รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย การพัฒนาผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกรูปแบบใหม่เพื่อการควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรคและส่งเสริมการเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไม

(Development of novel commercial probiotic product for controlling pathogenic microorganisms and enhancing growth of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*))

นางสุบัณฑิต นิ่มรัตน์
นายวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย
นายปรินทร์ ชัยวิสุทธางกูร

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 256102A1080008
สัญญาเลขที่ 41/2561

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย การพัฒนาผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกรูปแบบใหม่เพื่อการควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรคและส่งเสริมการเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไม
(Development of novel commercial probiotic product for controlling pathogenic microorganisms and enhancing growth of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*))

นางสุบัณฑิต นิ่มรัตน์[1]
นายวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย[2]
นายปรินทร์ ชัยวิสุทธางกูร[3]

[1]ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
[2]ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
[3]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ตุลาคม 2561

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 41/2561

บทคัดย่อ

งานวิจัยเรื่อง “การพัฒนาผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกรูปแบบใหม่เพื่อการควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรคและส่งเสริมการเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไม” การศึกษาในปีที่ 2 นี้ได้ศึกษาถึงผลของแบคทีเรียโพรไบโอติกผสม (*Bacillus* sp. สายพันธุ์ BUU 001, BUU 002, BUU 003, BUU 004 และ BUU 005) ในรูปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งและรูปไมโครแคปซูลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางกายภาพและเคมีของน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในบ่อเพาะเลี้ยงจำลอง ได้แก่ ความขุ่น ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ อุณหภูมิ ความเค็ม แอมโมเนีย ไนไทรต์ ไนเทรตและฟอสเฟต และต่อการเปลี่ยนแปลงของสัดส่วนแบคทีเรียชนิดต่างๆ ใน Hepatopancreas-Intestine และน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม ตลอดระยะเวลา 30 วันหลังการเติมแบคทีเรียโพรไบโอติกและระหว่างการทดสอบการต้านทานแบคทีเรียก่อโรคด้วยการเติม *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 002 เป็นระยะเวลา 10 วัน จากการศึกษาพบว่าแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งและรูปไมโครแคปซูลมีประสิทธิภาพเท่าเทียมกันในด้านการควบคุมคุณภาพน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมระยะวัยอ่อน (โพสลาวา 30) โดยเฉพาะอย่างยิ่งการลดปริมาณแอมโมเนียและไนไทรต์ให้มีค่าน้อยกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) สำหรับอัตราส่วนของ *Bacillus* ต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดใน Hepatopancreas-Intestine ของกุ้งขาวแวนนาไมในช่วงก่อนและหลังทดสอบความต้านทานโรคที่เกิดจาก *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 แสดงให้เห็นว่า *Bacillus* โพรไบโอติกผสมทั้ง 2 รูปแบบสามารถรอดชีวิตและเจริญใน Hepatopancreas-Intestine ของกุ้งขาวแวนนาไมได้ ส่งผลให้อัตราส่วนของ *Bacillus* ต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในอวัยวะดังกล่าวของกุ้งขาวแวนนาไมของทั้ง 2 ชุดการทดลองเพิ่มขึ้น ส่วนชนิดของแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ใน Hepatopancreas-Intestine ของกุ้งขาวแวนนาไมในช่วง 30 วันก่อนการทดสอบความต้านทานแบคทีเรียก่อโรคจำแนกได้ 5 ชนิด ได้แก่ *Vibrio campbellii* LV 33, *V. diabolicus* LV 34, *Vibrio* sp. LV 35, *Vibrio* sp. LV 36 และ *Vibrio* sp. LV 37 โดยแบคทีเรียชนิดเด่นที่พบของทั้ง 3 ชุดการทดลอง ตลอดระยะเวลาการทดลอง 30 วัน คือ *Vibrio* sp. LV 36 (20.00 -25.00%), *V. diabolicus* LV 34 (18.87-23.47%), *Vibrio* sp. LV 37 (14.29-22.64%), *V. campbellii* LV 33 (15.09-21.43%) และ *Vibrio* sp. LV 35 (15.31 - 18.87%) ตามลำดับ เมื่อเติม *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ลงในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมพบว่า แบคทีเรียก่อโรคชนิดนี้กลายเป็นแบคทีเรียเด่นที่พบได้มาก (51.79-59.38%) ใน Hepatopancreas-Intestine ของกุ้งขาวแวนนาไมภายใน 2 ชั่วโมงหลังการเติมแบคทีเรียก่อโรค แต่อย่างไรก็ตามสัดส่วนของ *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ในชุดที่เติมโพรไบโอติกทั้ง 2 ชุด มีปริมาณน้อยกว่าในชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) การศึกษาในครั้งนี้สรุปได้ว่าการเติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมในรูปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งและรูปไมโครแคปซูลสามารถลดปริมาณแอมโมเนียและไนไทรต์ในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม รวมทั้งสามารถเพิ่มสัดส่วนของ *Bacillus* และลดปริมาณแบคทีเรียก่อโรค คือ *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ใน Hepatopancreas-Intestine ของกุ้งขาวแวนนาไมได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ: โพรไบโอติก, แบคทีเรียก่อโรค, กุ้งขาวแวนนาไม, ไมโครแคปซูล

ABSTRACT

This research work entitled “Development of novel commercial probiotic product for controlling pathogenic microorganisms and enhancing growth of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)” in the second year of study focused on effects of bacteria probiotics mixtures (*Bacillus* strain BUU 001, BUU 002, BUU 003, BUU 004 and BUU 005) in forms of freeze-dried and microencapsulated products on alteration in physical and chemical qualities of culture water in simulated shrimp ponds e.g. turbidity, pH, dissolved oxygen, temperature, salinity, ammonia, nitrite, nitrate and phosphate as well as on change in selected bacterial ratios in hepatopancreas-intestine and culture water of post-larval *L. vannamei* throughout 30 days after bacteria probiotics administration and during pathogenic *V. harveyi* strain 002 challenge for 10 days. Administration of freeze-dried mixed bacteria probiotics was as effective as microencapsulated bacteria probiotics route in terms of controlling water quality in culture water of post-larval *L. vannamei* (post-larvae 30), especially significant reduction (p<0.05) in ammonia and nitrite concentrations, compared with those of the controls. In case of *Bacillus*/total heterotrophic bacteria number ratio in hepatopancreas-intestine of post-larval *L. vannamei* before and after pathogenic resistance test, *Bacillus* in the both forms were able to survive and grow in hepatopancreas-intestine of *L. vannamei* leading to increase in *Bacillus*/total heterotrophic bacteria number ratio in this shrimp organ in the two treatments. Vibrionaceae genera in hepatopancreas-intestine of *L. vannamei* before pathogenic *V. harveyi* challenge could be identified as 5 species i.g. *Vibrio campbellii* LV 33, *V. diabolicus* LV 34, *Vibrio* sp. LV 35, *Vibrio* sp. LV 36 and *Vibrio* sp. LV 37. Predominant Vibrionaceae genera frequently found in hepatopancreas-intestine of *L. vannamei* of all treatments throughout 30-days monitoring were *Vibrio* sp. LV 36 (20.00-25.00%), *Vibrio diabolicus* LV 34 (18.87-23.47%), *Vibrio* sp. LV 37 (14.29-22.64%), *Vibrio campbellii* LV 33 (15.09-21.43%) and *Vibrio* sp. LV 35 (15.31-18.87%), respectively. Addition of *V. harveyi* strain 002 in culture water of *L. vannamei* resulted in *V. harveyi* predominance (51.79-59.38%) in hepatopancreas-intestine of *L. vannamei* within 2 h post-challenging. However, ratios of *V. harveyi* strain 002 in *L. vannamei* of both treatments supplemented with the probiotics were significantly (p<0.05) lower than that of the control. This study could be concluded that bacteria probiotics mixtures in forms of freeze-dried and microencapsulated products were effectively capable of reducing ammonia and nitrite concentration in culture water of *L. vannamei* and also increasing *Bacillus* ratio and minimizing pathogenic *V. harveyi* strain 002 in hepatopancreas-intestine of *L. vannamei.*

Keywords: Probiotics, Pathogenic bacteria, Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*), Microencapsulation

สารบัญ

		หน้า
กิตติกรรมประกาศ		I
บทคัดย่อ		II
Abstract		III
สารบัญ		IV
สารบัญตาราง		V
สารบัญภาพ		VI
บทที่		
1	บทนำ	1
2	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	7
3	วิธีดำเนินงานวิจัย	23
4	ผลการทดลอง	33
5	สรุปและอภิปรายผลการทดลอง	91
เอกสารอ้างอิง		97
ผลผลิต (Output)		107
ประวัติคณะผู้วิจัย		108

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	อวัยวะและโครงสร้างและหน้าที่ของกุ้งขาว.....	8
2	ผลกระทบของค่าความเป็นกรด-ด่างต่อกุ้ง.....	12
3	ร้อยละของไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างต่างกันที่อุณหภูมิ 25 องศา-เซลเซียส.....	13
4	หน้าที่ของเซลล์เม็ดเลือดกุ้ง.....	17
5	คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่นำมาจัดจำแนกทั้ง 13 ไอโซเลท.....	52
6	คุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 1, 6 และ 7.....	53
7	คุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 2.....	54
8	คุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 3.....	55
9	คุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 4 และ 5.....	56
10	คุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 8-13.....	57
11	ชนิดของแบคทีเรียที่จัดจำแนกได้จาก Hepatopancreas-Intestine และน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมโดยวิธีทางชีวโมเลกุล.....	60
12	อัตราส่วนของ *Bacillus* ต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดใน Hepatopancreas-Intestine ของกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 30 ในช่วงก่อนและหลังการทดสอบความต้านทานโรคที่เกิดจาก *V. harveyi* สายพันธุ์ 002	69
13	อัตราส่วนของ *Bacillus* ต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม ระยะโพสลาวา 30 ในช่วงก่อนและหลังการทดสอบความต้านทานโรคที่เกิดจาก *V. harveyi* สายพันธุ์ 002.....	72

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะของกุ้งขาวแวนนาไม.....	7
2	การใช้ประโยชน์จากโพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ.....	15
3	(ก) เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR Thermal cycle) (ข) เครื่อง UV-transilluminator.....	30
4	ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 30 ในช่วงก่อนและหลังการทดสอบความต้านทานต่อแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ณ เวลา 5.00 น. และเวลา 14.00 น.....	34
5	ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 30 ในช่วงก่อนและหลังการทดสอบความต้านทานต่อแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ณ เวลา 5.00 น. และเวลา 14.00 น.....	36
6	ค่าความขุ่นของน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 30 ในช่วงก่อนและหลังการทดสอบความต้านทานต่อแบคทีเรียก่อโรคจาก *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ณ เวลา 5.00 น. และเวลา 14.00 น.....	38
7	อุณหภูมิของน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 30 ในช่วงก่อนและหลังการทดสอบความต้านทานต่อแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ณ เวลา 5.00 น. และเวลา 14.00 น.....	40
8	ปริมาณแอมโมเนียในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 30 ในช่วงก่อนและหลังการทดสอบความต้านทานต่อแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ณ เวลา 5.00 น. และเวลา 14.00 น.....	43
9	ปริมาณไนไทรต์ในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 30 ในช่วงก่อนและหลังการทดสอบความต้านทานต่อแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ณ เวลา 5.00 น. และเวลา 14.00 น.....	46
10	ปริมาณไนเทรตในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 30 ในช่วงก่อนและหลังการทดสอบความต้านทานต่อแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ณ เวลา 5.00 น. และเวลา 14.00 น.....	49
11	ปริมาณฟอสเฟตในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 30 ในช่วงก่อนและหลังการทดสอบความต้านทานต่อแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ณ เวลา 5.00 น. และเวลา 14.00 น.....	51

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
12	วงศ์วานวิวัฒนาการบนพื้นฐานของยีน 16S rRNA ของ *Microbacterium koreense* LV 28 ซึ่งสร้างแผนภาพสายสัมพันธ์ทางวงศ์วานวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ด้วยเทคนิค Distance-based methods แบบ Neighbor-joining โดยวิเคราะห์หาค่า Bootstrap จำนวน 1,000 ครั้ง (แสดงค่า Bootstrap ที่มีค่า ≥50% เท่านั้น) และใช้ *Phycicola gilvus* SSWW-21^{T} เป็น Outgroup เส้นสเกลแสดงถึงระยะห่างทางวิวัฒนาการมีค่าเท่ากับ 0.005.....	61
13	วงศ์วานวิวัฒนาการบนพื้นฐานของยีน 16S rRNA ของ *Tamlana crocina* LV 32 ซึ่งสร้างแผนภาพสายสัมพันธ์ทางวงศ์วานวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ด้วยเทคนิค Distance-based methods แบบ Neighbor-joining โดยวิเคราะห์หาค่า Bootstrap จำนวน 1,000 ครั้ง (แสดงค่า Bootstrap ที่มีค่า ≥50% เท่านั้น) และใช้ *Dokdonia diaphora* MSKK-32^{T} เป็น Outgroup เส้นสเกลแสดงถึงระยะห่างทางวิวัฒนาการมีค่าเท่ากับ 0.01.....	61
14	วงศ์วานวิวัฒนาการบนพื้นฐานของยีน 16S rRNA ของ *Shewanella* sp. LV29 ซึ่งสร้างแผนภาพสายสัมพันธ์ทางวงศ์วานวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) เทคนิค Character-based methods วิธีแมกซิมัมลค์ลิฮูด (Maximum likelihood) โดยวิเคราะห์หาค่า Bootstrap จำนวน 100 ครั้ง (แสดงค่า Bootstrap ที่มีค่า≥50% เท่านั้น) และใช้ *Oceanisphaera litoralis* DSM 15406^{T} เป็น Outgroup เส้นสเกลแสดงถึงระยะห่างทางวิวัฒนาการมีค่าเท่ากับ 0.04.....	62
15	วงศ์วานวิวัฒนาการบนพื้นฐานของยีน 16S rRNA ของ *Staphylococcus haemolyticus* LV 31 ซึ่งสร้างแผนภาพสายสัมพันธ์ทางวงศ์วานวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ด้วยเทคนิค Distance-based methods แบบ Neighbor-joining โดยวิเคราะห์หาค่า Bootstrap จำนวน 1,000 ครั้ง (แสดงค่า Bootstrap ที่มีค่า ≥50% เท่านั้น) และใช้ *Macrococcus lamae* CCM 4815^{T} เป็น Outgroup เส้นสเกลแสดงถึงระยะห่างทางวิวัฒนาการมีค่าเท่ากับ 0.005.....	62
16	วงศ์วานวิวัฒนาการบนพื้นฐานของยีน 16S rRNA ของ *Staphylococcus arlettae* LV 30 ซึ่งสร้างแผนภาพสายสัมพันธ์ทางวงศ์วานวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ด้วยเทคนิค Distance-based methods แบบ Neighbor-joining โดยวิเคราะห์หาค่า Bootstrap จำนวน 1,000 ครั้ง (แสดงค่า Bootstrap ที่มีค่า ≥50% เท่านั้น) และใช้ *Macrococcus lamae* CCM 4815^{T} เป็น Outgroup เส้นสเกลแสดงถึงระยะห่างทางวิวัฒนาการมีค่าเท่ากับ 0.005.....	63

