculture. 189: 11-21.

Tang, K.F.J., Poulos, B.T., Wang, J., Redman, R.M., Shih, H.H. and Lightner, D.V. 2003. Geographic variations among infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) isolates and characteristics of their infection. Diseases of Aquatic Organisms. 53: 91-99.

Tannock, G. W. 1997, Modification of the normal microbiota by diet, stress, antimicrobial agents, and probiotics. In R.I. Mackie, B.A. With and R.E. Isaacson (eds.), Gastrointestinal Microbiology, Vol. 2, Gastrointestinal Microbes and host Interactions, pp. 434-465. New York: Chapman and Hall Microbiology Series, International Thomson Publishing.

Tseng, D.Y., Ho, P.L., Huang, S.Y., Cheng, S.C., Shiu, Y.L., Chiu, C.S., and Liu, C.H. 2009. Enhancement of immunity and disease resistance in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by the probiotic, *Bacillus subtilis* E20. Fish and Shellfish Immunology. 26: 339-344.

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

Wang, Q., Nunan, L.M. and Lightner, D.V. 2000. Identification of genomic variations among geographic isolates of white spot syndrome virus using restriction analysis and Southern blot hybridization. Diseases of Aquatic Organisms. 43: 175.181.

Wang, Q., White, B.L., Redman, R.M.and Lightner, D.V. 1999. Per os challenge of *Litopenaeus vannamei* postlarvae and *Farfantepenaeus duorarum* juveniles with six geographic isolates of white spot syndrome virus. Aquaculture. 170: 179.194.

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

Wang, Y.B., and He, Z. 2009 Effect of probiotics on alkaline phosphatase activity and nutrient level in sediment of shrimp, *Penaeus vannamei*, ponds. Aquaculture. 287: 94-97.

Wannamaker, C.M., Rice, J.A. 2000. Effects of hypoxia on movements and behavior of selected estuarine organisms from the southeastern United States. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 249: 145–163.

Wu, R.S.S., Lam, P.K.S., Wan, K.L. 2002. Tolerance to, and avoidance of, hypoxia by the penaeid shrimp (*Metapenaeus ensis*). Environmental Pollution. 118: 351–355.

Wyban, J., Walsh, W.A., Godin, D.M., 1995. Temperature effects on growth, feeding rate and feed conversion of the Pacific white shrimp (Penaeus vannamei). Aquaculture. 138: 267–279.

Yang, S.P., Wu, Z.H., Jian, J.C. and Zhang, Z.X. 2010. Effect of marine red yeast *Rhodosporidium paludigenum* on growth and antioxidant competence of *Litopenaeusvannamei*. Aquaculture. 309: 62-65.

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

Zhou, X., Wang, Y. and Li, W. 2009. Effect of probiotic on larvae shrimp (*Penaeus vannamei*) based on water quality, survival rate and digestive enzyme activities. Aquaculture. 287: 349-353.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดลอง และภาวะที่ใช้เลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยง *Bacillus subtilis* P11 (BP11)

ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	10.0	กรัม
เดกซ์โตส (Dextrose)	2.5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	20.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2.5	กรัม

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน (15 ปอนด์ / ตารางนิ้ว 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที) ถ้าต้องการอาหารแข็งเติมวุ้นผง 15 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร

2. อาหารเลี้ยง *Bacillus subtilis* S11 (BS11)

ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	10.0	กรัม
เดกซ์โตส (Dextrose)	2.5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2.5	กรัม

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน

2. อาหารเหลวทริปติกซอย (Tryptic soy broth)

ทริปโตน (Tryptone)	17.0	กรัม
ผงสกัดถั่วเหลือง (Soytone)	3.0	กรัม
เดกซ์โตส (Dextrose)	2.5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟส (K_2HPO_4)	2.5	กรัม
ปรับพีเอชเป็น 7.3$\pm$0.2		

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน

3. อาหารแข็งทริปติกซอย (Tryptic soy agar)

ทริปโตน (Tryptone)	17.0	กรัม
ผงสกัดถั่วเหลือง (Soytone)	3.0	กรัม
เดกซ์โตส (Dextrose)	2.5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟส (K_2HPO_4)	2.5	กรัม
ผงวุ้น	15.0	กรัม

ปรับพีเอชเป็น 7.3±0.2

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน

4. อาหารแข็งไทโอซัลเฟตซิเตรทบายซอลท์ (Thiosulfate citrate bile salt agar) + 2% Nacl

ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	5.0	กรัม
โปรติโอสเปปโตน เบอร์ 3 (Proteose peptone No.3)	10.0	กรัม
โซเดียมไทโอซัลเฟต ($Na_2S_2O_3$)	10.0	กรัม
โซเดียมซิเตรท ($HOC(COONa)(CH_2COONa)_2$)	10.0	กรัม
ออกซ์กอล (Oxgall)	8.0	กรัม
แซคคาโรส	20.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	20.0	กรัม
เฟอริกซิเตรท ($C_6H_5O_7Fe.5H_2O$)	1.0	กรัม
บรอมไธมอลบลู (Bromthymol blue)	0.04	กรัม
ผงวุ้น	15.0	กรัม

ปรับพีเอชเป็น 8.6 ± 0.2

ต้มเดือดประมาณ 2-3 นาที จนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน โดยไม่ต้องนึ่งฆ่าเชื้อ

Bacillus subtilis P11 (BP11) -probitocits

preculture โดยเพาะเชื้อ 1 ลูปลงในอาหารแข็งทริปติกซอยในหลอดผิวเอียง (TSA slant) เป็นเวลา 24 ชม. หลังจากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสำหรับ *Bacillus* P11 ปริมาตร 400 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่าที่ความเร็ว200รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชม. ถ่ายหัวเชื้อปริมาณ 3% (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสำหรับ *Bacillus* P11 บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชม. นำเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเหลวมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บเซลล์ในรูปเซลล์สดที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้

Bacillus subtilis S11 (BS11) -probitocits

preculture เช่นเดียวกับ *Bacillus* P11 แต่เปลี่ยนชนิดอาหารเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสำหรับ *Bacillus* S11

Vibrio harveyi **สายพันธุ์** 639

นำเชื้อ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 ที่เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปติกซอย ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์(น้ำหนัก/ปริมาตร) ที่อุณหภูมิห้อง เขย่าด้วยความเร็ว 200รอบ/นาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นขีดเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TCBS ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เขี่ยเชื้อที่เป็นโคโลนีเดียวสีเขียวลงในอาหาร TSA ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงที่ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ใช้เชื้อที่ได้เป็นหัวเชื้อในการทดลองขั้นต่อๆไป