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
17	วงศ์วานวิวัฒนาการบนพื้นฐานของยีน 16S rRNA ของ *Bacillus aryabhattai* LV 26 ซึ่งสร้างแผนภาพสายสัมพันธ์ทางวงศ์วานวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ด้วยเทคนิค Distance-based methods แบบ Neighbor-joining โดยวิเคราะห์หาค่า Bootstrap จำนวน 1,000 ครั้ง (แสดงค่า Bootstrap ที่มีค่า ≥50% เท่านั้น) และใช้ *Anaerobacillus alkalilacustris* Z-0521^{T} เป็น Outgroup เส้นสเกลแสดงถึงระยะห่างทางวิวัฒนาการมีค่าเท่ากับ 0.01.....	63
18	วงศ์วานวิวัฒนาการบนพื้นฐานของยีน 16S rRNA ของ *Halobacillus kuroshimensis* LV 27 ซึ่งสร้างแผนภาพสายสัมพันธ์ทางวงศ์วานวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ด้วยเทคนิค Distance-based methods แบบ Neighbor-joining โดยวิเคราะห์หาค่า Bootstrap จำนวน 1,000 ครั้ง (แสดงค่า Bootstrap ที่มีค่า ≥50% เท่านั้น) และใช้ *Oceanobacillus iheyensis* HTE831^{T} เป็น Outgroup เส้นสเกลแสดงถึงระยะห่างทางวิวัฒนาการมีค่าเท่ากับ 0.01.....	64
19	วงศ์วานวิวัฒนาการบนพื้นฐานของยีน 16S rRNA ของ *Vibrio* sp. LV 35 ซึ่งสร้างแผนภาพสายสัมพันธ์ทางวงศ์วานวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ด้วยเทคนิค Distance-based methods แบบ Neighbor-joining โดยวิเคราะห์หาค่า Bootstrap จำนวน 1,000 ครั้ง (แสดงค่า Bootstrap ที่มีค่า ≥50% เท่านั้น) และใช้ *Photobacterium rosenbergii* LMG 22223^{T} เป็น Outgroup เส้นสเกลแสดงถึงระยะห่างทางวิวัฒนาการมีค่าเท่ากับ 0.005.....	64
20	วงศ์วานวิวัฒนาการบนพื้นฐานของยีน 16S rRNA ของ *Vibrio diabolicus* LV 34 ซึ่งสร้างแผนภาพสายสัมพันธ์ทางวงศ์วานวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ด้วยเทคนิค Distance-based methods แบบ Neighbor-joining โดยวิเคราะห์หาค่า Bootstrap จำนวน 1,000 ครั้ง (แสดงค่า Bootstrap ที่มีค่า ≥50% เท่านั้น) และใช้ *Grimontia hollisaei* CIP 101886^{T} เป็น Outgroup เส้นสเกลแสดงถึงระยะห่างทางวิวัฒนาการมีค่าเท่ากับ 0.01.....	65
21	วงศ์วานวิวัฒนาการบนพื้นฐานของยีน 16S rRNA ของ *Vibrio* sp. LV 37 ซึ่งสร้างแผนภาพสายสัมพันธ์ทางวงศ์วานวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ด้วยเทคนิค Distance-based methods แบบ Neighbor-joining โดยวิเคราะห์หาค่า Bootstrap จำนวน 1,000 ครั้ง (แสดงค่า Bootstrap ที่มีค่า ≥50% เท่านั้น) และใช้ *Photobacterium lutimaris* DF-42^{T} เป็น Outgroup เส้นสเกลแสดงถึงระยะห่างทางวิวัฒนาการมีค่าเท่ากับ 0.005.....	65

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
22	วงศ์วานวิวัฒนาการบนพื้นฐานของยีน 16S rRNA ของ *Vibrio* sp. LV 36 ซึ่งสร้างแผนภาพสายสัมพันธ์ทางวงศ์วานวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ด้วยเทคนิค Distance-based methods แบบ Neighbor-joining โดยวิเคราะห์หาค่า Bootstrap จำนวน 1,000 ครั้ง (แสดงค่า Bootstrap ที่มีค่า ≥50% เท่านั้น) และใช้ *Photobacterium halotolerans* MACL01^{T} เป็น Outgroup เส้นสเกลแสดงถึงระยะห่างทางวิวัฒนาการมีค่าเท่ากับ 0.005	66
23	วงศ์วานวิวัฒนาการบนพื้นฐานของยีน 16S rRNA ของ *Vibrio campbellii* LV 33 ซึ่งสร้างแผนภาพสายสัมพันธ์ทางวงศ์วานวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ด้วยเทคนิค Distance-based methods แบบ Neighbor-joining โดยวิเคราะห์หาค่า Bootstrap จำนวน 1,000 ครั้ง (แสดงค่า Bootstrap ที่มีค่า ≥50% เท่านั้น) และใช้ *Photobacterium swingsii* CAIM 1393^{T} เป็น Outgroup เส้นสเกลแสดงถึงระยะห่างทางวิวัฒนาการมีค่าเท่ากับ 0.005	66
24	สัดส่วนและชนิดของแบคทีเรียทางทะเลใน Hepatopancreas-Intestine ของกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 30 ก่อนการทดสอบความต้านทานต่อแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* สายพันธุ์ 002	75
25	สัดส่วนและชนิดของแบคทีเรียทางทะเลใน Hepatopancreas-Intestine ของกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 30 หลังทดสอบความต้านทานต่อแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* สายพันธุ์ 002	76
26	สัดส่วนและชนิดของแบคทีเรียทางทะเลในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 30 ก่อนทดสอบความต้านทานต่อแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* สายพันธุ์ 002	78
27	สัดส่วนและชนิดของแบคทีเรียทางทะเลในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมหลังทดสอบความต้านทานต่อแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* สายพันธุ์ 002	79
28	สัดส่วนและชนิดของแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ใน Hepatopancreas-Intestineของกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 30 บนอาหาร TCBS agar ก่อนทดสอบความต้านทานต่อแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* สายพันธุ์ 002	81
29	สัดส่วนและชนิดของแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ใน Hepatopancreas-Inteastine ของกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 30 บนอาหาร TCBS agar หลังทดสอบความต้านทานต่อแบคทีเรียก่อโรคจาก *V. harveyi*สายพันธุ์ 002	82
30	สัดส่วนและชนิดของแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 30 บนอาหาร TCBS agar ก่อนทดสอบความต้านทานต่อแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* สายพันธุ์ 002	83

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
31	สัดส่วนและชนิดของแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ในน้ำที่ใช้เพาะลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 30 บนอาหาร TCBS agar หลังทดสอบความต้านทานต่อแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* สายพันธุ์ 002.....	84
32	สัดส่วนของ *V. harveyi* และแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ใน Hepatopancreas-Intestine ของกุ้งขาวแวนนาไมบนอาหาร VHA ก่อนทดสอบความต้านทานต่อแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* สายพันธุ์ 002.....	86
33	สัดส่วนของ *V. harveyi* และแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ชนิดอื่น ๆ ที่ไม่ใช่ *V. harveyi* ใน Hepatopancreas ของกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 30 บนอาหาร VHA หลังทดสอบความต้านทานต่อแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* สายพันธุ์ 002.....	87
34	สัดส่วนของ *V. harveyi* และแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมบนอาหาร VHA ก่อนทดสอบความต้านทานแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* สายพันธุ์ 002.....	89
35	สัดส่วนของ *V. harveyi* และแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ชนิดอื่น ๆ ที่ไม่ใช่ *V. harveyi* ในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 30 บนอาหาร VHA หลังทดสอบความต้านทานต่อแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* สายพันธุ์ 002....	90

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ในประเทศไทยสินค้าส่งออกที่สำคัญชนิดหนึ่ง ได้แก่ กุ้งทะเล ซึ่งในช่วง 5-10 ปีที่ผ่านมาพบว่ากุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) เป็นสินค้าส่งออกอันดับหนึ่ง (Boonthai et al., 2011) แต่ปัญหาที่เกิดขึ้นกับการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำคือ ประสบปัญหาโรคระบาดที่เกิดจากไวรัสและแบคทีเรีย (Austin and Zhang, 2006; Flegel, 2006) ดังนั้นในปัจจุบันกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) จึงเป็นกุ้งทะเลที่นิยมเพาะเลี้ยงเพื่อมาทดแทนกุ้งกุลาดำ เนื่องจากกุ้งขาวแวนนาไมเจริญเติบโตได้เร็ว ปรับตัวให้เข้ากับสภาพการเลี้ยงแบบหนาแน่นได้ดี และทนทานต่อการเกิดโรคได้ดีกว่ากุ้งกุลาดำ (Wyban, 2007) นอกจากนี้กุ้งขาวแวนนาไมยังต้องการอาหารที่มีโปรตีนต่ำและสามารถใช้อาหารตามธรรมชาติที่มีอยู่ในบ่อเพาะเลี้ยงได้อย่างมีประสิทธิภาพ รวมทั้งมีอัตราแลกเนื้อต่ำทำให้มีเปอร์เซ็นต์เนื้อสูงซึ่งช่วยให้เกษตรกรประหยัดต้นทุนในการเพาะเลี้ยง (FAO, 2004)

เนื่องจากการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในประเทศไทยนิยมเลี้ยงแบบระบบหนาแน่น (Rosenberry, 1996) ซึ่งทำให้ได้ผลผลิตของกุ้งขาวแวนนาไมในปริมาณมาก และสร้างรายได้ให้กับเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งได้เป็นอย่างดี แต่จุดด้อยของการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในระบบดังกล่าว คือไม่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำในบ่อเพาะเลี้ยง ดังนั้นอาจทำให้เกิดการสะสมของอาหารที่เหลือจากการกินของกุ้งขาวแวนนาไม รวมทั้งของเสียที่กุ้งขับถ่ายออกมา และเกิดการสะสมอยู่ภายในบ่อเลี้ยง (Jackson et al., 2003; Trott and Alongi, 2000; Ziemann et al., 1992) ส่งผลกระทบต่อคุณภาพน้ำในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม ทำให้คุณภาพน้ำเสื่อมโทรมลงตามระยะเวลาของการเพาะเลี้ยง จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้กุ้งขาวแวนนาไมเจริญเติบโตได้ไม่ดี ระบบภูมิต้านทานโรคของกุ้งขาวแวนนาไมลดลง กุ้งขาวแวนนาไมจึงอ่อนแอเป็นโรคได้ง่าย และมีอัตราการรอดชีวิตต่ำ หากเกษตรกรมีการจัดการด้านการเลี้ยงไม่ดีพอก็จะประสบกับปัญหากุ้งเป็นโรคและตายได้ สาเหตุที่สำคัญอย่างหนึ่ง คือ การเกิดโรคจากแบคทีเรียโดยเฉพาะแบคทีเรียสกุลวิบริโอ (Lavilla-Pitago et al., 1998; Vandenberghe et al., 1998) ซึ่งจำเป็นที่จะต้องมีการวิจัยแบบบูรณาการเพื่อศึกษาวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันการเกิดโรคติดเชื้อที่ทำให้ลูกกุ้งขาวแวนนาไมตายอย่างเฉียบพลัน

ด้วยเหตุดังกล่าวเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมจึงนิยมแก้ปัญหาโดยการใช้ยาปฏิชีวนะ ซึ่งหากใช้ยาดังกล่าวไม่ถูกวิธีอาจนำไปสู่การดื้อต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียก่อโรค (Skjermo and Vadstein, 1999) และยังก่อให้เกิดการปนเปื้อนของยาปฏิชีวนะในเนื้อกุ้งและสิ่งแวดล้อมอีกด้วย (Holmstrom et al., 2003) โดยแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะอาจแพร่กระจายโดยตรงไปยังตัวกุ้งขาวแวนนาไม และทำให้ผู้ที่บริโภคกุ้งขาวแวนนาไมได้รับแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ อาจส่งผลให้เกิดอุบัติการณ์ของแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะในประชากรมนุษย์ รวมทั้งแบคทีเรียก่อโรคที่มียีนดื้อยาปฏิชีวนะ ยังสามารถถ่ายทอดยีนดื้อยาไปยังแบคทีเรียชนิดอื่นในระบบเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (Caprioli et al., 2000; Gatesoupe, 1999; Gullian et al., 2004; Itami et al., 1998; Kautsky et al., 2000; Verschuere et al., 2000)

ดังนั้นในหลาย ๆ ประเทศจึงได้มีการห้ามใช้ยาปฏิชีวนะ เช่น คลอแรมเฟนิคอล (FAO, 2002) ซึ่งตรวจพบว่ามีการปนเปื้อนในกุ้งจากประเทศพม่า อินเดีย ปากีสถาน เวียดนาม รวมทั้งประเทศไทย โดยกลุ่มสหภาพยุโรปซึ่งเป็นตลาดที่รับซื้อกุ้งขาวแวนนาไมจากประเทศไทยที่ใหญ่ที่สุดแห่งหนึ่ง ห้ามนำเข้ากุ้งขาวแวนนาไมที่ปนเปื้อนยาปฏิชีวนะ ส่งผลให้ผลิตภัณฑ์กุ้งขาวแวนนาไมจากหลายประเทศไม่สามารถส่งออกได้ จากข้อกำหนดที่เข้มงวดดังกล่าว ทำให้เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งขาว-แวนนาไมในประเทศไทยตระหนักถึงผลกระทบที่อาจเกิดขึ้นกับการส่งออกกุ้งขาวแวนนาไมของประเทศไทย จากสาเหตุข้างต้นทำให้เกษตรกรที่เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมหันมาสนใจการใช้โพรไบโอติก ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิต มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโต กระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม และต่อต้านแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งขาวแวนนาไมได้ (Balcazar et al., 2006)

ปัจจุบันการนำโพรไบโอติกมาใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวาง (Gomez-Gil et al., 2000; Irianto and Austin, 2002; Sharma and Bhukhar, 2000) ซึ่งโพรไบโอติกที่นำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของเอนไซม์ในการย่อยอาหาร ช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ช่วยยับยั้งเชื้อก่อโรค ส่งผลให้สัตว์น้ำมีการเจริญเติบโตและการรอดชีวิตเพิ่มสูงขึ้น รวมทั้งช่วยปรับปรุงคุณภาพน้ำและบำบัดขี้เลนในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอีกด้วย (Balcazar et al., 2006; Nimrat et al., 2008; 2011; 2012; Utiswannakul et al., 2011) จากการนำโพรไบโอติกมาใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้งพบว่าสามารถช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของกุ้ง ทำให้กุ้งมีความต้านทานโรคเพิ่มมากขึ้น และช่วยปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร จึงช่วยเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตและอัตราการรอดชีวิตของกุ้ง รวมทั้งช่วยลดการใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะในการเพาะเลี้ยงกุ้งทำให้การเพาะเลี้ยงกุ้งมีความยั่งยืนและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม (Balcazar et al., 2006; Boonthai et al., 2011; Far et al., 2009; Nimrat 2011; 2012; Sahu et al., 2008; Tseng et al., 2009) ซึ่งแนวทางการใช้โพรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในประเทศไทยมีการใช้อย่างแพร่หลาย แต่ประสิทธิภาพหรือความสำเร็จในการใช้ก็แตกต่างกันไปในหลายพื้นที่ เนื่องจากมีสภาพแวดล้อมหลายปัจจัยมีความเกี่ยวข้องกัน ซึ่งการวิจัยเชิงลึกแบบบูรณาการของรูปแบบการใช้โพรไบโอติกที่เหมาะสมจะช่วยให้ทราบแนวทางที่ชัดเจนของการใช้โพรไบโอติก ซึ่งสามารถนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวเชิงพาณิชย์ได้ต่อไป

แบคทีเรียโพรไบโอติกที่นำมาใช้มากในอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คือ แบคทีเรียสกุล *Bacillus* sp. (Keysami et al., 2007; Moriarty, 1998; 1999; Rengpipat et al., 1998; Ziaei-Nejad et al., 2006) เนื่องจากสามารถหลั่งเอนไซม์หลายชนิดออกมาช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยและการดูดซึมสารอาหาร กระตุ้นภูมิคุ้มกัน ยับยั้งเชื้อก่อโรคและช่วยในการปรับปรุงคุณภาพน้ำในบ่อเพาะเลี้ยง (Boonthai et al., 2011; Liu et al., 2009; Moriarty, 1998: Nimrat et al., 2011; 2012; Ochoa-Solano and Olmos-Soto, 2006; Rengpipat et al., 2000) ผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกสำหรับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำโดยเฉพาะกุ้งทะเลในประเทศไทยมักเป็นผลิตภัณฑ์ในรูปแบบน้ำ ซึ่งมักมีข้อจำกัดของอายุในการเก็บรักษาที่ค่อนข้างสั้น และรูปแบบผง ซึ่งมีราคาสูง รวมทั้งมีปริมาณและองค์ประกอบของโพรไบโอติกไม่ตรงตามฉลากที่ระบุไว้ในผลิตภัณฑ์ ดังนั้นจึงทำให้การใช้โพรไบโอติกไม่มีประสิทธิภาพเท่าที่ควร (Nimrat and Vuthiphandchai, 2011) ซึ่งในการศึกษาก่อนหน้านี้ของสุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และคณะ พบว่าโพรไบโอติกในรูปแบบ Living cell นั้นมี