ภาคผนวก ข

ภาคผนวก ข
สารละลายที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลายบัฟเฟอร์ cacodylate (Smit และ Söderhäll, 1991)

Sodium cacodylate	0.01	โมลาร์
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	0.45	โมลาร์
แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.6H_2O$)	10	มิลลิโมลาร์
แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2.2H_2O$)	26	มิลลิโมลาร์

ปรับพีเอชเป็น 7.0 เก็บในขวดสีชาที่ 4 องศาเซลเซียส

2. น้ำยาทดสอบโปรตีนโดยวิธี Bradford

สีย้อมโคแมสซีบริลเลียนท์บลู (coomassie brilliant blue G-250)	700	มิลลิกรัม
เอทานอล 95%	50	มิลลิลิตร
กรดฟอสฟอริค 85% (85% phosphoric acid)	700	มิลลิลิตร

ละลายสีย้อมโคแมสซีบริลเลียนท์บลูในเอทานอล 95% หลังจากนั้นเติมกรดฟอสฟอริค ผสมให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร เก็บใส่ขวดสีชาที่ 4 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก ค

ภาคผนวก ค
สูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม

สูตรอาหารกุ้ง

ปลาป่น	22	%(w/w)
ถั่วเหลืองป่น	30	%(w/w)
กุ้งป่น	4	%(w/w)
หมึกป่น	4	%(w/w)
เลซิทิน	1	%(w/w)
แป้งสาลี	23	%(w/w)
กลูเตน (Wheat gluten)	6	%(w/w)
วิตามินรวม	2	%(w/w)
แร่ธาตุรวม	2	%(w/w)
น้ำมันปลา	3	%(w/w)
คลอเลสเตอรอล	1	%(w/w)
เซลลูโลส	2	%(w/w)

ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปอัดเม็ด

ภาคผนวก ง

ภาคผนวก ง

API Test kit 50 CHB

หลักการ

API 50 CHB Medium เป็นอาหารพร้อมใช้สำหรับศึกษาการหมักของคาร์โบไฮเดรต 49 ชนิด ใน API 50 CH Strip ในระหว่างการบ่มคาร์โบไฮเดรตถูกหมักกลายเป็นกรด ซึ่งมีผลให้ pH ลดลงสังเกตได้จากการเปลี่ยนสีของ indicator ผลชีวเคมีที่ได้ใช้นำมาวิเคราะห์สายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ บางครั้งผลการทดสอบก็เพียงพอต่อการวิเคราะห์เชื้อ แต่บางกรณีอาจจำเป็นต้องยืนยันผลด้วย API 20E หรือสังเกตจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา

วิธีการทดสอบ

1. การเลือก Colonies ของเชื้อ

1.1 ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อ

1.2 ตรวจสอบว่าเชื้อนั้นเป็น *Bacillus* sp.: aerobic, รูปแท่งสร้างสปอร์ โดยปกติจะ เป็นแกรมบวก

1.3 เลี้ยงเชื้อบน nutrient agar plate สำหรับสายพันธุ์ที่โตช้า ให้เลี้ยง 2 plate เพื่อให้มีปริมาณแบคทีเรียที่เพียงพอ

13.1 Mesophiles เจริญได้ดีที่อุณหภูมิระหว่าง 25^0C และ 45^0C, 16-18 ชม.

13.2 Psychrophiles เจริญได้ที่อุณหภูมิ 20^0C, 48 ชม.

13.3 Thermophiles เจริญได้ที่อุณหภูมิ 55^0C, 12-16 ชม.

ในกรณีที่ไม่ทราบอุณหภูมิที่เหมาะสมของเชื้อ ให้ทำการบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ

การเตรียม Strip

Strip ของ API 50 CH จะประกอบด้วย 5 แถบด้วยกัน โดยแต่ละแถบจะประกอบด้วยช่องที่บรรจุสารอาหารชนิดแห้งไว้จำนวน 10 ช่องและมีหมายเลขกำกับทุกช่อง โดยเรียงลำดับจาก 0 จนถึง 49 เตรียมกล่องสำหรับ incubate โดยเติมน้ำกลั่น (ปริมาตร ~ 10 มล.) ลงในหลุมทุกหลุมของถาดล่างของกล่อง incubate บันทึก Reference No. ของเชื้อบริเวณพลาสติกที่ยื่นออกมา (ไม่ควร บันทึกไว้ที่ฝากล่อง เพราะอาจเกิดการสับสนได้) นำแถบ strip 2 แถบใหญ่คือ 0-19 และ 20-39 ออกจากที่บรรจุ หลังจากนั้นแบ่งแถบ strip ออกเป็น 4 ส่วนเล็ก ๆ นั่นคือแถบ 0-9, 10-19, 20-29 และ 30-39 นำมาวางในถาดล่างของกล่อง incubate ซึ่งเติมน้ำไว้แล้ว นำstrip อีกส่วนที่เหลือได้แก่แถบ 40-49 ออกมาวางในถาด incubation จนเต็ม

การเตรียม inoculum

1. ในกรณีใช้เครื่อง Densitometer

1.1 เปิด ampoule ของ API 50 CHB Medium

1.2 เติมโคโลนีของเชื้อลงใน API 50 CHB medium ให้มีค่าความขุ่นเท่ากับ 2 McFarland

1.3 ในกรณีที่ต้องการทดสอบ API 20E Strip ด้วย เปิด NaCl 0.85% (5 ml) จากนั้นใส่เชื้อลงไปและปรับความขุ่นให้ได้ 2 McFarland

2. ในกรณีไม่ใช้เครื่อง Densitometer

2.1 เปิดขวดที่บรรจุ NaCl 0.85% (1 ml)

2.2 เขี่ยเชื้อจากอาหารลงในหลอด NaCl 0.85% ให้มีความเข้มข้นสูง

2.3 เปิดขวดที่บรรจุ NaCl 0.85% Sterile (5 ml) เติม Suspension จากข้อ 2.2 ลงไปให้มีความขุ่นเท่ากับ 2 McFarland บันทึกจำนวนหยดของ Suspension ที่เติมลงไป (n)

* Suspension ที่มีความขุ่น 2 McFarland ใช้สำหรับ inoculate API 20E

2.4 เปิด ampoule ของ API 50 CHB medium

2.5 เติม Suspension เป็นจำนวน 2 เท่าของจำนวนหยด (2 n) ในข้อ 2.3 ลงใน ampoule ของ API 20 CHB medium

3. ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

การหยด Inoculum ลงใน Strip

เติม API 50 CHB medium ลงในหลุม (ไม่ต้องเต็ม) การเติม Mineral oil จะช่วยให้แยกผลการทดสอบว่าเป็น Positive หรือ Negative ได้ชัดเจนยิ่งขึ้น

การบ่ม

1. Mesophile บ่มที่อุณหภูมิ 30^0C หรือ 37^0C, 48 ชม.

2. Psychrophiles บ่มที่อุณหภูมิ 20^0C หรือ 37^0C, 96 ชม.

3. Thermophile บ่มที่อุณหภูมิ 55^0C หรือ 37^0C, 24 ชม.

** API 50 CH strip ก้นหลุมจะเป็นส่วนที่สำคัญ ให้ระวังการเกิดก๊าซที่ก้นหลุม

** หากไม่ทราบอุณหภูมิที่เหมาะสม ให้บ่มที่อุณหภูมิของ Mesophile

การอ่านผล

สิ่งที่ควรนำมาพิจารณาในการอ่านผล มี 2 ประการ คือ

- การเกิดสีเหลืองเนื่องจากการเจริญหรือการสร้างกรด
- ความเร็วในการปรากฏลักษณะดังกล่าว

1. ทำการอ่านผล 2 ครั้ง

1.1.1 Mesophile อ่านหลังจากบ่ม 24 และ 48 ชม.

1.1.2 Psychrophiles อ่านหลังจากบ่ม 48 และ 96 ชม.

1.1.3 Thermophile อ่านหลังจากบ่ม 24 ชม. ซึ่งบางทีอาจจะต้องอ่านผลที่ 3 หรือ 6 ชม. เนื่องจากอ่านผลที่ 24 ชม. อาจจะแปรผลได้ยาก

2. ผลการทดสอบที่เป็นบวกเกิดขึ้นเนื่องจาก phenol red ที่ใส่ในอาหารเกิดการเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลืองอันเนื่องมาจากสภาพความเป็นกรดในอาหารสำหรับ Esculin test (หลุมที่ 25) อาหารจะเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีดำ บางครั้งผล Positive อาจจะเปลี่ยนเป็น negative ได้ ในการอ่านผลครั้งที่ 2 เนื่องจากเกิดการผลิต ammonia จาก peptone ซึ่งมีผลให้อาหารเป็นกลาง ดังนั้น ให้บันทึกผลที่ได้เป็น positive

3. บันทึกผลในแผ่นบันทึกผล

4. การอ่านผลของ API 20E ให้อ่านตามคู่มือการอ่านผลของ API 20 E สำหรับการทดสอบปฏิกิริยา NIT ในช่องของ GLU test ให้อ่านผลหลังสุด

การแปรผล

ผลของ Biochemical Profile ที่ได้สามารถนำมา

1. แปรผลด้วย Software APILAB Plus
2. เป็นข้อมูลบันทึกลักษณะของเชื้อเพื่อดูลักษณะเฉพาะของเชื้อและเพื่อทำการเปรียบเทียบ
3. ใช้เป็นข้อมูลร่วมกับ Profile อื่น ๆในการศึกษาลักษณะทาง Taxonomy

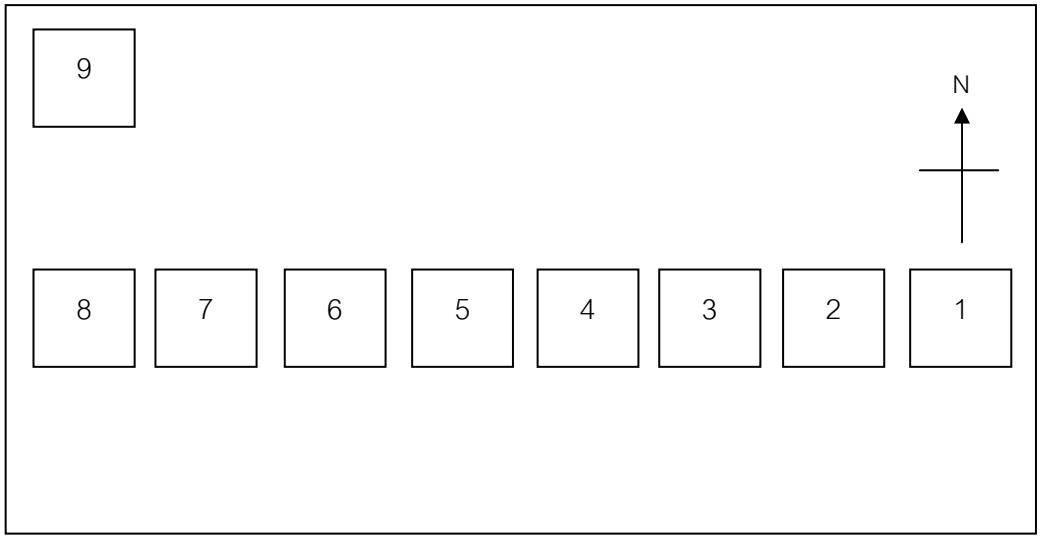
การจัดการอุปกรณ์หลังการใช้งาน

หลังจากทดสอบ Strip,ampoules ไม้พันสำลีและปิเปตทั้งหมดที่ใช้แล้วควรจะเผา autoclaveหรือจุ่มใน น้ำยาฆ่าเชื้อ

ภาคผนวก จ

ภาคผนวก จ

แผนภาพย่อส่วน ของบ่อ A ที่ใช้สำหรับการเลี้ยงกุ้งในกระชัง ในการเพาะเลี้ยงครั้งที่ 1



<u>การเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 1</u> 1. กลุ่มควบคุม ใช้บ่อหมายเลข 1, 5

2. กลุ่มที่ผสม *Bacillus* S11 ใช้บ่อหมายเลข 7, 8

3. กลุ่มที่ผสม *Bacillus* P11 ใช้บ่อหมายเลข 3, 6

4. กลุ่มที่ผสม *Bacillus* S11 ร่วมกับ *Bacillus* P11 ใช้บ่อหมายเลข 2, 4

<u>การเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 2</u> 1. กลุ่มควบคุม ใช้บ่อหมายเลข 1, 4, 7