อายุการเก็บรักษาค่อนข้างสั้น จึงมีการพัฒนาโพรไบโอติกในรูปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze-dried) โดยมีองค์ประกอบของโพรไบโอติกแตกต่างกัน คือ 1) แบคทีเรียโพรไบโอติกผสมซึ่งเป็น *Bacillus* 5 สายพันธุ์ 2) แบคทีเรียโพรไบโอติกซึ่งเป็น *Bacillus* 5 สายพันธุ์ ร่วมกับยีสต์โพรไบโอติก 2 สายพันธุ์ และ 3) ยีสต์โพรไบโอติก 2 สายพันธุ์ นอกจากนี้ยังพบว่าโพรไบโอติกในรูปแบบดังกล่าวสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไม ปรับปรุงคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมได้ (Nimrat et al., 2008; 2011; 2012) คณะผู้วิจัยจึงมุ่งมั่นในการพัฒนาผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกรูปแบบใหม่เพื่อการควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรคและส่งเสริมการเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไม ซึ่งสามารถพัฒนาไปสู่การผลิตในเชิงพาณิชย์และมีราคาที่ถูก เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำ ยับยั้งเชื้อก่อโรค ส่งผลให้สัตว์น้ำมีอัตราการรอดชีวิต การเจริญเติบโตและให้ผลผลิตที่เพิ่มสูงขึ้น ทั้งนี้ยังช่วยในการปรับปรุงคุณภาพน้ำในบ่อเพาะเลี้ยงได้ โดยคณะผู้วิจัยได้เริ่มการศึกษาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2549 ภายใต้โครงการวิจัยเรื่อง “การพัฒนาผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกที่มีคุณสมบัติในการควบคุมคุณภาพน้ำ ย่อยสลายของเสีย บำบัดขี้เลนและควบคุมแบคทีเรียก่อโรคในการเลี้ยงกุ้งทะเลเศรษฐกิจ” ที่ได้รับการสนับสนุนจาก สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย สำหรับเมธีวิจัยระดับกลาง ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2549-2551 และโครงการวิจัยที่ได้รับการสนับสนุนจาก สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2553-2554) และได้ค้นพบองค์ความรู้หลากหลายด้านเกี่ยวกับการประยุกต์ใช้โพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอย่างต่อเนื่อง ซึ่งมีผลงานในเชิงประจักษ์ คือ บทความวิจัยระดับนานาชาติจำนวน 4 ฉบับ บทความวิจัยระดับชาติจำนวน 4 ฉบับ รวมทั้งการนำเสนอผลงานวิจัยในงานประชุมวิชาการที่เกี่ยวกับโพรไบโอติกจำนวน 20 ฉบับ แต่อย่างไรก็ตามพบว่าโพรไบโอติกในรูปของการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งซึ่งมีอายุการใช้งานที่ยืนยาวกว่าแบบเซลล์มีชีวิต แต่ในปัจจุบันพบว่ารูปแบบไมโครแคปซูลเป็นวิธีที่ทันสมัยและสามารถเก็บรักษาอายุของโพรไบโอติกได้ยืนยาวกว่าทั้งรูปแบบเซลล์มีชีวิตและแบบการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาต่อเนื่องจากการวิจัยที่ได้กล่าวมาแล้ว เพื่อให้ถึงจุดมุ่งหมายในการผลิตผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกในรูปแบบใหม่ที่สามารถเก็บรักษาอายุของผลิตภัณฑ์ได้ยาวนานและมีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมคุณภาพสิ่งแวดล้อมและการควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรคในการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม โดยจะทำการศึกษาเกี่ยวกับประสิทธิภาพของแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งและรูปแบบที่มีการพัฒนาโพรไบโอติกในรูปแบบใหม่ คือ ในรูปแบบไมโครแคปซูลในด้าน (1) การควบคุมแบคทีเรียก่อโรค รวมทั้ง (2) ผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในระบบนิเวศของระบบเพาะเลี้ยงกุ้ง คือแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโร-โทรปทั้งหมด (Total Heterotrophic Bacteria) และแบคทีเรียทางทะเล (3) ความสามารถของโพรไบโอติกซึ่งได้แก่ แบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* ในการเจริญในระบบทางเดินอาหารของกุ้งขาวแวน-นาไมขนาดต่าง ๆ และในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยง (4) รวมทั้งการเจริญเติบโต อัตราการรอดชีวิต และความต้านทานแบคทีเรียก่อโรคของกุ้งขาวแวนนาไม

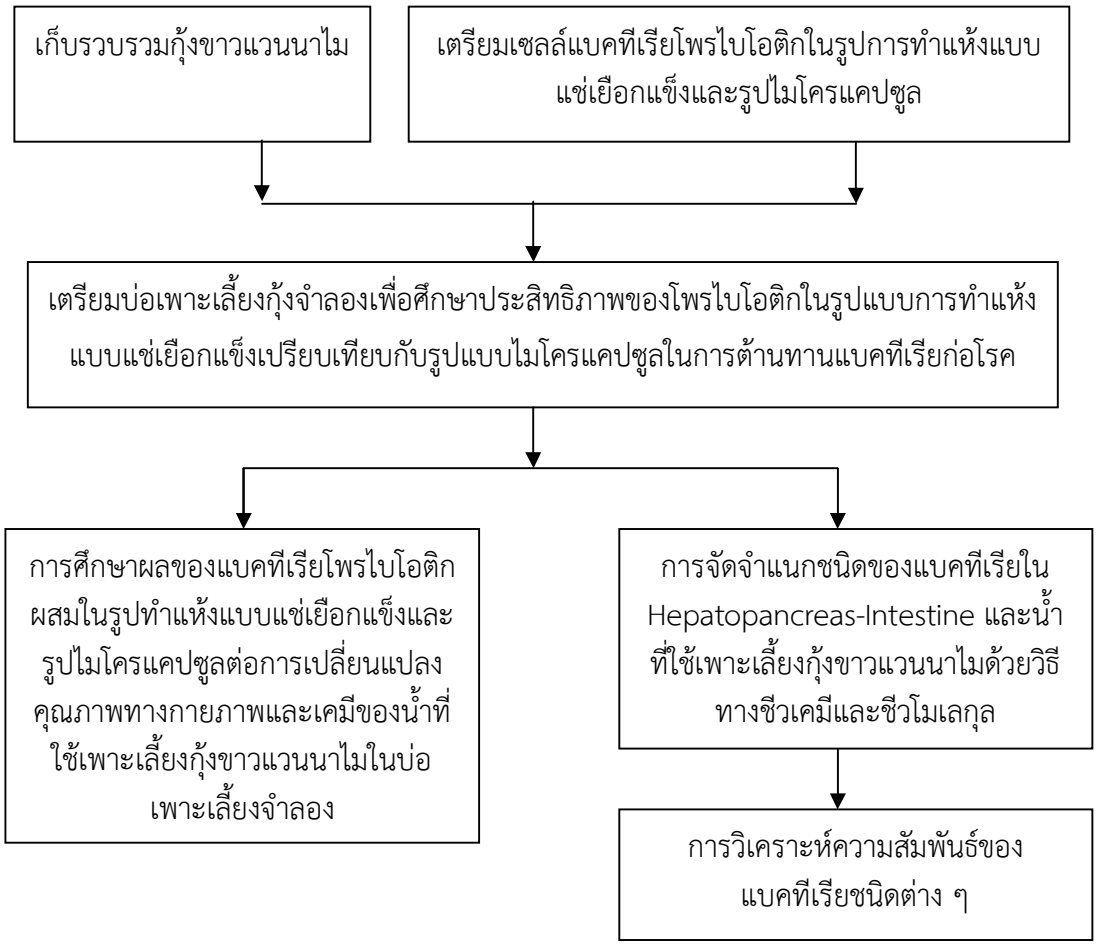
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมในรูปแบบใหม่คือ รูปไมโครแคปซูลในการควบคุมแบคทีเรียก่อโรค การเพิ่มความต้านทานแบคทีเรียก่อโรคและการเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไมในบ่อเพาะเลี้ยงจำลอง
2. เพื่อพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมโดยการใช้วิธีทางชีวภาพ คือ การใช้ผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกในรูปไมโครแคปซูลทดแทนการใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะเพื่อให้การเพาะเลี้ยงกุ้งมีความยั่งยืนและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษาในปีที่ 2 (ปีสุดท้าย) จะทำการศึกษาการประยุกต์ใช้แบคทีเรียโพรไบโอติกผสมใน 2 รูปแบบ คือ รูปแบบทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งและรูปแบบไมโครแคปซูลซึ่งเป็นรูปแบบใหม่มาผสมในอาหารและน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม โดยศึกษาต่อเนื่องจากโครงการวิจัยในปีที่ 1 (ปีที่ผ่านมา) คือ การศึกษาถึงคุณสมบัติของน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในบ่อเพาะเลี้ยงจำลองทางด้านกายภาพและเคมี ได้แก่ ความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ ความขุ่น อุณหภูมิ ความเค็ม แอมโมเนีย ไนไทรต์ ไนเทรตและฟอสเฟต และนำแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ที่คัดแยกได้จาก Hepatopancreas-Intestine และน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม มาจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยวิธีทางชีวเคมีและชีวโมเลกุล รวมถึงการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ที่พบใน Hepatopancreas-Intestine และน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม

วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุปทฤษฎีและ/หรือแนวทางความคิดที่นำมาใช้ในงานวิจัย



ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทำให้ทราบถึงประสิทธิภาพของแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมรูปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งและรูปไมโครแคปซูลในการควบคุมคุณภาพน้ำทางเคมีและกายภาพของน้ำในบ่อเพาะเลี้ยงจำลอง

2. ทำให้สามารถพัฒนาโพรไบโอติกให้อยู่ในรูปแบบใหม่คือ รูปไมโครแคปซูลที่มีประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม โดยสามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิต ลดปริมาณแบคทีเรียก่อโรค และเพิ่มความต้านทานแบคทีเรียก่อโรค รวมถึงการปรับปรุงคุณภาพที่ใช้เพาะเลี้ยง ซึ่งเป็นองค์ความรู้ใหม่ในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล ซึ่งการพัฒนาโพรไบโอติกในรูปเซลล์แช่แข็งและรูปไมโคร-แคปซูลในครั้งนี้ น่าจะสามารถทำให้เป็นผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกชนิดใหม่ที่มีความเหมาะสมในการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในประเทศไทย ส่งผลให้การเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมมีความยั่งยืนและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

1. กุ้งขาวแวนนาไม
2. คุณภาพน้ำในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง
3. การก่อโรคของแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* ในกุ้งทะเล
4. โพรไบโอติก
5. รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

1. กุ้งขาวแวนนาไม

กุ้งขาวแวนนาไมมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Litopenaeus vannamei* และมีชื่อสามัญว่า Whiteleg Shrimp, White Pacific Shrimp กุ้งขาวแวนนาไมและกุ้งขาวแปซิฟิค โดยกุ้งขาวแวนนาไมเป็นสายพันธุ์กุ้งทะเลในกลุ่มกุ้งขาวแปซิฟิก กุ้งขาวที่ทำการเพาะเลี้ยงกันอยู่ในปัจจุบันนี้สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มตามสภาพภูมิศาสตร์ของโลก ได้แก่ กุ้งขาวตะวันตก เช่น กุ้งขาวลิโทพีเนีย แวนนาไม กุ้งสีน้ำเงิน กุ้งขาวตะวันออก ได้แก่ กุ้งแชบ๊วย กุ้งขาวจีน กุ้งขาวอินเดีย (ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธ์, 2545ก)

ภาพที่ 1 ลักษณะของกุ้งขาวแวนนาไม (Wakida-Kusunoki et al., 2011)

ประเทศไทยเริ่มนำกุ้งขาวแวนนาไมมาเลี้ยงในปี พ.ศ. 2541 ซึ่งเป็นช่วงแรกของการทดลองเลี้ยงจึงไม่ค่อยได้รับความสนใจเท่าที่ควรประกอบกับการจัดหาพันธุ์กุ้งขณะนั้นมีความยากลำบากและมีราคาแพง ปัจจุบันการเลี้ยงกุ้งกุลาดำประสบปัญหาโรคระบาด ขาดแคลนพ่อแม่พันธุ์กุ้งคุณภาพดี และปัญหาที่สำคัญคือ กุ้งกุลาดำแคระแกรนเลี้ยงไม่โต แต่ราคาลูกกุ้งกลับปรับตัวสูงขึ้น ผู้เลี้ยงกุ้งจึงหันมาเลี้ยงกุ้งขาวกันมากขึ้น กุ้งขาวแวนนาไมเป็นกุ้งทางเลือกใหม่อีกสายพันธุ์ของอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงของประเทศ จัดเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่มีคุณค่าอีกชนิดหนึ่งที่สามารถเพาะฟักให้วางไข่และอนุบาลในบ่อคอนกรีตได้เช่นเดียวกันกับกุ้งกุลาดำและกุ้งแชบ๊วย (ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธ์, 2545ก)

ธรรมชาติของกุ้งขาวแวนนาไมจะมีอายุขัยประมาณ 36 เดือน โดยจะวางไข่ที่ระดับน้ำลึกประมาณ 30-60 มิลลิเมตร ใกล้พื้นทราย ปกติแล้วแม่กุ้งขนาด 60-120 กรัม จะวางไข่ประมาณ 150,000 ถึง 250,000 ฟอง ส่วนแม่กุ้งขนาด 30-45 กรัม จะวางไข่ประมาณไม่เกิน 100,000 ฟอง โดยจะวางไข่ในตอนกลางคืนบนพื้น รูปร่างและโครงสร้างต่างๆ ของกุ้งขาวแวนนาไม แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 อวัยวะและโครงสร้างและหน้าที่ของกุ้งขาว (ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธ์, 2547ก)

อวัยวะและโครงสร้าง	หน้าที่
กล้ามเนื้อโคนขา (Abdominal Striated Muscle)	ช่วยในการเคลื่อนที่และหลบหนีศัตรู
รยางค์คู่ที่ 2 (Antennae)	ทำหน้าที่รับความรู้สึก
ต่อมโคนหนวด (Antennal Gland Complex)	ทำหน้าที่ในการขับถ่ายและรักษาแรงดันภายในร่างกาย
รยางค์คู่แรก (Antennules)	ทำหน้าที่รับความรู้สึกและตอบสนองต่อสารเคมี
เปลือกหุ้ม (Exoskeleton)	ปกป้องอวัยวะภายใน
ส่วนหัว : ปาก หลอดอาหาร และกระเพาะ (Foregut: Mount, Esophagut and Stomach)	ทำหน้าที่ในการกิน เคี้ยว และกักเก็บอาหาร
เหงือก (Gills)	ทำหน้าที่หายใจ ขับถ่าย รักษาแรงดันภายในร่างกายและช่วยในการกรองกินเซลล์
ตับและตับอ่อน (Hepatopancreas)	ช่วยในการย่อยอาหาร ดูดซับ และกักเก็บอาหาร
ต่อมน้ำเหลือง (Lymphoid Organ)	ทำหน้าที่ในการดักจับสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย
ขากรรไกร ระหัดเหงือก เยื่อปิดเหงือก (Mandibles, Mandibular Palps, Gill Barriers)	ทำหน้าที่รับสัมผัส ดักเศษอาหารในน้ำที่ไหลผ่านเหงือก
ส่วนอก (Midgut)	ทำหน้าที่ในการดูดซึมทางผิวหนังและช่วยในการขับถ่าย
ขาเดินและขาว่ายน้ำ (Perelopods and Pleopods)	ช่วยในการเคลื่อนที่และตอบสนองทางสารเคมี

1.1 อนุกรมวิธาน

กุ้งขาวแวนนาไมเป็นกุ้งที่มีขนาดใหญ่ในวงศ์พีนีไอดี้ (Penaeidae) ถูกค้นพบโดย Boome ในปี ค.ศ. 1931 มีชื่อสามัญที่ F.A.O. รับรองและใช้เรียกกันทั่วโลกคือ Whiteleg Shrimp และอนุกรมวิธานของกุ้งขาวแวนนาไมเป็นดังนี้

Phylum Artropoda
Class Crustacea
Order Decapoda
Suborder Natantia
Tribe Penaeidea
Family Penaeidae
Genus *Litopenaeus*
Species *vannamei*

1.2 การพัฒนาการของกุ้งขาวแวนนาไม สามารถแบ่งออกเป็นระยะต่าง ๆ ดังนี้

1) ระยะนอเพลียส (Nauplius stage)

ตัวอ่อนที่ฟักออกมาจากไข่ จะมีขนาดเล็ก รูปร่างค่อนข้างกลมมีรยางค์ 3 คู่ คู่แรกอยู่ด้านหัวสุดซึ่งจะเจริญเป็นหนวดคู่สั้น (1^{st} Antenna) รยางค์คู่ที่ 2 และคู่ที่ 3 จะเจริญเป็นหนวดคู่ยาว (2^{nd} Antenna) และขากรรไกร (Mandible) ซึ่งอยู่ต่ำลงมาเป็นลำดับ ลูกกุ้งในระยะนี้จะไม่กินอาหารเนื่องจากได้อาหารจากถุงไข่แดง (Yolk sac) มีการลอกคราบ 6 ครั้ง ภายในเวลาประมาณ 45-50 ชั่วโมง จึงพัฒนาเข้าสู่ระยะซูเอีย (ธนพงศ์ แสงซื่อ และคณะ, 2547; บุญรัตน์ ประทุมชาติ, 2546; บุญรัตน์ ประทุมชาติ และคณะ, 2550)

2) ระยะซูเอีย (Zoea stage)