2. กลุ่มที่ผสม *Bacillus* S11 ใช้บ่อหมายเลข 3, 8 ,9

3. กลุ่มที่ผสม *Bacillus* S11 ร่วมกับ *Bacillus* P11 ใช้บ่อหมายเลข 2, 5, 6

<u>หมายเหตุ</u> ไม่ได้เทียบอัตราส่วน

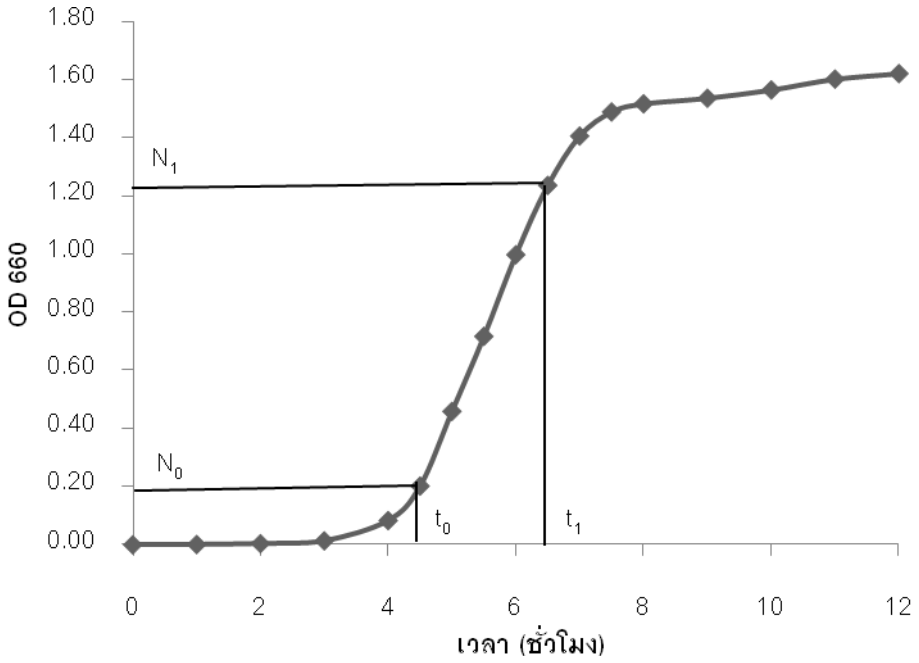
ภาคผนวก ฉ

ภาคผนวก ฉ

แสดงความสัมพันธุ์รัหว่างค่า OD 660 กับเวลา (ชั่วโมง) ของ *B. subtilis* S11 และ *B. subtilis* P11 ที่สภาวะต่าง ๆ

ตารางที่ 17 ค่า OD 660 กับเวลา (ชั่วโมง) ของ *B. subtilis* S11 ในอาหาร TSB

เวลา (ชั่วโมง)	OD 660			
	Flask 1	Flask 2	Flask 3	Average
0	0.000	0.000	0.000	0.000
1	0.002	0.001	0.000	0.001
2	0.005	0.004	0.003	0.004
3	0.011	0.018	0.012	0.014
4	0.094	0.083	0.073	0.083
4.5	0.247	0.195	0.163	0.202
5	0.561	0.482	0.332	0.458
5.5	0.787	0.737	0.624	0.716
6	1.061	1.036	0.892	0.996
6.5	1.263	1.272	1.169	1.235
7	1.422	1.431	1.360	1.404
7.5	1.474	1.495	1.492	1.487
8	1.486	1.514	1.545	1.515
9	1.526	1.532	1.545	1.534
10	1.553	1.575	1.560	1.563
11	1.578	1.629	1.592	1.600
12	1.612	1.641	1.603	1.619



รูปที่ 25 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD660 กับเวลา ของ *B. subtilis* S11 โดยแต่ละจุดเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ

นำค่า OD 660 ที่ชั่วโมง 6.5 และ 4.5 (mid log phase) มาหาค่า specific growth rate (μ)

จาก $\mu = (\ln N_1 - \ln N_0) / (t_1 - t_0)$

$= (\ln 1.235 - \ln 0.202) / (6.5 - 4.5)$

$= 1.811/2$

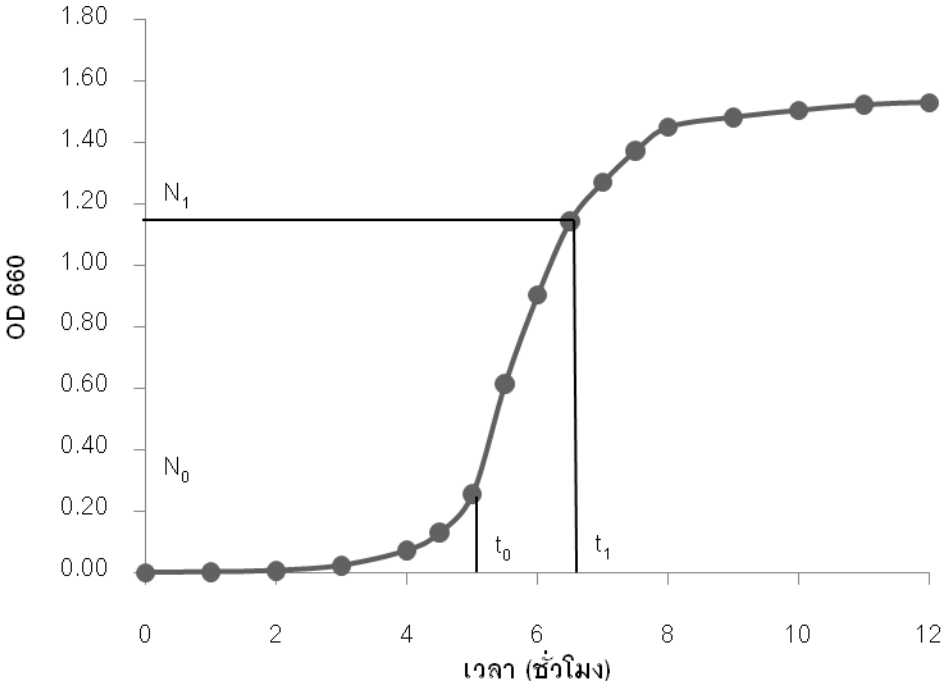
$= 0.905\ hr^{-1}$

$t = (\ln 2/\mu) \times 60$ (x60 เพื่อเปลี่ยนเป็นนาที)

$t = 45.95$ นาที

ตารางที่ 18 ค่า OD 660 กับเวลา (ชั่วโมง) ของ *B. subtilis* S11 ที่เติมด้วยส่วนน้ำใสของ *Bacillus* P11ในอาหาร TSB

เวลา (ชั่วโมง)	OD 660			
	Flask 1	Flask 2	Flask 3	Average
0	0.000	0.000	0.000	0.000
1	0.001	0.000	0.005	0.002
2	0.002	0.007	0.011	0.007
3	0.004	0.027	0.039	0.023
4	0.081	0.066	0.070	0.072
4.5	0.130	0.109	0.151	0.130
5	0.262	0.226	0.280	0.256
5.5	0.617	0.594	0.636	0.616
6	0.886	0.905	0.924	0.905
6.5	1.138	1.141	1.155	1.145
7	1.258	1.271	1.284	1.271
7.5	1.361	1.385	1.375	1.374
8	1.394	1.447	1.509	1.450
9	1.459	1.476	1.513	1.483
10	1.482	1.505	1.527	1.505
11	1.513	1.516	1.540	1.523
12	1.515	1.528	1.549	1.531



รูปที่ 26 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD660 กับเวลา ของ *B. subtilis* S11ที่เติมด้วยส่วนน้ำใสของ *Bacillus* P11 โดยแต่ละจุดเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ

นำค่า OD 660 ที่ชั่วโมง 6.5 และ 4.5 (mid log phase) มาหาค่า specific growth rate (μ)

จาก $\mu = (\ln N_1 - \ln N_0) / (t_1 - t_0)$

$= (\ln 1.145 - \ln 0.256) / (6.5 - 5)$

$= 1.498/2$

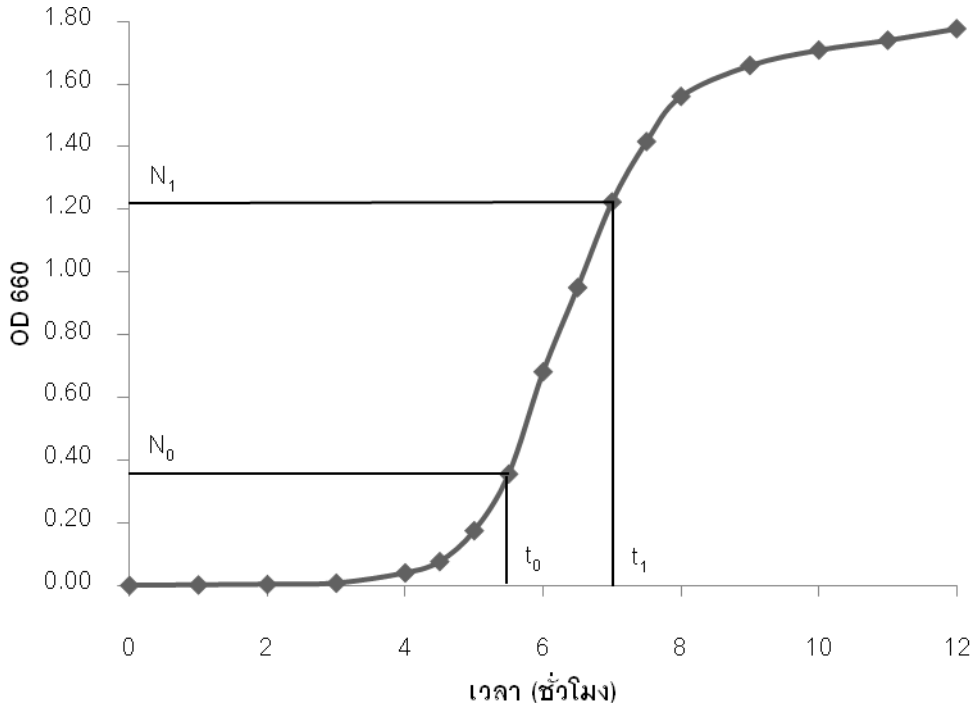
$= 0.749\ hr^{-1}$

$t = (\ln 2/\mu) \times 60$ (x60 เพื่อเปลี่ยนเป็นนาที)

$t = 55.52$ นาที

ตารางที่ 19 ค่า OD 660 กับเวลา (ชั่วโมง) ของ *B. subtilis* P11 ในอาหาร TSB

เวลา (ชั่วโมง)	OD 660			
	Flask 1	Flask 2	Flask 3	Average
0	0.000	0.000	0.000	0.000
1	0.001	0.002	0.002	0.002
2	0.003	0.005	0.002	0.003
3	0.005	0.012	0.005	0.007
4	0.036	0.050	0.034	0.040
4.5	0.070	0.074	0.085	0.076
5	0.187	0.146	0.191	0.175
5.5	0.384	0.292	0.390	0.355
6	0.709	0.640	0.696	0.682
6.5	0.976	0.905	0.970	0.950
7	1.242	1.205	1.224	1.224
7.5	1.457	1.386	1.406	1.416
8	1.518	1.573	1.590	1.560
9	1.672	1.657	1.648	1.659
10	1.710	1.692	1.723	1.708
11	1.747	1.721	1.751	1.740
12	1.796	1.748	1.785	1.776



รูปที่ 27 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD660 กับเวลา ของ *B. subtilis* P11 โดยแต่ละจุดเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ

นำค่า OD 660 ที่ชั่วโมง 7 และ 5.5 (mid log phase) มาหาค่า specific growth rate (μ)

จาก $\mu = (\ln N_1 - \ln N_0) / (t_1 - t_0)$

$= (\ln 1.224 - \ln 0.355) / (7 - 5.5)$

$= 1.238/1.5$

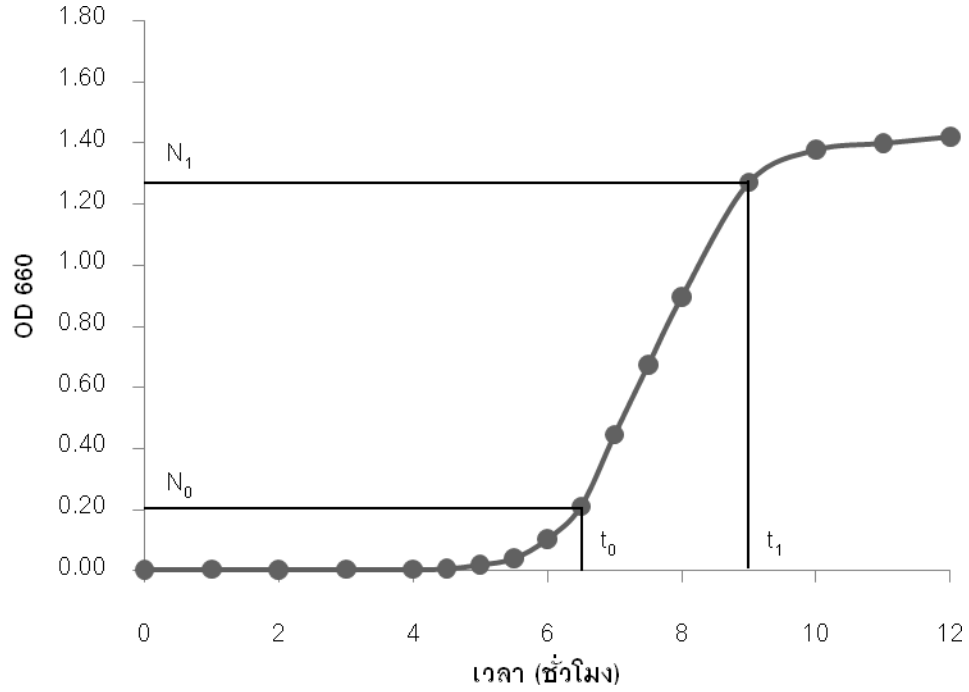
$= 0.825\ hr^{-1}$

$t = (\ln 2/\mu) \times 60$ (x60 เพื่อเปลี่ยนเป็นนาที)