ตัวอ่อนในระยะนี้จะเริ่มมีช่องอก (Thoracic) ช่องท้อง (Abdomen) และตาเกิดขึ้น ลูกกุ้งจะมีขนาดใหญ่และยาวขึ้น ตัวอ่อนจะค่อย ๆ ลอยตัวขึ้นสู่ผิวน้ำและเริ่มหาอาหารเอง เนื่องจากไข่แดงหมด อาหารของตัวอ่อนในระยะนี้ส่วนใหญ่เป็นแพลงก์ตอนพืชที่มีขนาด 50 - 100 ไมโครเมตร จะมีการลอกคราบ 3 ครั้ง แต่ละครั้งในการลอกคราบจะมีรูปร่างเปลี่ยนไปจากเดิม ใช้ระยะประมาณ 3-5 วัน จึงเข้าสู่ระยะไมซิส (ธนพงศ์ แสงซื่อ และคณะ, 2547; บุญรัตน์ ประทุมชาติ, 2546; บุญรัตน์ ประทุมชาติ และคณะ, 2550)

3) ระยะไมซิส (Mysis stage)

ลูกกุ้งในระยะนี้สามารถมองเห็นส่วนหัว ส่วนท้อง และกรีได้ชัดเจน ส่วนอกยังรวมอยู่กับส่วนหัว ส่วนท้องแบ่งออกเป็น 6 ปล้อง ปล้องที่ 1 ถึงปล้องที่ 5 มีขนาดเท่ากัน ส่วนปล้องที่ 6 มีขนาดยาวกว่าปล้องอื่น ๆ และมีแพนหาง ขาเดินเริ่มมีข้อปล้องมองเห็นได้ชัดเจน 3 คู่แรกจะมีลักษณะเป็นก้ามและพัฒนาขึ้นเรื่อย ๆ ขาว่ายน้ำเริ่มเกิด รยางค์คู่ที่ 6 มีการเจริญมากขึ้น หางจะแคบเข้าและมีขนข้างละ 7 เส้น ลูกกุ้งในระยะนี้จะลอกคราบ 3 ครั้ง ในเวลาประมาณ 3-5 วัน และพัฒนา

เข้าสู่ระยะโพสลาวา (ธนพงศ์ แสงซื่อ และคณะ, 2547; บุญรัตน์ ประทุมชาติ, 2546; บุญรัตน์ ประทุมชาติ และคณะ, 2550)

4) ระยะโพสลาวา (Post-larva stage)

ระยะนี้ลูกกุ้งจะมีลำตัวยาวประมาณ 5.56 มิลลิเมตร เปลือกคลุมส่วนหัวยาวประมาณ 1.57 มิลลิเมตร ขาเดิน 3 คู่ มีลักษณะเป็นก้าม มองเห็นชัด คู่แรกสั้นและคู่ที่ 3 ยาวที่สุด หางจะแคบเข้าจนแหลม ลูกกุ้งในระยะนี้เริ่มมีรยางค์คราบเหมือนกุ้งเต็มวัย ลูกกุ้งจะพัฒนาการไปเรื่อย ๆ จนเข้าสู่กุ้งวัยรุ่น กุ้งจะอยู่ในระยะนี้ประมาณ 30 วัน มีความยาวประมาณ 1.5-2.0 เซนติเมตร หนักประมาณ 1.01-1.02 กรัม (ธนพงศ์ แสงซื่อ และคณะ, 2547; บุญรัตน์ ประทุมชาติ, 2546; บุญรัตน์ ประทุมชาติ และคณะ, 2550)

2. คุณภาพน้ำในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง

2.1 ความขุ่น

ความขุ่นของน้ำเป็นค่าที่แสดงให้เห็นว่าน้ำมีสารแขวนลอยอยู่มากน้อยเพียงใด ความขุ่นของน้ำอาจเกิดขึ้นได้จากหลายสาเหตุ เช่น ปริมาณสารอินทรีย์ สิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก เช่น แพลงก์ตอน แบคทีเรีย รวมทั้งสารแขวนลอยต่าง ๆ เช่น อนุภาคของดิน ทราย ตลอดจนแร่ธาตุต่าง ๆ เป็นต้น (ไมตรี ดวงสวัสดิ์ และจารุวรรณ สมสิริ, 2528) ความขุ่นรวมทั้งสารแขวนลอยจะมีผลต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำ โดยมีผลทำให้การสังเคราะห์แสงของพืชน้ำลดลง เนื่องจากความขุ่นจะไปบดบังแสงแดดซึ่งจำเป็นต่อกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืชน้ำ ทำให้พืชน้ำที่อยู่บริเวณก้นบ่อไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้และตายในที่สุด และตะกอนจากความขุ่นจะเข้าไปขัดขวางการหายใจของสัตว์น้ำ ส่งผลให้สัตว์น้ำมีการเจริญเติบโตช้ากว่าปกติ นอกจากนี้น้ำที่มีความขุ่นมาก ๆ จะทำให้การฟักไข่และการเจริญเติบโตของตัวอ่อนช้าลง และความขุ่นยังทำให้อุณหภูมิในน้ำมีความแตกต่างระหว่างชั้นน้ำ เนื่องจากผิวน้ำด้านบนสามารถดูดซึมแสงแดดได้มากกว่าด้านล่าง ทำให้น้ำด้านบนมีอุณหภูมิสูงกว่าด้านล่าง หากสัตว์น้ำมีการเคลื่อนที่ตามแนวดิ่ง จะทำให้ปรับตัวไม่ทัน และอาจทำให้ตายได้ ซึ่งโดยทั่วไปแล้วน้ำที่มีความขุ่นมากจะสามารถรับออกซิเจนได้น้อยกว่าน้ำใส ทำให้ปริมาณออกซิเจนในน้ำลดลงด้วย (มั่นสิน ตัณฑุลเวศม์ และไพพรรณ พรประภา, 2539)

2.2 อุณหภูมิ

การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของน้ำอย่างกะทันหันอาจทำให้สัตว์น้ำช็อกถึงตายได้ เนื่องจากสัตว์น้ำเป็นสัตว์เลือดเย็นไม่สามารถควบคุมอุณหภูมิของร่างกายให้คงที่ได้ โดยเฉพาะสัตว์น้ำที่อยู่ในวัยอนุบาล รวมทั้งอุณหภูมิยังมีผลต่อการฟักไข่ของสัตว์น้ำหลายชนิด (สุภาพร สุกสีเหลือง, 2550) โดยกุ้งขาวแวนนาไมสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 26 - 29 องศาเซลเซียส แต่สามารถทำการเพาะเลี้ยงได้ที่อุณหภูมิ 25 - 35 องศาเซลเซียส (ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์, 2545ข) หากน้ำมีอุณหภูมิสูงเกินไปจะทำให้กุ้งเกิดการงอตัว เนื่องจากการเกร็งของกล้ามเนื้อ และอุณหภูมิของน้ำที่ต่ำกว่า 18 องศาเซลเซียส กุ้งจะไม่ว่ายน้ำและหยุดการกินอาหาร ถ้าอุณหภูมิของน้ำมีค่าต่ำกว่า 14 องศาเซลเซียส จะทำให้กุ้งตาย (วิภูษิต มัณฑะจิตร และคณะ, 2534)

2.3 ความเค็ม

ความเค็มของน้ำมีผลต่อการควบคุมปริมาณน้ำภายในร่างกายของสัตว์น้ำ หากภายในเวลา 2-3 นาที ความเค็มของน้ำมีการเปลี่ยนแปลงมากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ สัตว์น้ำจะไม่สามารถปรับตัวได้ทัน และอาจทำให้สัตว์น้ำตายได้ (Lawson, 1995) และความเค็มยังมีผลต่อการละลายน้ำของออกซิเจน โดยพบว่าเมื่อความเค็มเพิ่มขึ้นจะทำให้ออกซิเจนละลายน้ำได้น้อยลง (สไบทิพย์ อมร-จารุชิต และคณะ, 2543) นอกจากนี้มีเชื้อก่อโรคบางชนิด เช่น *Vibrio* sp. เจริญได้ดีที่ความเค็มตั้งแต่ 20 ส่วนในพันส่วนขึ้นไป และ *Pseudomonas* sp. จะเจริญที่ความเค็มต่ำประมาณ 10 ส่วนในพันส่วน ซึ่งอาจส่งผลให้กุ้งติดโรคจากแบคทีเรียดังกล่าวได้ แต่ในปัจจุบันพบว่าการเลี้ยงกุ้งที่ความเค็มของน้ำเท่ากับ 3 - 10 ส่วนในพันส่วน จะง่ายกว่าการเลี้ยงด้วยน้ำทะเลความเค็มปกติ เนื่องจากน้ำที่มีความเค็มต่ำมีปัญหาจากโรคน้อยมาก โดยเฉพาะปัญหาจากโรคแบคทีเรียเรืองแสง เป็นต้น (ชลอ ลิ้ม-สุวรรณ, 2543)

2.4 ออกซิเจนที่ละลายน้ำ

ออกซิเจนที่ละลายในน้ำเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญสำหรับสิ่งมีชีวิตทุกชนิดที่อาศัยอยู่ในน้ำ (นฤมล อัศวเกศมณี, 2549) น้ำที่มีความเค็มและอุณหภูมิเพิ่มขึ้นจะมีผลทำให้ออกซิเจนละลายน้ำได้ลดลง ซึ่งพบว่าปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำจะมีค่าต่ำสุดในตอนเช้ามืด เนื่องจากออกซิเจนถูกใช้ในกระบวนการย่อยสลายของเสีย โดยแบคทีเรียและการหายใจของสิ่งมีชีวิตในบ่อ ส่วนในช่วงตอนกลางวันจะมีค่าออกซิเจนที่ละลายน้ำสูงสุด เพราะแพลงก์ตอนพืชเริ่มมีการสังเคราะห์แสงทำให้ปริมาณออกซิเจนมากขึ้น (พุทธ ส่องแสงจินดา, 2544) ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงกุ้งควรมีค่าเฉลี่ยประมาณ 4 - 9 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งจะทำให้กุ้งเจริญเติบโตได้ดี ย่อยสลายสารอินทรีย์ได้เร็ว แต่ถ้าหากในน้ำมีปริมาณออกซิเจนน้อยกว่า 1 มิลลิกรัมต่อลิตร จะส่งผลทำให้กุ้งตายได้ (ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์, 2547ข; 2548)

2.5 ความเป็นกรด-ด่าง (pH)

ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำมีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของกุ้งเป็นอย่างมาก เนื่องจากค่าความเป็นกรด-ด่างมีผลต่อคุณสมบัติอื่น ๆ ของน้ำ เช่น มีผลต่อความเป็นพิษของแอมโมเนีย ไนไทรต์และไฮโดรเจนซัลไฟด์ เป็นต้น ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำที่มีความเหมาะสมสำหรับการเลี้ยงกุ้งควรอยู่ระหว่าง 7.5-8.5 และความแตกต่างของค่าความเป็นกรด-ด่างในรอบวันไม่ควรมากกว่า 0.5 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำในรอบวันมากเกินไปจะมีผลทำให้กุ้งเครียด มีผลต่อการเจริญเติบโตด้วย การเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด-ด่างในบ่อเลี้ยงกุ้งขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง เช่น คุณสมบัติของดิน ค่าความเป็นด่าง (Alkalinity) การผลิตและการใช้คาร์บอนไดออกไซด์ในน้ำ ซึ่งส่วนใหญ่จะขึ้นอยู่กับปริมาณแพลงก์ตอนพืช ผลของการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างต่อกุ้งมีการศึกษาไม่มากแต่น่าจะคล้ายกับปลาที่สามารถสรุปคร่าว ๆ ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลกระทบของค่าความเป็นกรด-ด่างต่อกุ้ง (Boyd, 1982)

ค่าความเป็นกรด-ด่าง	ผลกระทบ
น้อยกว่า 4	เป็นกรด กุ้งจะตาย
มากกว่า 4-6	การเจริญเติบโตช้า
มากกว่า 6-9	การเจริญเติบโตดีที่สุด
มากกว่า 9-11	การเจริญเติบโตช้า
มากกว่า 11	เป็นด่าง กุ้งจะตาย

2.6 สารอินทรีย์ไนโตรเจน

รูปแบบที่สำคัญของไนโตรเจนในแหล่งน้ำมี 3 รูปแบบ ได้แก่ แอมโมเนีย (NH_3) ไนไทรต์ (NO_2^-) และไนเทรต (NO_3^-) แอมโมเนียเป็นสารที่มีความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำแม้อยู่ในระดับความเข้มข้นต่ำ ๆ วิภูษิต มัณฑะจิตร และคณะ (2534) รายงานว่าค่าแอมโมเนียที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงกุ้งไม่ควรเกิน 0.0396 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนไนไทรต์เป็นสารที่มีความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำเช่นกัน เนื่องจากเมื่อไนไทรต์เข้าไปในเลือดสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับฮีโมโกลบินในเลือดเป็นผลให้ฮีโมโกลบินเปลี่ยนเป็นเมทฮีโมโกลบิน ทำให้ความสามารถในการแลกเปลี่ยนออกซิเจนลดลง เลือดจึงมีออกซิเจนต่ำกว่าปกติ (สุภาพร สุกสีเหลือง, 2550) ส่งผลให้ระบบหายใจของกุ้งผิดปกติ กุ้งลอกคราบไม่ออก เปลือกนิ่ม และมีการกินกันเองในขณะลอกคราบ นอกจากนี้ไนไทรต์ยังทำให้ระดับโปรตีนและความเป็นกรด-ด่างของเลือดกุ้งลดลง ซึ่งมีผลต่อชีวเคมีในเลือดของกุ้ง และขบวนการเผาผลาญอาหารในร่างกายมีประสิทธิภาพลดลงทำให้การเจริญเติบโตของกุ้งลดลง เกิดการสะสมของยูเรียในเลือดกุ้ง และมีการดูดซึมน้ำมากทำให้สมดุลเกลือแร่เปลี่ยนแปลงไป (พุทธ ส่องแสงจินดา, 2546)

2.7 ไฮโดรเจนซัลไฟด์ (Hydrogen sulfide; H_2S)

ในสภาพที่ขาดออกซิเจนแบคทีเรียบางชนิดสามารถใช้กำมะถันในรูปซัลเฟตและสารประกอบกำมะถันตัวอื่น ๆ ที่อยู่ในรูปออกซิไดซ์และเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของซัลไฟด์ ซึ่งจะอยู่ใน 3 รูปแบบคือ ไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) ไฮโดรเจนซัลไฟด์ไอออน (HS^-) และไบซัลไฟด์ไอออน (S^{2-}) สัดส่วนของแต่ละชนิดที่พบจะขึ้นอยู่กับค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำ น้ำที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำจะมีเปอร์เซ็นต์ของ H_2S สูง แต่เมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างสูงขึ้น เปอร์เซ็นต์ของ H_2S จะลดลง และ S^{2-} มากขึ้นทำให้ความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำลดลงด้วย ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ร้อยละของไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างต่างกันที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (Boyd and Tucker, 1998)

ค่าความเป็นกรด-ด่าง	ร้อยละ
5.0	99.0
5.5	97.0
6.0	91.1
6.5	76.4
7.0	50.6
7.5	24.4
8.0	9.3
8.5	3.1
9.0	1.0

ความเป็นพิษของไฮโดรเจนซัลไฟด์จะคล้ายคลึงกับการขาดออกซิเจน เนื่องจากไปขัดขวางออกซิเจนภายในเซลล์ทำให้ปริมาณแลคเตท (Lactate) ในเลือดสูงขึ้น ความเป็นพิษของไฮโดรเจน-ซัลไฟด์จะรุนแรงกว่าการขาดออกซิเจน ระดับความเข้มข้นของไฮโดรเจนซัลไฟด์สูงสุดที่ไม่เป็นอันตรายต่อกุ้งคือ 0.033 พีพีเอ็ม ไฮโดรเจนซัลไฟด์สามารถซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (Cell membrane) เข้าไปในร่างกายของสัตว์ได้ การเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ในบ่อเลี้ยงกุ้งส่วนใหญ่เกิดมาจากการให้อาหารมากเกินไปหรือแพลงก์ตอนตายเป็นจำนวนมากแล้วเกิดการเน่าสลาย พื้นบ่อมีสีดำและมีกลิ่นคล้ายไข่เน่า

3. การก่อโรคของแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* ในกุ้งทะเล

3.1 โรคจากวิบริโอ โรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียในกุ้ง ส่วนมากจะเกิดจากเชื้อแบคทีเรียสกุลวิบริโอ ซึ่งโดยธรรมชาติแล้ว เชื้อวิบริโอนี้จะเป็นเชื้อปรกติที่พบตามตัวกุ้ง เหงือก และทางเดินอาหารอยู่แล้วแต่จะทำให้เกิดโรคได้เมื่อสภาวะแวดล้อมต่างๆ ไม่เหมาะสม เช่น ขาดสารอาหาร สภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสม กุ้งเครียด อ่อนแอ หรือแสดงอาการร่วมกับไวรัสชนิดอื่น สาเหตุเกิดจากเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus, V. harveyi* และ *V. alginilyticus* อาการของกุ้งที่ติดโรค กุ้งกินอาหารน้อยลง ลำไส้ขาว ตับ ตับอ่อนผิดปรกติ สีเนื้อจะขุ่น ขึ้นมาเกาะขอบบ่อ ตัวสกปรก มีตะกอนเกาะตามผิว ตัวหลวม เมื่อนำตับและตับอ่อน มาเพาะเชื้อจะพบเชื้อเป็นจำนวนมาก หากปล่อยไว้นานอาการจะรุนแรงรักษายาก

3.2 โรคเรืองแสง เป็นโรคที่สร้างความเสียหายให้อย่างมากต่อโรงเพาะฟักและบ่อดิน พบการแพร่กระจายทั่วไปทั้งตามชายฝั่งและพื้นที่ความเค็มต่ำ สาเหตุเกิดได้จากหลายประการทั้งคุณภาพน้ำที่ไม่ดี ทำให้ *V. harveyi* ที่ปกติพบอยู่แล้วในน้ำเข้าทำอันตรายต่อกุ้งเมื่อกุ้งไม่แข็งแรง อาการของกุ้งที่ติดโรค กุ้งลอยขอบบ่อ ไม่กินอาหาร ตัวหลวม สีลำตัวจะขุ่น ซี่เหงือกมีสีดำ ตับอักเสบ

ตับอ่อน สีซีดลง และจะมีการเรืองแสงเกิดขึ้นในเวลากลางคืน การรักษาจะใช้ยาปฏิชีวนะและฆ่าเชื้อในน้ำด้วยไอโอดีนหรือบีเคซี

3.3 โรคตัวแดง กุ้งที่เป็นโรคนี้ตามปล้องจะสังเกตเห็นเป็นจุดสีแดง พบได้ในกุ้งขนาดต่าง ๆ สาเหตุเกิดจากเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* sp. (*V. paraheamolyticus, V. anguillarum*) มีลักษณะอาการคือ เมื่อกุ้งเป็นโรคนี้แล้วมักจะไม่กินอาหาร ว่ายน้ำเชื่องช้า ชอบมาเกยขอบบ่อ

3.4 โรคเสี้ยนดำ มีสาเหตุมาจาก *Vibrio vulnificus* ซึ่งจะเข้าแทรกซ้อนเมื่อลูกกุ้งอ่อนแอ อาการของกุ้งที่ติดโรค ตามเปลือกกุ้งจะมี จุดสีดำและมีก้านต่อแทงเข้าไปในกล้ามเนื้อกุ้ง โดยเฉพาะบริเวณรอยต่อระหว่างปล้อง เมื่อนำกุ้งไปต้มจะพบก้านที่แทงเข้าไปในกล้ามเนื้อ จะมีสีดำคล้ายเสี้ยนค่อนข้างชัดเจน

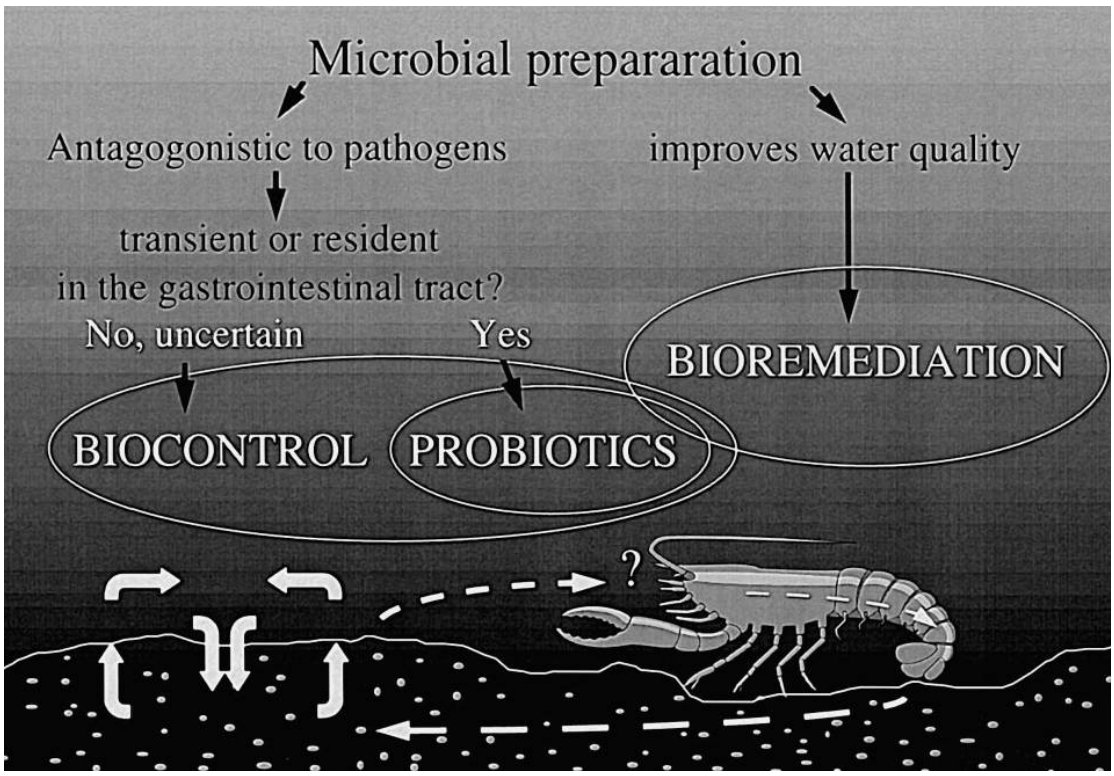
3.5 โรคตับอักเสบ พบมากในเขตน้ำกร่อยและเค็ม โดยจะออกฤทธิ์ที่ตับและตับอ่อน ซึ่งเป็นแหล่งสะสมอาหารและสร้างน้ำย่อย สะสมเกลือแร่และสารพิษต่างๆ ทำให้มีโอกาสติดเชื้อได้ง่าย โดยเชื้อจะเข้าสู่ตัวกุ้งทางการกินอาหารและบาดแผล สาเหตุเกิดจากการจัดการภายในบ่อที่ไม่ดี ทำให้เชื้อในสกุล *Vibrio* sp. ที่มีอยู่ในน้ำเข้าทำอันตรายต่อกุ้ง โดยเฉพาะตับและตับอ่อน อาการของกุ้งที่ติดโรค กุ้งอ่อนแอกินอาหารได้น้อยลง ตับจะมีขนาดโตหรือฝ่อ เปลี่ยนเป็นสีขาว ซีดหรือดำคล้ำ กล้ามเนื้อมีสีขาวขุ่น ถ้าไม่ทำการรักษากุ้งจะลอยหัวและเริ่มตายมากขึ้น

3.6 โรคกุ้งขี้ขาว มีสาเหตุมาจากอาการลำไส้ตอนบนของกุ้งอักเสบ เนื่องจากอาหารที่ปนเปื้อนเชื้อราหรืออาหารมีคุณภาพต่ำ เช่น ปลาป่นที่มีคุณภาพต่ำและปนเปื้อนแคปซูลของแบคทีเรีย การติดเชื้อแบคทีเรียสกุลวิบริโอ มีลักษณะอาการคือ ลำไส้ตอนต้นของกุ้งอักเสบ ขุ่นขาว ขี้กุ้งจะเป็นสีขาว ในกรณีที่กุ้งเป็นขี้ขาวจำนวนมากจะพบขี้กุ้งลอยตามน้ำอยู่บริเวณริมขอบบ่อด้านปลายลม การป้องกันรักษา จะให้กุ้งกินยาซัลฟา+ไตรเมทโธปริม 3-5 กรัม/อาหาร 1 กก. ทุกมื้อ 5-7 วัน

4. โพรไบโอติก

ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจำเป็นต้องมีการควบคุมแบคทีเรียก่อโรค ในอดีตการควบคุมแบคทีเรียก่อโรคนิยมใช้สารเคมีและสารปฏิชีวนะ สารปฏิชีวนะนี้เองทำให้แบคทีเรียเกิดการดื้อยา (Weston, 1996) ยีนดื้อยาสามารถถ่ายทอดสู่แบคทีเรียสายพันธุ์อื่นได้โดยผ่านพลาสมิดหรือแบค-เทอริโอฟาจทำให้เกิดการแพร่กระจายยีนดื้อยาสู่แบคทีเรียในสิ่งแวดล้อม (Towner, 1995) การใช้สารปฏิชีวนะในโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเป็นที่แพร่หลายในประเทศแถบลาตินอเมริกาและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เมื่อไม่นานมานี้เองมีการใช้จุลินทรีย์เป็นโพรไบโอติกและวัคซีนเป็นตัวกระตุ้นภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำ (Gomez-Gil et al., 2000)

แบคทีเรียที่ได้รับความนิยมนำมาใช้เป็นโพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงกุ้ง ปู หอยและปลา ได้แก่ แบคทีเรียในสกุล *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Bacillus* และแบคทีเรียแลกติก (Gomez-Gil et al., 2000) ปัจจุบันการใช้โพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้ขยายตัวเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากเป็นการเพาะเลี้ยงที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม (Gatesoupe, 1999) โดยการใช้ประโยชน์จากโพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ 1) จุลินทรีย์ที่ใช้บำบัดคุณภาพน้ำและพื้นบ่อ และ 2) จุลินทรีย์สำหรับให้สัตว์กินเข้าไปในร่างกาย อาจใช้แบบผสมอาหารหรือวิธีการอื่น อยู่ภายใต้การควบคุมต้องจดทะเบียนกับกรมปศุสัตว์เป็นประเภทอาหารเสริมชีวนะ (ดังภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 การใช้ประโยชน์จากโพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (Gatesoupe, 1999)

จากรูปจะเห็นได้ว่าการใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ในระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มหนึ่งเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในด้านการปรับปรุงคุณภาพน้ำซึ่งถือเป็นการฟื้นฟูทางชีวภาพ อีกกลุ่มหนึ่งคือการใช้จุลินทรีย์เพื่อต่อต้านเชื้อก่อโรคซึ่งอาจแบ่งย่อยออกเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพมีหน้าที่ในการต่อต้านเชื้อก่อโรค และโพรไบโอติกมีหน้าที่ในการต่อต้านเชื้อก่อโรคและมีความสามารถในการดำรงอยู่ในระบบทางเดินอาหารของผู้รับได้ ซึ่งไม่ว่าจะนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านใดล้วนก่อให้เกิดประโยชน์ต่อสิ่งมีชีวิตและสภาพแวดล้อมทั้งสิ้น (Gatesoupe, 1999)

ในสากลจุลินทรีย์ที่ให้สัตว์กินจะแยกส่วนออกมาและใช้คำว่า Direct Fed Microbial (D.F.M.) ส่วนคำว่าโพรไบโอติกโดยทั่วไปถือว่าเป็นสรรพคุณไม่ใช่ตัวสาร ทั้งจุลินทรีย์ที่ใส่น้ำและให้กิน สามารถให้สรรพคุณที่เป็นโพรไบโอติก เอฟเฟคได้ (Probiotic Effect) คือ การมีชีวิตและเพิ่มจำนวนรวมถึงเจริญขึ้นมาข่มจุลินทรีย์ที่เป็นโทษ (Compettitive Exclusion) และสร้างสารที่มีประโยชน์ เช่น สารปฏิชีวนะ เอนไซม์ กรดอ่อน กรดแลคติก เป็นต้น (วิชัย ลาภจตุพร, 2546)

โพรไบโอติกเป็นการใช้จุลินทรีย์เพื่อเสริมการเจริญเติบโตและสร้างภูมิคุ้มกันให้แก่กุ้งด้วยจุลินทรีย์ ซึ่งหลักการของโพรไบโอติกนั้นคือ การใช้จุลินทรีย์เสริมในอาหารสัตว์เพื่อส่งผลให้เกิดสมดุลในระบบทางเดินอาหาร ซึ่งโดยปกติจุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้จะมีทั้งประเภทที่ดีและไม่ดีต่อตัวกุ้ง เมื่อมีการเสียสมดุลและมีปริมาณจุลินทรีย์ที่ไม่ดีจำนวนมากกว่าจะทำให้เกิดโรคในตัวกุ้ง จึงมีการนำโพรไบโอติกมาใช้ในการเลี้ยงตัวอ่อนกุ้ง ผลที่ได้รับคือได้กุ้งที่เจริญเติบโตในบ่อเป็นที่น่าพอใจ (Rengpipat et al., 1998)

4.1 คุณสมบัติของโพรไบโอติกต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค

การใช้โพรไบโอติกเป็นการควบคุมทางชีวภาพโดยอาศัยศัตรูทางธรรมชาติเข้าทำลายหรือควบคุมเชื้อก่อโรคไม่ให้ทวีจำนวนจนเป็นอันตราย (Debach and Rosen, 1991) การทำงานของโพรไบโอติกเกิดจากการข่มและแข่งขันกันในการแย่งอาหารและครอบครองพื้นที่บริเวณเซลล์เยื่อบุท่อทางเดินอาหารระหว่างจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์และจุลินทรีย์ก่อโรค โดยโครงสร้างของทางเดินอาหารจะมีจุดสำหรับจุลินทรีย์ยึดเกาะ ดังนั้นจุลินทรีย์ที่สามารถแย่งจุดยึดเกาะได้ก็จะสามารถดำรงชีวิตอยู่ในระบบทางเดินอาหารได้ ส่วนจุลินทรีย์ที่ล่องลอยอยู่ในระบบทางเดินอาหารก็จะถูกกำจัดออกไปทางอุจจาระ โพรไบโอติกยังมีความสามารถในการกระตุ้นให้เซลล์เยื่อบุหลุดออกแล้วกระตุ้นให้สร้างเซลล์ใหม่ทดแทนร่วมกับกระตุ้นการบีบตัวของลำไส้ได้อีกด้วย (Verschuere et al., 2000) นอกจากนี้โพรไบโอติกยังสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค เช่น กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ สารปฏิชีวนะ เป็นต้น โพรไบโอติกที่ดีนั้นจะต้องเป็นจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่ก่อประโยชน์โดยการเพิ่มการเจริญเติบโตต่อกุ้ง ไม่ก่อให้เกิดโรค เป็นเซลล์ของสิ่งมีชีวิตที่เพิ่มจำนวนได้มาก สามารถเจริญและทำงานได้ดีในระบบทางเดินอาหาร รวมทั้งมีความคงทนต่อการเก็บรักษา จุลินทรีย์ที่มีสมบัติเป็นโพรไบโอติกได้แก่ *Bacillus* sp., *Bifidobacterium* sp., *Clostridium botyricum*, *Enterococcus* sp., *E. coli*, *Lactobacillus* sp., *Streptococcus* sp. (ภวัต สังขะวัฒนะ, 2544)

4.2 คุณสมบัติของโพรไบโอติกต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของกุ้ง

ปัจจุบันกลไกการทำงานของโพรไบโอติกยังไม่ทราบแน่ชัด ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าโพรไบโอติกเข้าไปจับกับบริเวณยึดเกาะ (Receptor) แทนที่จุลินทรีย์ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของกุ้ง ทำให้กุ้งมีอัตราการเจริญเติบโตที่รวดเร็ว นอกจากนี้โพรไบโอติกจะช่วยให้ระบบทางเดินอาหารทำงานได้ดีขึ้นโดยการสังเคราะห์วิตามิน โคแฟคเตอร์ และเอนไซม์ต่างๆ มาช่วยย่อยอาหาร ทำให้อาหารที่เติมลงไปถูกดูดซึมและนำไปใช้ในการเจริญเติบโตมากขึ้นจึงส่งผลให้น้ำหนักกุ้งเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว (Gullian et al., 2004)

4.3 คุณสมบัติของโพรไบโอติกต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้ง