$t = 50.41$ นาที

ตารางที่ 20 ค่า OD 660 กับเวลา (ชั่วโมง) ของ *B. subtilis* P11 ที่เติมด้วยส่วนน้ำใสของ *Bacillus* S11ในอาหาร TSB

เวลา (ชั่วโมง)	OD 660			
	Flask 1	Flask 2	Flask 3	Average
0	0.000	0.000	0.013	0.004
1	0.001	0.001	0.013	0.005
2	0.002	0.000	0.011	0.004
3	0.004	0.000	0.011	0.005
4	0.004	0.000	0.012	0.005
4.5	0.010	0.000	0.011	0.007
5	0.022	0.014	0.025	0.020
5.5	0.042	0.032	0.048	0.041
6	0.094	0.121	0.098	0.104
6.5	0.198	0.218	0.218	0.211
7	0.408	0.471	0.459	0.446
7.5	0.610	0.730	0.680	0.673
8	0.858	0.969	0.863	0.897
9	1.232	1.263	1.321	1.272
10	1.324	1.380	1.432	1.379
11	1.348	1.401	1.452	1.400
12	1.387	1.411	1.467	1.422



รูปที่ 28 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD660 กับเวลา ของ *B. subtilis* S11ที่เติมด้วยส่วนน้ำใสของ *Bacillus* P11 โดยแต่ละจุดเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ

นำค่า OD 660 ที่ชั่วโมง 9 และ 6.5 (mid log phase) มาหาค่า specific growth rate (μ)

จาก $\mu = (\ln N_1 - \ln N_0) / (t_1 - t_0)$

$= (\ln 1.272 - \ln 0.211) / (9 - 6.5)$

$= 1.796/2.5$

$= 0.718\ hr^{-1}$

$t = (\ln 2/\mu) \times 60$ (x60 เพื่อเปลี่ยนเป็นนาที)

$t = 57.92$ นาที

ภาคผนวก ซ

ภาคผนวก ช

ตารางแสดงผลการทดลอง

ตารางที่ 21 ผลน้ำหนักกุ้งขาว การทดลองครั้งที่ 1 (แสดงผลค่าเฉลี่ย ± SD)

กลุ่มทดลอง	น้ำหนัก (กรัม)		
	0 วัน	30 วัน	60 วัน
กลุ่มควบคุม	2.44 ± 0.52[a]	4.34 ± 0.78[a]	5.31 ± 0.68[a]
กลุ่มที่เสริม BS11	2.39 ± 0.54[a]	4.84 ± 0.58[b]	8.38 ± 2.32[b]
กลุ่มที่เสริม BP11	2.48 ± 0.52[a]	4.55 ± 0.73[a]	5.48 ± 0.88[a]
กลุ่มที่เสริม BS11&BP11	2.49 ± 0.49[a]	4.71 ± 0.71[a,b]	5.82 ± 0.90[a]

หมายเหตุ n= กุ้ง 50 ตัว

[a, b] แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองที่ความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 22 ผลน้ำหนักกุ้งขาว การทดลองครั้งที่ 2 (แสดงผลค่าเฉลี่ย ± SD)

กลุ่มทดลอง	น้ำหนัก (กรัม)			
	0 วัน	30 วัน	60 วัน	90 วัน
กลุ่มควบคุม	0.28 ± 0.09[a]	0.76 ± 0.09[a]	1.95 ± 0.14[a]	3.51 ± 0.20[a]
กลุ่มที่เสริม BS11	0.28 ± 0.08[a]	0.90 ± 0.10[b]	2.33 ± 0.18[c]	4.19 ± 0.19[c]
กลุ่มที่เสริม BS11&BP11	0.29 ± 0.09[a]	0.75 ± 0.10[a]	1.97 ± 0.17[b]	3.60 ± 0.20[b]

หมายเหตุ n= กุ้ง 90 ตัว

[a, b] แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองที่ความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 23 ผลน้ำหนักกุ้งขาวที่เพิ่มขึ้น การทดลองครั้งที่ 2 (แสดงผลค่าเฉลี่ย ± SD)

กลุ่มทดลอง	น้ำหนัก (กรัม)		
	30 วัน	60 วัน	90 วัน
กลุ่มควบคุม	0.48 ± 0.01[a]	1.19 ± 0.02[a]	1.56 ± 0.13[a]
กลุ่มที่เสริม BS11	0.62 ± 0.06[b]	1.43 ± 0.01[b]	1.86 ± 0.04[b]
กลุ่มที่เสริม BS11&BP11	0.46 ± 0.02[a]	1.22 ± 0.03[a]	1.63 ± 0.06[a]

หมายเหตุ n= 3 บ่อ

[a, b] แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองที่ความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 24 การรอดชีวิตของกุ้งขาวหลังจากทดลองครั้งที่ 1(แสดงผลค่าเฉลี่ย ± SD)

กลุ่มทดลอง	การรอดชีวิต (%)	
	30 วัน	60 วัน
กลุ่มควบคุม	90 ± 5.66[a]	66 ± 2.83[a]
กลุ่มที่เสริม BS11	93 ± 1.41[a]	82 ± 2.83[b]
กลุ่มที่เสริม BP11	93 ± 1.41[a]	65 ± 4.24[a]
กลุ่มที่เสริม BS11&BP11	89 ± 4.24[a]	77 ± 4.24[b]

หมายเหตุ n= 2 บ่อ

[a, b] แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองที่ความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 25 การรอดชีวิตของกุ้งขาวหลังจากทดลองครั้งที่ 2 (แสดงผลค่าเฉลี่ย ± SD)

กลุ่มทดลอง	การรอดชีวิต (%)		
	30 วัน	60 วัน	90 วัน
กลุ่มควบคุม	80.48 ± 2.18[a]	70.95 ± 2.18[a]	61.43 ± 2.86[a]
กลุ่มที่เสริม BS11	85.24 ± 4.36[a]	79.05 ± 2.18[a]	71.43 ± 2.86[b]
กลุ่มที่เสริม BS11&BP11	83.81 ± 5.95[a]	71.43 ± 2.86[a,b]	64.86 ± 5.24[b]