ระบบภูมิคุ้มกันคือ กลไกของสัตว์ในการป้องกันตัวเองและทำลายเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้สัตว์เกิดอาการเจ็บป่วยและตาย โดยระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งนั้นจะมีเซลล์เม็ดเลือดเป็นจุดศูนย์กลาง แตกต่างจากสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังที่มีเซลล์เม็ดเลือดอยู่ 2 ชนิด คือ เซลล์เม็ดเลือดแดงทำหน้าที่ขนส่งออกซิเจนไปเลี้ยงส่วนต่างๆ ของร่างกาย และเซลล์เม็ดเลือดขาวทำหน้าที่ในการทำลายจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค แต่สำหรับเซลล์เม็ดเลือดกุ้งนั้นจะทำหน้าที่ทั้งกำจัดทำลายสิ่งแปลกปลอมที่เข้าไปทำอันตรายต่อกุ้ง หน้าที่ของเซลล์เม็ดเลือดกุ้งแสดงดังตารางที่ 4 และน้ำเลือดของกุ้งที่มีสีน้ำเงินซึ่งเป็นสีของฮีโมไซยานินที่มีทองแดงเป็นองค์ประกอบทำหน้าที่ในการแลกเปลี่ยนและขนส่งออกซิเจนไปหล่อเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อ เซลล์เม็ดเลือดถูกสร้างจากเนื้อเยื่อที่เรียกว่า Hematopoietic Tissue (HPT) ซึ่งพบในบริเวณฐานกรีและโคนขาเดินในส่วนอก เมื่อเซลล์เม็ดเลือดถูกสร้างขึ้นมาแล้วจะถูกส่งไปใช้ในระบบหมุนเวียนเลือดและถูกหัวใจบีบส่งไปเลี้ยงส่วนต่างๆ ของร่างกาย (กิจการ ศุภมาตย์ และคณะ,

2543) โดยปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขึ้นอยู่กับระยะการลอกคราบ พบว่าปริมาณเซลล์เม็ดเลือดเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดในระยะก่อนการลอกคราบ เซลล์เม็ดเลือดกุ้งสามารถแบ่งออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่

4.3.1 ไฮยาลิน (Hyalin Cell) เป็นเซลล์เม็ดเลือดที่มีรูปร่างแบน กลม ผิวเรียบ บางครั้งจะพบมีลักษณะคล้ายกระสวย มีนิวเคลียสขนาดใหญ่อยู่กลางเซลล์ มีไซโทพลาสซึมน้อย ไม่มีกรานูลภายในเซลล์ เป็นเซลล์เม็ดเลือดที่มีขนาดเล็กที่สุด

4.3.2 เซมิกรานูลลาร์ (Semigranular Hemocyte) เป็นเซลล์เม็ดเลือดที่มีเม็ดกรานูลขนาดเล็กอยู่ในเซลล์ไม่มากนัก เซลล์มีความยาว 9.0-14.2 ไมโครเมตร กว้าง 4.2-6.8 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 7-10 ไมโครเมตร

4.3.3 กรานูลลาร์ (Large Granular Hemocyte) เป็นเซลล์เม็ดเลือดที่มีขนาดใหญ่ที่สุดและมีกรานูลขนาดใหญ่เป็นจำนวนมากภายในไซโทพลาสซึม เซลล์มีความยาว 12.2-14.6 ไมโครเมตร กว้าง 7.2-7.8 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 8-10 ไมโครเมตร (ปภาศิริ ศรีโสภาภรณ์, 2543)

ตารางที่ 4 หน้าที่ของเซลล์เม็ดเลือดกุ้ง (ปภาศิริ ศรีโสภาภรณ์, 2543)

การทำงาน	ชนิดของเม็ดเลือด		
	ไฮยาลิน	**เซมิกรานูลลาร์**	**กรานูลลาร์**
การจับกิน (Phagocytosis)	ทำงาน	ทำงานน้อย	ไม่ทำงาน
การห่อหุ้ม (Encapsulation)	ไม่ทำงาน	ทำงาน	ทำงานน้อยมาก
การแข็งตัวของเลือด (Clotting)	ทำงาน	ไม่ทำงาน	ไม่ทำงาน
Cytotoxicity	ยังศึกษาน้อย	ทำงาน	ทำงาน
Prophenoloxidase System	ไม่ทำงาน	ทำงาน	ทำงาน

กระบวนการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายของกุ้งมีทั้งกิจกรรมที่เกิดขึ้นโดยการตอบสนองของเซลล์และสารน้ำ (Cellular and Humoral Response) ซึ่งกิจกรรมที่เกิดขึ้นมีหลายแบบ คือ โปรตีนชนิดต่างๆ ในซีรัม เช่น แอกกลูตินิน (Agglutinin) ฮีโมไลซิน (Hemolysin) ไลโซไซม์ (Lysozyme) และโปรตีนที่ช่วยในการแข็งตัวของเลือด (Clotting Protein) ซึ่งจะก่อให้เกิดกระบวนการเกาะกลุ่ม (Adhesion) การจับกิน (Phagocytosis) การห่อหุ้ม (Encapsulation) และการสร้างเม็ดสี (Melanization) และระบบอื่นที่เกี่ยวข้อง เช่น การแข็งตัวของเลือดและสมานแผล ระบบ Prophenoloxidase Activating ในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องในกระบวนการต่อต้านสิ่งแปลกปลอม คือเซลล์เม็ดเลือดและเซลล์จับกินอยู่กับที่ (Fixed Phagocyte) ที่กระจายอยู่ตามเนื้อเยื่อต่างๆ โดยกระบวนการแต่ละชนิดทำงานดังนี้

1) กระบวนการแข็งตัวของเลือดและสมานบาดแผล (Clotting and Wound Healing) เป็นกระบวนการที่ยับยั้งการสูญเสียเลือดเมื่อเกิดบาดแผลและป้องกันการติดเชื้อ การแข็งตัวของเลือดจะเกิดจากการทำงานของเม็ดเลือดไฮยาลินและโคแอคกลูโลเจน (Coagologen)

2) การจับกิน (Phagocytosis) เกิดขึ้นเมื่อเม็ดเลือดเซมิกรานูลลาร์พบสิ่งแปลกปลอมโดยจะยื่นไซโทพลาสซึมไปล้อมรอบสิ่งแปลกปลอมแล้วกลืนเข้าสู่ภายในเซลล์ จากนั้นจะนำออกซิเจนเข้าสู่เซลล์และออกซิเจนจะถูกรีดิวส์เป็นซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออนและจะถูกเปลี่ยนไปเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และไฮดรอกซิลเรดิคอล ซึ่งสารทั้งสองชนิดนี้จะเป็นตัวทำให้สิ่งแปลกปลอมที่ถูกกลืนกินเข้าไปในเซลล์ถูกทำลาย

3) การสร้างโนดูล (Nodule Formation) เมื่อมีสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกายในปริมาณมากจนเกินความสามารถของการจับกินที่จะทำลายได้ทัน ดังนั้นเซลล์เม็ดเลือดจะมารวมกันมากขึ้นเพื่อล้อมรอบไม่ให้สิ่งแปลกปลอมนั้นแพร่กระจายไปได้

4) การห่อหุ้ม (Encapsulation) เกิดขึ้นเมื่อมีสิ่งแปลกปลอมขนาดใหญ่เข้าสู่ร่างกายหรือเชื้อที่ทำอันตรายต่อร่างกายเพิ่มจำนวนจนการสร้างโนดูลไม่สามารถควบคุมได้ ดังนั้นเซลล์เม็ดเลือดจำนวนมากจะเข้าล้อมรอบและมีการทำงานของระบบ Prophenoloxidase Activating เข้ามาทำงานร่วมด้วย

5) ระบบ Prophenoloxidase Activating เป็นระบบการสร้างเม็ดสีดำที่เรียกว่าเมลานิน (Melanin Pigment) ซึ่งเป็นตัวทำลายสิ่งแปลกปลอม ระบบนี้ทำงานโดยอาศัยองค์ประกอบของเอนไซม์โพรฟีนอลออกซิเดส (Prophenoloxidase) ซึ่งจะพบได้ในเม็ดกรานูลในไซโทพลาสซึมของเม็ดเลือดชนิดเซมิกรานูลลาร์และกรานูลลาร์ การทำงานจะเริ่มต้นเมื่อเซลล์เม็ดเลือดที่มีกรานูลถูกกระตุ้นด้วยผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ที่มีองค์ประกอบจำพวกไลโปพอลิแซคคาไรด์ เบต้า-1,3 กลูแคน และผลิตภัณฑ์สุดท้ายจะได้เป็นเมลานินซึ่งเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ (กิจการ ศุภมาตย์ และคณะ, 2543)

การกระตุ้นภูมิคุ้มกันของโพรไบโอติกเกิดจากองค์ประกอบของผนังเซลล์จำพวกเบต้า-1,3 กลูแคน ไลโปพอลิแซคคาไรด์ เปปติโดไกลแคนและมูรามิลไดเปปไทด์ (Anderson, 1992; Vargas-Albores et al., 1998) โดยสารประกอบเหล่านี้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคกลุ่ม Vibrios และไวรัสตัวแดงจุดขาว (White Spot Syndrome Virus; Itami et al., 1998)

5. รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

ปาจรีย์ จือเหลียง และคณะ (2555) ได้ทำการศึกษาผลของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในการควบคุม *V. harveyi* และอัตราการรอดชีวิตในการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม โดยทำการคัดแยกแบคทีเรียจากผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก ซึ่งคัดแยกได้ 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Brevibacillus parabrevis*, *Bacillus velezensis*, *B. amyloliquifaciens*, *B. subtilis* และ *B. megaterium* จากนั้นนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* ด้วยวิธี Agar wells plate ผลการทดสอบพบว่าแบคทีเรียโพรไบโอติกทั้ง 5 สายพันธุ์ มีความสามารถในการยับยั้ง *V. harveyi* ได้ดีภายในเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการศึกษาผลของโพรไบโอติกต่ออัตราการรอดชีวิตและการเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไมขนาดน้ำหนัก 7 - 8 กรัม โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุดการทดลอง คือ ชุดควบคุม (เลี้ยงด้วยอาหารปกติ) และชุดทดลอง ซึ่งเลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปที่ผสมผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกในอัตราส่วนโพรไบโอติก 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม โดยทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน ผลการทดลองพบว่าอัตราการรอดชีวิตของกุ้งขาวแวนนาไมในชุดทดลอง (75.00 ± 1.92%) มีค่าสูงกว่าชุดควบคุม (63.33 ± 2.72%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แต่น้ำหนัก

เฉลี่ยของกุ้งในกลุ่มทดลอง (21.55 ± 1.98 กรัม) มีค่าไม่แตกต่างกับชุดควบคุม (23.70 ± 1.57 กรัม) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05)

Rengpipat et al. (2000) ได้ศึกษาผลของ *Bacillus* S11 ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกต่อการเสริมภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์ (Cellular defenses) ได้แก่ กระบวนการกลืนทำลาย (Phagocytosis) และฟีนอลออกซิเดส (Phenoloxidase) และภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยสารน้ำ (Humoral defenses) ได้แก่ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (Antibacterial activity) ในกุ้งกุลาดำ โดยเลี้ยงกุ้งกุลาดำในถังพลาสติกกลมที่มีระบบหมุนเวียนน้ำแบบปิดเป็นเวลา 90 วัน พบว่ากลุ่มที่ได้รับโพรไบโอติกมีอัตราการรอดชีวิตและน้ำหนักสูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับโพรไบโอติก อีกทั้งมีปริมาณเม็ดเลือดรวม การกลืนทำลายและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียสูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับโพรไบโอติก เมื่อครบ 90 วันของการทดลองได้เหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 ที่มีความรุนแรงกว่าสายพันธุ์ D331 เป็นเวลา 10 วัน ซึ่งกุ้งกุลาดำที่ได้รับโพรไบโอติกมีอัตราการรอดชีวิตร้อยละ 54.3 สูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับโพรไบโอติกคือมีค่าเท่ากับร้อยละ 35.5 ซึ่งเป็นผลมาจาก *Bacillus* S11 กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยสารน้ำและระบบภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์ รวมทั้งการแข่งขันแย่งชิงอาหารในท่อทางเดินอาหารทำให้เชื้อก่อโรคไม่สามารถเจริญได้

Vaseeharan and Ramasamy (2003) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของ *Bacillus* ในการต่อต้านเชื้อ *Vibrio* โดยทำการศึกษาทั้งในระดับสัตว์ทดลองและระดับห้องปฏิบัติการ โดยในระดับห้องปฏิบัติการได้ใช้สารสกัดจากเซลล์ *B. subtilis* สายพันธุ์ BT23 ในการต้านการเจริญของ *V. harveyi* ที่แยกได้จากกุ้งกุลาดำ เพื่อดูประสิทธิภาพของ *Bacillus* ที่มีคุณสมบัติเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติก ขณะที่การศึกษาในระดับสัตว์ทดลองได้นำ *B. subtilis* BT23 ที่ความเข้มข้น 10^6-10^8 CFU/ml เลี้ยงกุ้งกุลาดำเป็นเวลา 6 วัน ก่อนที่จะกระตุ้นให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* ที่ความเข้มข้น 10^3-10^4 CFU/ml เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่ากุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วย *B. subtilis* BT23 สามารถลดอัตราการตายสะสมได้ร้อยละ 90 และพบว่า *B. subtilis* BT23 สามารถควบคุมการเจริญของ Vibrios ได้ทั้งในระดับห้องปฏิบัติการและระดับสัตว์ทดลอง

Gullian et al. (2004) ทำการคัดเลือกแบคทีเรีย 80 สายพันธุ์ ที่แยกได้จาก Hepatopancreas ของกุ้งที่มีสุขภาพดีจากฟาร์มในประเทศเอกวาดอร์ โดยใช้วิธี Agar Diffusion Technique และ Monoclonal Antibody พบว่า *Vibrio* P62, *Vibrio* P63 และ *Bacillus* P64 สามารถยับยั้ง *V. harveyi* (S2) ได้เป็นอย่างดี โดยสามารถยับยั้งได้ 54 %, 19 % และ 34 % ตามลำดับ จากนั้นนำแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์นี้ ไปทดลองกับกุ้งขาวแวนนาไม โดยทำการทดสอบความเป็นเชื้อก่อโรคและการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อเซลล์ผู้ให้อาศัย ซึ่งใช้ *V. alginolyticus* (Ili) เป็นชุดควบคุมผลบวก และกุ้งที่ไม่ได้รับโพรไบโอติกเป็นกลุ่มควบคุมผลลบ จากการทดลองพบว่า *Bacillus* P64 สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดีใกล้เคียงกับ *V. alginolyticus* ขณะที่ *Vibrio* P62 กระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ในระดับต่ำ และกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับโพรไบโอติกทั้ง 3 สายพันธุ์ มีน้ำหนักตัวมากกว่ากุ้งขาวแวนนาไมที่ไม่ได้รับโพรไบโอติก

Ochoa-Solano and Olmos-Soto (2006) ได้ทำการคัดเลือกแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* ที่สามารถแยกได้จากดินตะกอนน้ำเค็ม จากนั้นนำมาศึกษาความสามารถในการเจริญและย่อยสารอาหารในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีราคาไม่แพง (Soybean Mineral Medium) จากการศึกษาพบว่า

Bacillus ทั้งหมด 3 สายพันธุ์ คือ *Bacillus subtilis*, *B. megaterium* และ *B. megaterium* ที่สามารถเจริญและผลิตเอนไซม์ออกมาย่อยสารประเภทคาร์โบไฮเดรต ไขมัน และโปรตีนในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดี ดังนั้น *Bacillus* สายพันธุ์ดังกล่าวจึงน่าจะนำมาประยุกต์ใช้เป็นโพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล เพื่อส่งเสริมประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอาหารและเพิ่มการดูดซึมสารอาหารของกุ้ง

Ziaei-Nejad et al. (2006) ได้ทำการศึกษาผลของ *Bacillus* ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ อัตราการรอดชีวิตและอัตราการเจริญเติบโตของกุ้งขาวอินเดีย (*Fenneropenaeus indicus*) ใน 3 ระยะ ได้แก่ ระยะนอร์เพลียสถึงซูเอีย ซึ่งให้โพรไบโอติกด้วยการเติมลงในน้ำที่เพาะเลี้ยง ระยะไมซิสถึงโพสลาวา 14 ให้โพรไบโอติกด้วยการเติมลงในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงและอาหาร (อาร์ทีเมีย) และระยะสุดท้าย คือ ระยะโพสลาวา 30-120 ให้โพรไบโอติกด้วยการเติมลงในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงเช่นเดียวกัน จากการทดลองได้ทำการนับจำนวน *Bacillus* ในท่อทางเดินอาหาร เมื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า ปริมาณ *Bacillus* ในท่อทางเดินอาหารที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียที่เติมโพรไบโอติกมีมากกว่าการเติมโพรไบโอติกลงในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยง รวมทั้งกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอสและไลเปสของกุ้งขาวอินเดียที่เติมโพรไบโอติกมีระดับที่สูงกว่ากลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้รับโพรไบโอติกอย่างชัดเจน นอกจากนี้อัตราการเจริญเติบโต อัตราการรอดชีวิตและอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อของกุ้งที่ได้รับโพรไบโอติกยังมีค่าที่ดีกว่ากุ้งที่ไม่ได้รับโพรไบโอติกอีกด้วย ดังนั้นการเลี้ยงกุ้งด้วยโพรไบโอติกตั้งแต่ยังเพาะเลี้ยงอยู่ในโรงเพาะเลี้ยงจนถึงเพาะเลี้ยงอยู่ในฟาร์มจะช่วยพัฒนาการเจริญเติบโตของกุ้งขาวอินเดียได้เป็นอย่างดี

Balcazar et al. (2007) ได้คัดแยก *Vibrio alginolyticus* UTM 102, *Bacillus subtilis* UTM 126, *Roseobacter gallaeciensis* SL V03 และ *Pseudomonas aestumarina* SL V22 จากทางเดินอาหารของกุ้งขาวแวนนาไม จากนั้นนำมาผสมกับอาหารเพื่อใช้เป็นโพรไบโอติกสำหรับเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมเป็นเวลา 28 วัน พบว่ากุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับ *R. gallaeciensis* SL V03 เป็นโพรไบโอติกมีอัตราการรอดชีวิตและน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นสูงที่สุดโดยมีค่าเท่ากับ 96.00 ± 1.98 % และ 4.08 ± 0.12 ตามลำดับ และมีอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อเท่ากับ 0.74 ± 0.10 ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) กับกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับแบคทีเรียโพรไบโอติกชนิดอื่น แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับกลุ่มควบคุมที่มีค่าเท่ากับ 89.75 ± 1.96 %, 3.46 ± 0.22 % และ 0.98 ± 0.11 % ตามลำดับ สรุปได้ว่าจุลินทรีย์โพรไบโอติกทางการค้าและจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่คัดแยกได้จากทางเดินอาหารของกุ้งขาวแวนนาไมสามารถช่วยให้การเจริญเติบโต การรอดชีวิตเพิ่มสูงขึ้น และมีอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อลดลง

Nimrat (2007) ได้ศึกษาถึงผลของโพรไบโอติกที่สามารถผลิตเอนไซม์เพื่อย่อยสลายสารอาหารในการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ในบ่อเพาะเลี้ยง โดยใช้แบคทีเรีย 6 ชนิด คือ *Bacillus* spp. 5 ชนิด และอีก 1 ชนิด คือ *Oceanisphaera* sp. จากการศึกษาประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์พบว่า *Bacillus* ทุกไอโซเลท สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส และไลเปสได้ ในขณะที่ *Oceanisphaera* sp. สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้เพียงชนิดเดียว จากนั้นได้ทำการทดลองนำแบคทีเรียผสมทั้ง 6 ชนิด ใส่ในน้ำและดินตะกอนจากบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ พบว่ามีประสิทธิภาพในการลดปริมาณแอมโมเนียมไอออน ไนไทรต์และไนเทรตสูงกว่าชุดที่ไม่ได้เติม

แบคทีเรียผสม แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ได้ทำการคัดเลือกมาใช้ในการทดลองทั้ง 6 ชนิด มีประสิทธิภาพในการควบคุมระดับของปริมาณแอมโมเนียมไอออน ไนไทรต์ และไนเทรตได้

Balcazar and Rojas Luma (2009) นำ *Bacillus subtilis* UTM 16 ไปผสมกับอาหารเพาะเลี้ยงกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ที่ติดเชื้อ *Vibrio harveyi* เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ไม่เติมโพรไบโอติก) พบว่ากุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยโพรไบโอติกมีอัตราการตายเท่ากับ 18.25% ซึ่งต่ำกว่าชุดควบคุม (51.75 %) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.001$) นอกจากนั้นการเติมโพรไบโอติกยังสามารถเพิ่มปริมาณ *Bacillus* ใน Hepatopancreas ของกุ้งขาวให้มีค่าเท่ากับ $2.7\pm0.41\times10^5$ CFU/g ในขณะที่ชุดควบคุมมีปริมาณ *Bacillus* น้อยกว่า 42 CFU/g ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าการใช้ *B. subtilis* UTM 126 ในการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลสามารถลดอัตราการตายของกุ้งทะเลที่ติดเชื้อ *V. harveyi* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Boonthai et al. (2011) ทำการศึกษาโดยใช้แบคทีเรียโพรไบโอติกผสม 2 รูปแบบ คือ โพร-ไบโอติกรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์แห้งแบบแช่เยือกแข็งเติมลงในอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำ จากนั้นนำมาเลี้ยงกุ้งกุลาดำอายุ 1 เดือน เป็นเวลา 120 วัน โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมแบคทีเรียโพรไบโอติก จากการทดลองพบว่ากุ้งกุลาดำชุดการทดลองที่ได้รับโพรไบโอติกรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์แห้งแบบแช่เยือกแข็งมีปริมาณ *Vibrio* ในตับลดลง 46.13 % และ 34.86 % ตามลำดับ และปริมาณ *Vibrio* ในลำไส้ลดลง 62.21 % และ 34.89 % ตามลำดับ ในทางตรงกันข้ามปริมาณ *Vibrio* ใน Hepatopacreas และลำไส้กุ้งกุลาดำของชุดควบคุมมีปริมาณเพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียโพรไบโอติกที่เติมในอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณของ *Vibrio* ในกุ้งกุลาดำ สำหรับปริมาณแบคทีเรียโพรไบโอติกใน Hepatopacreas ของกุ้งกุลาดำชุดที่ได้รับโพรไบโอติกรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์แห้งแบบแช่เยือกแข็งเพิ่มขึ้น 103.33 % และ 103.69 % ตามลำดับ และปริมาณแบคทีเรียโพรไบโอติกในลำไส้กุ้งกุลาดำเพิ่มขึ้น 95.47 % และ 115.65 % ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียโพรไบโอติกสามารถเพิ่มจำนวนและมีชีวิตอยู่ในระบบทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำได้ ดังนั้นแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมที่ใช้ในการทดลองมีคุณสมบัติเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ดี เนื่องจากสามารถลดปริมาณแบคทีเรียก่อโรค

ต่อมาพบว่ามีรูปแบบใหม่ของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่มีความสามารถทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดีกว่าแบคทีเรียโพรไบโอติกในรูปแบบผงหรือแบบการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งจากรายงานของ

Kailasapathy (2002) ได้รายงานถึงข้อดีของแบคทีเรียโพรไบโอติกในรูปแบบใหม่นั่นคือในรูปแบบไมโครแคปซูล (Microcapsule) เหนือกว่าในรูปแบบผงหรือแบบการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ได้แก่ ความสามารถในการทนต่อสภาวะการเก็บรักษาทำให้เก็บรักษาได้นานกว่า, ทนต่อสภาวะในการผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ในระดับอุตสาหกรรมทำให้มีปริมาณของผลิตภัณฑ์เหลือจากกระบวนการผลิตมากกว่า, ทนต่อระบบทางเดินอาหารที่มีสภาวะเป็นกรด, ทนทานต่อการย่อยของเอนไซม์ รวมทั้งยังทนต่อเกลือน้ำดีในลำไส้เล็กของสิ่งมีชีวิตจึงทำให้มีปริมาณของแบคทีเรียโพรไบโอติกในสิ่งมีชีวิตมากกว่ารูปแบบอื่น

Kanmani et al. (2011) ได้ทำการทดสอบแบคทีเรียโพรไบโอติกในรูปแบบไมโครแคปซูลในระบบทางเดินอาหารจำลองของหนู ผลการศึกษาพบว่าถุงไมโครแคปซูลมีปริมาณคงที่เมื่อผ่านทางเดินอาหารในส่วนกระเพาะอาหารและส่วนลำไส้เล็กจำลองและจะแตกตัวรวมทั้งปลดปล่อยแบคทีเรียโพรไบโอติกในส่วนของระบบทางเดินอาหารโดยตรง ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าแบคทีเรียโพรไบโอติกในรูปไมโครแคปซูลเป็นรูปแบบที่มีประสิทธิภาพที่ดีที่สุดโดยสามารถป้องกันแบคทีเรียโพรไบโอติกได้นานขึ้น รวมทั้งจะทำการปลดปล่อยแบคทีเรียโพรไบโอติกในระบบทางเดินอาหารได้โดยตรงโดยไม่มีการตายในช่วงการเคลื่อนที่มาสู่ระบบทางเดินอาหารของหนูนั่นเอง

Luzardo-Alvarez et al. (2010) ได้รายงานถึงการพัฒนาอาหารสัตว์น้ำทดแทนอาหารสดที่มีราคาแพงและมีการปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์ก่อโรค และได้ทำการพัฒนาอาหารเคลือบด้วยไมโคร-แคปซูลซึ่งสามารถพัฒนาอาหารที่ไม่มีการปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์ก่อโรครวมทั้งมีราคาถูกเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารสด

บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

1. สัตว์ทดลอง

ลูกกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 15

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1 Marine Agar (MA; Lab-Scan, Bangkok, Thailand)

2.2 Plate Count Agar (PCA; Difco, Spark, USA)

2.3 Thiosulphate Citrate Bile salt Sucrose (TCBS) agar (Difco, Spark, USA)

2.4 Tryptic Soy Agar (TSA; Difco, Spark, USA)

2.5 Tryptic Soy Broth (TSB; Difco, Spark, USA)

2.6 *Vibrio harveyi* Agar (VHA)

2.7 Peptone water (Bacto, Spark, USA)

2.8 Normal saline (Ajax, Auckland, New Zealand)

3. สารเคมีสำหรับเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1 Chloramphenicol (Sigma, Germany)

3.2 Hydrochloric acid (J.T. Baker, USA)

3.3 Sodium chloride (Ajax, Auckland, New Zealand)

3.4 Sodium hydroxide (Merk, Darmstadt, Germany)

4. สารเคมีสำหรับสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์แบคทีเรีย

4.1 Chloroform (BDH prolabo, Fontenay-sous-Bois, France)

4.2 Ethanol (BDH prolabo, Fontenay-sous-Bois, France)

4.3 Isoproponal (BDH prolabo, Fontenay-sous-Bois, France)

4.4 20 mg/mL proteinase K (Vivantis, Malaysia)

4.5 Saturated Phenol (BDH prolabo, Fontenay-sous-Bois, France)

4.6 10% (w/v) Sodium dodecyl sulfate (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden)

4.7 Sodium acetate (Merk, Darmstadt, Germany)

4.8 TE buffer (10 mM TRis-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA)

5. สารเคมี เอนไซม์ และไพรเมอร์ สำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์

5.1 ไพรเมอร์ (BioDesign, Bangkok, Thailand)

- Forward primer 5’ GAGTTTGATCCTGGCTCAG 3’
- Rerse primer 5’ACGGCTACCTTGTTACGACTT 3’

5.2 *Pfu* DNA polymerase (Vivantis, Malaysia)

5.3 PCR reaction buffer (Vivantis, Malaysia)

5.4 $MgCl_2$ (Vivantis, Malaysia)

5.5 dNTP mix (Vivantis, Malaysia)

6. สารเคมีสำหรับทำอิเล็กโตรโฟเรซิส

6.1 Agarose (Vivantis, Malaysia)

6.2 VC 100 bp DNA ladder (Vivantis, Malaysia)

6.3 VC 1 kb DNA ladder (Vivantis, Malaysia)

6.4 10 mg/mL Ethidium bromide

6.5 50 X TAE buffer (Vivantis, Malaysia)

6.6 6X loading dye (Fermentas, EU)

7. ชุดทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอ (Wizard® SV Gel and PCR Clean-UP System, Promega, USA)

8. อุปกรณ์

8.1 กระบอกตวง (Cylinder)

8.2 กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1

8.3 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)

8.4 คิวเวต (Cuvette)

8.5 จานเพาะเชื้อ (Petri dish)

8.6 แท่งแก้วกระจายเชื้อ (Spreader)

8.7 แท่งแม่เหล็ก (Magnetic bar)

8.8 หลอดปั่นเหวี่ยง (Centrifuge tube)

8.9 บ่อเลี้ยงกุ้งจำลองขนาด 100 ลิตร

9. เครื่องมือ

9.1 กล้องจุลทรรศน์ (Microscope; Olympus, CH30RF200, Japan)

9.2 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker; Innova, 4340, USA)

9.3 เครื่องชั่งแบบทศนิยม 2 ตำแหน่ง (A&D, HR-200, Greifensee, Japan)

9.4 เครื่องชั่งแบบทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo, AT200, Switzerland)

9.5 เครื่องแช่เยือกแข็ง (Freeze dryer; Heto, lyoLab 3000, Allerod, Denmark)

9.6 เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer; Vortex-2 Genie, 2-101915, USA)

9.7 เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Centrifuge; Eppendoff, Cectrifuge 5804R, Germany)

9.8 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer; Cintra 400 Double beam, Melbourne, Australia)

9.9 เครื่องวัดความขุ่น (Turbidimeter; HACH, 2100 N, USA)

9.10 เครื่องวัดความเค็ม (Salinity Refractometer; Atago, 2441-W05, Japan)

9.11 เครื่องวัดความความเป็นกรด-ด่าง (Denver instrument, UB-10, Bangkok, Thailand)

9.12 เครื่องวัดปริมาณออกซิเจน (DO meter; YSI, 85, USA)

9.13 เครื่องให้ความร้อน (Hot plate; Heidolph, 3001, Germany)

9.14 ตู้บ่มเพาะเชื้ออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Incubator; Memmert, BE 400, Schwabach, Germany)

9.15 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven; WTB Binder, Germany)

9.16 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow; Super clean VC 150, Bangkok, Thailand)

9.17 หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave; Wisd Laboratory Instrument, Seoul, Korea)

9.18 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath; Memmert, GmbH + Co KG 8540, Schwabach, Germany)

9.19 ออโตปิเปต (Autopipette; Gilson, NEO, Villiers-le-Bel, France)

9.20 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR Thermal cycle; Biometra T-Gradient, Gottingen, Germany)

9.21 ชุดแยกชิ้นดีเอ็นเอภายใต้กระแสไฟฟ้า (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

9.22 เครื่อง UV-transilluminator (Spectroline รุ่น TVC-312A, Wesbury, NY, USA)

10. แบคทีเรีย

10.1 แบคทีเรียโพรไบโอติก สายพันธุ์ BUU 001, BUU 002, BUU 003, BUU 004 และ BUU 005 จากห้องปฏิบัติการของ รศ. ดร. สุบัณฑิต นิ่มรัตน์

10.2 *V. harveyi* สายพันธุ์ 002

วิธีดำเนินการวิจัย

จากการศึกษาในปีงบประมาณที่ผ่านมาที่ได้ทำการศึกษาถึงประสิทธิภาพของโพรไบโอติกในรูปแบบไมโครแคปซูลเปรียบเทียบกับรูปแบบการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งในการต้านทานแบคทีเรียก่อโรคของกุ้งขาวแวนนาไม โดยศึกษาจากการเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด *Bacillus* แบคทีเรียทางทะเล แบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae และ *Vibrio harveyi* ใน Hepatopancreas-Intestine และน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยง รวมทั้งอัตราการเจริญเติบโต และอัตราการรอดชีวิต ในช่วงก่อนและหลังการทดสอบความต้านทานแบคทีเรียก่อโรค ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จะทำการศึกษาต่อเนื่องโดยทำการศึกษาถึงผลของแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมในรูปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งและรูปไมโครแคปซูลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางกายภาพและเคมีของน้ำใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในบ่อเพาะเลี้ยงจำลอง การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียใน Hepatopancreas-Intestine และน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมด้วยวิธีทางชีวเคมีและชีวโมเลกุล และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ดังรายละเอียดต่อไปนี้

1. การเก็บรวบรวมพันธุ์กุ้งขาวแวนนาไม

ซื้อลูกกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 15 (Postlarva 15 หรือ P15) จากไบโอเทคฟาร์ม ตำบลอ่างศิลา อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี โดยนำลูกกุ้งลงปรับสภาพในถังไฟเบอร์ขนาด 500 ลิตร และเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเม็ดสำเร็จรูป (โปรตีน 38%, ไขมัน 5%, กาก 3% และความชื้น 11%; ซีพี 9001, เจริญโภคภัณฑ์อาหารสัตว์ จำกัด, สมุทรสาคร, ประเทศไทย) โดยให้อาหารวันละ 3 มื้อ และเปลี่ยนถ่ายน้ำวันละ 10% ทุก ๆ วัน เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ ก่อนนำไปใช้ในการทดลอง เพื่อให้ลูกกุ้งขาวเข้าสู่ระยะโพสลาวา 30 (P30)

2. การเตรียมเซลล์แบคทีเรียโพรไบโอติกในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งและแบบไมโครแคปซูลสำหรับใช้เพาะเลี้ยงกุ้งเพื่อศึกษาความต้านทานแบคทีเรียก่อโรคของกุ้งขาวแวนนาไม