หมายเหตุ n= 3 บ่อ

[a, b] แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองที่ความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 26 การตายสะสมหลังทดสอบการชักนำให้เกิดโรค (challenge test) โดยการแช่ (immersion) *Vibrio harveyi* ในการทดลองครั้งที่ 1 (แสดงผลค่าเฉลี่ย ± SD)

กลุ่มทดลอง	การตายสะสม (%)				
	24 ชม.	48 ชม.	72 ชม.	96 ชม.	120 ชม.
กลุ่มควบคุม	25 ± 7.07	40 ± 7.07	55 ± 7.07	80 ± 7.07	100 ± 0.00
กลุ่มที่เสริม BS11	2.5 ± 3.54	10 ± 0.00	20 ± 0.00	27.5 ± 3.54	30 ± 7.07
กลุ่มที่เสริม BP11	15 ± 7.07	27.5 ± 10.61	42.5 ± 10.61	67.5 ± 3.54	85 ± 0.00
กลุ่มที่เสริม BS11&BP11	12.5 ± 0.00	25 ± 3.54	35 ± 7.07	52.5 ± 3.54	57.5 ± 3.54

หมายเหตุ n= 2 บ่อ

[a, b] แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองที่ความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 27 การตายสะสมหลังทดสอบการชักนำให้เกิดโรค (challenge test) โดยการแช่ (immersion) *Vibrio harveyi* ในการทดลองครั้งที่ 2 (แสดงผลค่าเฉลี่ย ± SD)

กลุ่มทดลอง	การตายสะสม (%)					
	12ชม.	24 ชม.	36 ชม.	48 ชม.	60 ชม.	72 ชม.
กลุ่มควบคุม	3.33 ± 5.77	13.33 ± 10.00	20.00 ± 10.00	30.00 ± 10.00	40.00 ± 5.77	53.33 ± 5.77[a]
กลุ่มที่เสริม BS11	0.00	0.00	0.00	3.33 ± 0.00	10.00 ± 5.77	23.33 ± 5.77[b]
กลุ่มที่เสริม BS11&BP11	3.33 ± 5.77	3.33 ± 5.77	6.67 ± 5.77	13.33 ± 10.00	10.00 ± 20.00	40.00 ± 10.00[a]

หมายเหตุ n= 3 บ่อ

[a, b] แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองที่ความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 28 ปริมาณแบคทีเรียในน้ำระหว่างการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวในการทดลองครั้งที่ 1 (แสดงผลค่าเฉลี่ย ± SD)

ชนิดแบคทีเรีย	กลุ่มทดลอง	ปริมาณแบคทีเรีย (CFU/ml)		
		0 วัน	30 วัน	60 วัน
แบคทีเรียทั้งหมด	กลุ่มควบคุม	$3.73 \pm 0.42 \times 10^3$	$6.70 \pm 1.14 \times 10^4$	$1.96 \pm 0.14 \times 10^4$
	กลุ่มที่เสริม BS11	$2.40 \pm 0.46 \times 10^3$	$1.23 \pm 0.19 \times 10^4$	$6.57 \pm 0.81 \times 10^3$
	กลุ่มที่เสริม BP11	$3.07 \pm 0.31 \times 10^3$	$7.10 \pm 2.36 \times 10^4$	$1.23 \pm 0.08 \times 10^4$
	กลุ่มที่เสริม BS11&BP11	$2.93 \pm 1.27 \times 10^3$	$4.33 \pm 0.70 \times 10^4$	$2.05 \pm 0.78 \times 10^4$
Bacillus S11	กลุ่มควบคุม	ND	ND	ND
	กลุ่มที่เสริม BS11	ND	$5.90 \pm 2.19 \times 10^3$	$5.27 \pm 1.00 \times 10^3$
	กลุ่มที่เสริม BP11	ND	ND	ND
	กลุ่มที่เสริม BS11&BP11	ND	$2.87 \pm 0.06 \times 10^3$	$1.57 \pm 0.57 \times 10^4$
Bacillus P11	กลุ่มควบคุม	ND	ND	ND
	กลุ่มที่เสริม BS11	ND	ND	ND
	กลุ่มที่เสริม BP11	ND	$2.60 \pm 2.60 \times 10^3$	$5.93 \pm 0.21 \times 10^3$
	กลุ่มที่เสริม BS11&BP11	ND	$5.30 \pm 3.10 \times 10^2$	$1.10 \pm 0.19 \times 10^3$
Vibrio spp.	กลุ่มควบคุม	$1.93 \pm 0.40 \times 10^2$	$1.31 \pm 0.11 \times 10^3$	$2.37 \pm 0.24 \times 10^3$
	กลุ่มที่เสริม BS11	$2.07 \pm 0.64 \times 10^2$	$1.06 \pm 0.12 \times 10^3$	$1.38 \pm 0.13 \times 10^3$
	กลุ่มที่เสริม BP11	$2.10 \pm 0.52 \times 10^2$	$1.45 \pm 0.18 \times 10^3$	$2.25 \pm 0.39 \times 10^3$
	กลุ่มที่เสริม BS11&BP11	$2.57 \pm 0.83 \times 10^2$	$1.47 \pm 0.15 \times 10^3$	$1.74 \pm 0.28 \times 10^3$

หมายเหตุ ND = not detected

ตารางที่ 29 ปริมาณแบคทีเรียในน้ำระหว่างการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวในการทดลองครั้งที่ 2 (แสดงผลค่าเฉลี่ย ± SD)

ชนิดแบคทีเรีย	กลุ่มทดลอง	ปริมาณแบคทีเรีย (CFU/ml)			
		0 วัน	30 วัน	60 วัน	90 วัน
แบคทีเรียทั้งหมด	กลุ่มควบคุม	$1.32 \pm 0.09 \times 10^4$	$1.95 \pm 0.08 \times 10^4$	$3.53 \pm 0.25 \times 10^4$	$4.50 \pm 0.62 \times 10^4$
	กลุ่มที่เสริม BS11	$1.56 \pm 0.20 \times 10^4$	$2.01 \pm 0.13 \times 10^4$	$4.50 \pm 0.17 \times 10^3$	$8.63 \pm 0.31 \times 10^4$
	กลุ่มที่เสริม BS11&BP11	$1.30 \pm 0.19 \times 10^4$	$2.04 \pm 0.19 \times 10^4$	$5.37 \pm 0.83 \times 10^4$	$8.80 \pm 0.66 \times 10^4$
Bacillus S11	กลุ่มควบคุม	ND	ND	ND	ND
	กลุ่มที่เสริม BS11	ND	$3.60 \pm 0.53 \times 10^3$	$1.37 \pm 0.07 \times 10^4$	$7.20 \pm 0.66 \times 104$
	กลุ่มที่เสริม BS11&BP11	ND	$6.00 \pm 3.61 \times 10^2$	$1.21 \pm 0.05 \times 10^4$	$1.27 \pm 0.25 \times 10^4$
Bacillus P11	กลุ่มควบคุม	ND	ND	ND	ND
	กลุ่มที่เสริม BS11	ND	ND	ND	ND
	กลุ่มที่เสริม BS11&BP11	ND	$< 10^2$	$1.20 \pm 0.20 \times 10^2$	$3.00 \pm 0.10 \times 10^3$
Vibrio spp.	กลุ่มควบคุม	$1.60 \pm 0.06 \times 10^3$	$6.20 \pm 0.46 \times 10^3$	$8.47 \pm 1.56 \times 10^3$	$2.70 \pm 0.07 \times 10^4$
	กลุ่มที่เสริม BS11	$1.36 \pm 0.11 \times 10^3$	$4.03 \pm 0.31 \times 10^3$	$5.93 \pm 0.55 \times 10^3$	$7.30 \pm 0.02 \times 10^3$
	กลุ่มที่เสริม BS11&BP11	$1.65 \pm 0.10 \times 10^3$	$7.13 \pm 1.86 \times 10^3$	$7.53 \pm 1.06 \times 10^3$	$9.80 \pm 1.10 \times 10^3$

หมายเหตุ ND = not detected

ตารางที่ 30 ปริมาณเลือดรวม (total hemocyte) และปริมาณเม็ดเลือดกรานูลาร์ (granular hemocyte) ก่อนและหลังเหนี่ยวนำให้เกิดโรคในการทดลองครั้งที่ 1

กลุ่มทดลอง	ปริมาณเม็ดเลือดรวม (x10^7 cell/ml)		ปริมาณเม็ดเลือดกรานูลาร์ (x10^7 cell/ml)	
	ก่อนเหนี่ยวนำให้เกิดโรค	หลังเหนี่ยวนำให้เกิดโรค	ก่อนเหนี่ยวนำให้เกิดโรค	หลังเหนี่ยวนำให้เกิดโรค
กลุ่มควบคุม	9.36 ± 2.92[a]	8.08 ± 2.13[a]	2.73 ± 1.08[a]	1.75 ± 0.79[a]
กลุ่มที่เสริม BS11	11.30 ± 3.19[b]	9.45 ± 3.82[b]	4.78 ± 1.52[b]	3.46 ± 2.98[b]
กลุ่มที่เสริม BP11	10.00 ± 2.68[a]	8.51 ± 3.76[a,b]	2.85 ± 1.46[a]	2.09 ± 1.53[a]
กลุ่มที่เสริม BS11&BP11	9.64 ± 5.12[a]	8.41 ± 1.95[a,b]	2.91 ± 1.78[a]	1.63 ± 0.58[a]

หมายเหตุ n= กุ้ง 9 ตัว

[a, b] แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองที่ความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 31 ปริมาณเลือดรวม (total hemocyte) และปริมาณเม็ดเลือดกรานูลาร์ (granular hemocyte) ก่อนและหลังเหนี่ยวนำให้เกิดโรคในการทดลองครั้งที่ 2

กลุ่มทดลอง	ปริมาณเม็ดเลือดรวม (x10^7 cell/ml)		ปริมาณเม็ดเลือดกรานูลาร์ (x10^7 cell/ml)	
	ก่อนเหนี่ยวนำให้เกิดโรค	หลังเหนี่ยวนำให้เกิดโรค	ก่อนเหนี่ยวนำให้เกิดโรค	หลังเหนี่ยวนำให้เกิดโรค
กลุ่มควบคุม	8.56 ± 3.78[a]	3.62 ± 2.26[a]	6.03 ± 2.54[a]	3.07 ± 1.79[a]
กลุ่มที่เสริม BS11	9.76 ± 3.41[b]	4.64 ± 2.14[b]	7.99 ± 2.80[b]	3.99 ± 2.22[b]
กลุ่มที่เสริม BS11&BP11	8.91 ± 2.86[a]	3.73 ± 1.88[a]	6.75 ± 2.17[a]	3.02 ± 1.14[a]

หมายเหตุ n= กุ้ง 9 ตัว

[a, b] แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองที่ความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 32 ปริมาณฟีนอลออกซิเดส (unit/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน) ก่อนและหลังเหนี่ยวนำให้เกิดโรคในการทดลองครั้งที่ 1

กลุ่มทดลอง	ปริมาณฟีนอลออกซิเดส (unit/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน)	
	ก่อนเหนี่ยวนำให้เกิดโรค	หลังเหนี่ยวนำให้เกิดโรค
กลุ่มควบคุม	2067.65 ± 706.25 [a]	1051.89 ± 192.56 [a]
กลุ่มที่เสริม BS11	4114.26 ± 719.64 [b]	2051.58 ± 753.42 [b]
กลุ่มที่เสริม BP11	2325.85 ± 1132.87 [a]	1050.41 ± 206.84 [a]
กลุ่มที่เสริม BS11&BP11	2355.21 ± 766.35 [a]	1376.28 ± 224.02 [a]

หมายเหตุ n= กุ้ง 9 ตัว

[a, b] แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองที่ความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 33 ปริมาณฟีนอลออกซิเดส (unit/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน) ก่อนและหลังเหนี่ยวนำให้เกิดโรคในการทดลองครั้งที่ 2

กลุ่มทดลอง	ปริมาณฟีนอลออกซิเดส (unit/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน)	
	ก่อนเหนี่ยวนำให้เกิดโรค	หลังเหนี่ยวนำให้เกิดโรค
กลุ่มควบคุม	1464.56 ± 831.28 [a]	1082.25 ± 360.17 [a]
กลุ่มที่เสริม BS11	2190.73 ± 531.89 [b]	1492.22 ± 404.28 [b]
กลุ่มที่เสริม BS11&BP11	1411.29 ± 763.67 [a]	1080.50 ± 383.98 [a]

หมายเหตุ n= กุ้ง 9 ตัว

[a, b] แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองที่ความเชื่อมั่น 95%

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายภัทรพงศ์ ทรัพย์เจริญ เกิดเมื่อวันที่ 21 มกราคม 2528 ที่จังหวัด กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2550 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรปริญญามหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2547

ประสบการณ์

ผู้ช่วยสอนวิชา Medical Bacterio และ Microbiology of Food

ผลงานวิจัย

Pattarapong Sapcharoen and Sirirat Rengpipat. 2010. Supplementation of *Bacillus* P11 and *Bacillus* S11 in pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* culture. In proceeding of the 22nd Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology "Biotechnology for Healthy Living", October 20-22, 2010, Prince of Songkla University, Trang Campus, Trang Province, Thailand