2.1 การเตรียมเซลล์แบคทีเรียโพรไบโอติกในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

เตรียมเซลล์แบคทีเรียโพรไบโอติก BUU 001, BUU 002, BUU 003, BUU 004 และ BUU 005 ในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งตามวิธีการของ Boonthai et al. (2011) และ Nimrat et al. (2011) โดยนำแบคทีเรียโพรไบโอติก สายพันธุ์ BUU 001, BUU 002, BUU 003, BUU 004 และ BUU 005 เพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์แบคทีเรียโพรไบโอติกที่ได้แต่ละชนิดไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และเทส่วนใสทิ้ง เติม 0.1% Peptone water ให้ได้ปริมาตรเท่าเดิม นำไปปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอนอีกครั้งทำจนครบ 3 รอบ เพื่อเป็นการล้างเซลล์ ต่อมานำ Cell suspension ของแบคทีเรียโพรไบโอติกแต่ละชนิดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 580 นาโนเมตร ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.5 AU ซึ่งจะมีปริมาณเซลล์แบคทีเรียโพรไบโอติกเท่ากับ 10^{10} CFU/ml และนำ Cell suspension ของแบคทีเรียโพรไบโอติกแต่ละชนิดที่มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.5 AU มาเติม

20% (w/v) Skim milk solution ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10% (w/v) Skim milk solution จากนั้นแช่แข็งในตู้แช่ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำมาแช่ในเครื่อง Freeze dryer เป็นเวลา 60 ชั่วโมง จากนั้นนำผงเซลล์ของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ได้มานับปริมาณเซลล์เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อตั้งต้นสำหรับเติมลงในอาหารเลี้ยงกุ้งต่อไป

2.2 การเตรียมเซลล์แบคทีเรียโพรไบโอติกในรูปไมโครแคปซูล

การเตรียมเซลล์แบคทีเรียโพรไบโอติก BUU 001, BUU 002, BUU 003, BUU 004 และ BUU 005 ในรูปไมโครแคปซูลตามวิธีการของ Nimrat et al. (2011) โดยนำ Cell suspension ของแบคทีเรียปริมาตร 25 มิลลิลิตร เติมลงในสารละลาย 3% (w/v) Sodium alginate ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วย Vortex หยดสารละลาย Alginate-cell mixture ด้วย Dropper อย่างช้า ๆ ที่ด้านข้างบีกเกอร์ที่บรรจุน้ำมันข้าวโพดปริมาตร 600 มิลลิลิตร ที่ผสม 0.2% (v/v) Tween 80 เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าแบบมีแม่เหล็ก (Magnetic stirrer) ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เติมสารละลาย Calcium chloride ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่ด้านข้างบีกเกอร์ ซึ่งไมโครแคปซูลจะเกิดขึ้นภายใน 5 นาที นำสารละลายมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที กรองไมโครแคปซูลด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 ในสภาวะสุญญากาศ และชะไมโครแคปซูลที่อยู่บนกระดาษกรองด้วย 0.1% (w/v) Peptone water กรองไมโครแคปซูลด้วยตาข่าย (Plankton net) ขนาด 55 ไมโครเมตร แล้วล้างไมโครแคปซูลด้วย 0.1% (w/v) Peptone water และเก็บไมโครแคปซูลในอาหารเลี้ยงเชื้อ 0.1% Peptone water ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกระทั่งนำไปใช้ในการทดลอง

3. การเตรียมบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งจำลองเพื่อศึกษาประสิทธิภาพของโพรไบโอติกในรูปแบบการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งเปรียบเทียบกับรูปแบบไมโครแคปซูลในการต้านทานแบคทีเรียก่อโรคของกุ้งขาวแวนนาไม

เตรียมบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งจำลองขนาด 100 ลิตร โดยแบ่งออกเป็น 3 ชุดการทดลอง ได้แก่

ชุดที่ 1 เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมในรูปไมโครแคปซูลลงในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งให้ได้ความเข้มข้น 10^8 CFU/ml จำนวน 3 บ่อ

ชุดที่ 2 เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งลงในอาหารเลี้ยงกุ้งให้ได้ความเข้มข้น 10^8 CFU/ml จำนวน 3 บ่อ

ชุดที่ 3 ไม่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติก (ควบคุม) จำนวน 3 บ่อ

เติมน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อลงในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งจำลอง (ค่าความเค็มของน้ำเท่ากับ 20 ส่วนในพันส่วน; ppt) จากนั้นปล่อยกุ้งขาวแวนนาไมลงในบ่อทั้ง 9 บ่อ ๆ ละ 50 ตัว ให้อาหารในช่วงเวลา 7.00 น. 15.00 น. และ 23.00 น. ตามลำดับ โดยชุดการทดลองที่ 2 (ชุด FB) จะเติมแบคทีเรีย *Bacillus* โพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งลงในอาหารเลี้ยงกุ้งให้ได้ความเข้มข้น 10^8 CFU/ml และให้อาหารเลี้ยงกุ้งวันละ 3 ครั้ง ส่วนชุดการทดลองที่ 3 (ชุด MB) จะเติมแบคทีเรีย

Bacillus โพรไบโอติกผสมในรูปไมโครแคปซูลลงในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งให้ได้ความเข้มข้น 10^8 CFU/ml วันละ 3 ครั้ง ในช่วงเวลาที่ให้อาหารเลี้ยงกุ้ง

ในช่วงก่อนทดสอบความต้านทานโรคที่เกิดจาก *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 จะทำการเพาะเลี้ยงกุ้งเป็นระยะเวลานาน 30 วัน และทำการเก็บตัวอย่างกุ้งขาวแวนนาไมและน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงมาศึกษาอัตราส่วนของ *Bacillus* ต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดใน Hepatopancreas-Intestine และในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงจำนวน 2 ครั้ง คือ ในวันเริ่มต้นการทดลอง (ชั่วโมงที่ 2 ของการทดลอง) และในวันที่ 30 ของการทดลอง จากนั้นจะทำการทดสอบความต้านทานโรคที่เกิดจาก *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 โดยเติม *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ลงในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10^6 CFU/ml และทำการเพาะเลี้ยงกุ้งต่อเป็นระยะเวลานาน 10 วัน โดยทำการเก็บตัวอย่างกุ้งขาวแวนนาไมและน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงมาศึกษาอัตราส่วนของ *Bacillus* ต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดใน Hepatopancreas-Intestine และในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงจำนวน 8 ครั้ง คือ เริ่มต้นการทดลอง (ชั่วโมงที่ 2 ของการทดลอง), วันที่ 1, 2, 3, 4, 5, 7 และ 10 ของการทดลอง

4. การศึกษาผลของแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมในรูปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งและรูปไมโครแคปซูลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางกายภาพและเคมีของน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในบ่อเพาะเลี้ยงจำลอง

ทำการตรวจวัดคุณภาพน้ำทางกายภาพและเคมี ได้แก่ ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมตรวจวัดด้วย pH meter ค่าความขุ่นของน้ำตรวจวัดด้วยเครื่องวัดความขุ่น (Turbidity meter) ค่าความเค็มตรวจวัดด้วยเครื่อง Salinometer Refractometer ค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำและอุณหภูมิของน้ำในบ่อเพาะเลี้ยงตรวจวัดด้วยเครื่อง DO meter ตามวิธีการของ Smith et al. (2002) การวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนีย ตามวิธีการของ American Water Works Association and Water Pollution Control Federation (1980) การวิเคราะห์ปริมาณไนเทรตตามวิธีการของ Association of Official American Chemists [AOAC] (2002) การวิเคราะห์ปริมาณไนไทรต์ ตามวิธีการของ Stickland and Parson (1972) และการวิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟตตามวิธีการของ American Water Works Association and Water Pollution Control Federation (1980) โดยทำการสุ่มเก็บตัวอย่างน้ำในบ่อที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมมาวิเคราะห์ ณ เวลา 05.00 น. และ 14.00 น. ทุก ๆ 7 วัน และหลังจากเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ทำการศึกษาคุณภาพน้ำทุก ๆ วัน ตลอดระยะเวลา 10 วัน

5. การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียใน Hepatopancreas-Intestine และน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมด้วยวิธีทางชีวเคมีและชีวโมเลกุล

5.1 การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยวิธีทางชีวเคมี

คัดเลือกโคโลนีของแบคทีเรียจากตัวอย่าง Hepatopancreas-Intestine และน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม จากโครงการวิจัยปีก่อนหน้า (โครงการวิจัยเรื่องการพัฒนาผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกรูปแบบใหม่เพื่อการควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรคและส่งเสริมการเจริญเติบโตของกุ้งขาว

แวนนาไม ปีงบประมาณ พ.ศ. 2560) โดยเลือกโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกันบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Marine Agar (MA), Thiosulphate Citrate Bile salt Sucrose (TCBS) agar และ *Vibrio harveyi* Agar (VHA) และจดบันทึกลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียแต่ละชนิด จากนั้นนำไปแยกให้ได้โคโลนีเดี่ยว และนำมาศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้นเพื่อจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรีย โดยการจัดจำแนกแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ตามวิธีการของ Holt et al. (1994) และ Krieg and Holt (1984) การจัดจำแนกแบคทีเรียวงศ์ Micrococcaceae และ Pseudomonadaceae ตามวิธีการของ Koneman et al. (2006) และการจัดจำแนกแบคทีเรียวงศ์ Bacillaceae ตามวิธีการของ Sneath et al. (1986)

5.2 การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล

5.2.1 การเตรียมตัวอย่างและสกัดดีเอ็นเอ (Sambrook et al., 1989)

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth + 2% (w/v) NaCl เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์แบคทีเรียปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใส่ใน Microcentrifuge tube ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติมสารละลาย TE buffer ปริมาตร 467 ไมโครลิตร ใช้ออโตปิเปตดูดสารละลายขึ้นลงเพื่อกระจายเซลล์ เติม 10% (w/v) SDS ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และ Proteinase K (20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม Phenol/Chloroform ในปริมาตรที่เท่ากันกับตัวอย่าง ผสมโดยการกลับหลอดไปมา และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดของเหลวส่วนบน (สารละลายดีเอ็นเอ) ใส่ลงใน Microcentrifuge tube หลอดใหม่และเติม Phenol/Chloroform ในปริมาตรที่เท่ากันกับตัวอย่าง ผสมโดยการกลับหลอดไปมา นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และเก็บสารละลายดีเอ็นเอส่วนบนใส่หลอดใหม่และเติม Sodium acetate ความเข้มข้น 3 โมลาร์ (pH 5.2) ปริมาตร 0.1 เท่า และเติม Isopropanol ปริมาตร 0.6 เท่า ผสมเบา ๆ โดยการกลับหลอดไปมา จนกระทั่งดีเอ็นเอตกตะกอน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งส่วน Isopropanol และเติม 70% (v/v) Ethanol ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วน Ethanol ทิ้งไปและนำหลอดที่มีตะกอนดีเอ็นเออยู่มาวางคว่ำบนกระดาษทิชชูที่สะอาด ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง หรือที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และละลายดีเอ็นเอในสารละลาย TE buffer หรือน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ปริมาตร 15-20 ไมโครลิตร

5.2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

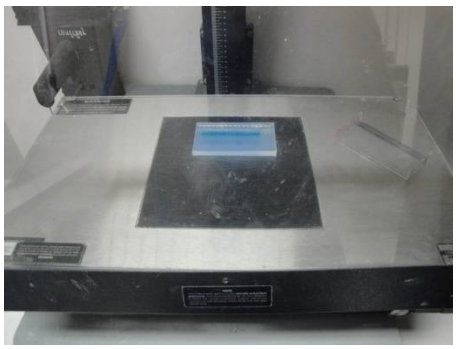
นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 5.2.1 มาเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA (16S rDNA) ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ Universal eubacterial primers (forward primer 5’ AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3’ และ Reverse primer 5’ ACGGCT ACCTTGTTACGACTT 3’) (Weisburg et al., 1991) ในสารละลายที่ใช้ทำปฏิกิริยา (ปริมาตร 50 ไมโครลิตร) ต่อหนึ่งตัวอย่าง ประกอบด้วย 1X reaction buffer (10 mM Tris-HCl pH 9.1, 50

mM KCl), 2.5 mM $MgCl_2$, 100 µM dNTP, 0.64 µM ของไพรเมอร์แต่ละชนิด, 1.25 U *Pfu* DNA Polymerase และ DNA Template ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้ได้ปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปิดฝาหลอดปฏิกิริยาให้สนิทและนำไปเข้าเครื่อง PCR Thermocycler โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

Initiation denaturation	95 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	2 นาที	
Denaturation	94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	20 วินาที	30 รอบ
Annealing	42 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	30 วินาที	
Extension	72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	2 นาที	
Final elongation	72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	7 นาที	1 รอบ

หลังจากทำการเพิ่มปริมาณเรียบร้อยแล้วนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ไปทำการตรวจสอบโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟริซีสบน 1% (w/v) อะกาโรสเจลใช้ TAE เป็นบับเฟอร์ หลังจากนั้นนำเจลที่ได้มาย้อมด้วย Ethidium bromide (ความเข้มข้นสุดท้าย 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 20 นาที และตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV-transilluminator พร้อมบันทึกภาพ

(ก)



(ข)

ภาพที่ 3 (ก) เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR Thermal cycle)
(ข) เครื่อง UV-transilluminator

5.2.3 การทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากข้อ 5.2.2 มาทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟริซีส ความเข้มข้น 0.8 % (w/v) เทียบกับ DNA มาตรฐาน 100 bp DNA ladder และตัดชิ้นเจลที่มีผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วนำมาทำบริสุทธิ์ โดยใช้ชุดทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอ (Wizard® SV Gel and PCR Clean-UP System, Promega, Madison, WI, USA) ตามวิธีที่แนะนำจากบริษัท (Promega, Madison, WI, USA) หลังจากนั้นนำมาทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟริซีสเปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐาน 1 kb DNA ladder

5.2.4 การอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากข้อ 5.2.3 ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยส่งบริษัท First BASE Laboratories ประเทศมาเลเซีย โดยใช้ไพรเมอร์ชุดเดียวกับที่ทำพีซีอาร์ในข้อ 5.2.2

5.2.5 การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA

นำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากข้อ 5.2.4 มาตรวจความถูกต้องของลำดับนิว-คลีโอไทด์และหาบริเวณซ้อนทับ (Overlap sequence) โดยใช้โปรแกรม BioEdit Version 7.0.0 (Hall, 1999) จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ในฐานข้อมูลโดยใช้ EzTaxon-e server (http://eztaxon-e.ezbiocloud.net; Kim et al., 2012)

5.2.6 การวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวงศ์วานวิวัฒนาการ

ทำการรวบรวมข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียที่ต้องการจำแนก จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดมาทำการจัดเรียงลำดับโดยใช้เทคนิค Iterative refinement methods ด้วยโปรแกรม MUSCLE Version 3.7 (Edgar, 2004) และทำการกำจัดตำแหน่งของลำดับนิวคลีโทด์ที่ไม่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวงศ์วานวิวัฒนาการออกโดยใช้โปรแกรม Gblocks Version 0.91b (Talavera and Castresana, 2007) และนำลำดับนิวคลีโทด์ที่ได้มาวิเคราะห์หาโมเดลที่เหมาะสมด้วยโปรแกรม jModel Test Version 2.1 (Posada, 2008) จากนั้นสร้างแผนภาพสายสัมพันธ์ทางวงศ์วานวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ด้วยเทคนิค Distance-based methods แบบ Neighbor-joining ด้วยโปรแกรม Mega Version 5 (Tamura et al., 2011) โดยวิเคราะห์หาค่า Bootstrap จำนวน 1,000 ครั้ง เปรียบเทียบกับเทคนิค Character-based methods ด้วยวิธีพาร์สิโมรี (Parsimony) ด้วยโปรแกรม Mega Version 5 โดยวิเคราะห์หาค่า Bootstrap จำนวน 1,000 ครั้ง และวิธีแม็กซิมัมไลค์ลิฮูด (Maximum likelihood) ด้วยโปรแกรม Phy ML Version 3.0 (Guindon and Gascual, 2008) โดยวิเคราะห์หาค่า Bootstrap จำนวน 100 ครั้ง ซึ่งในแต่ละเทคนิคจะเลือกใช้โมเดลที่เหมาะสมสำหรับสร้างแผนภาพสายสัมพันธ์ทางวงศ์วานวิวัฒนาการ และเลือกนำเสนอแผนภาพสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) จากเทคนิคที่มีความน่าเชื่อถือมากที่สุดโดยดูจากค่า Bootstrap และจะแสดงค่า Bootstrap เฉพาะบริเวณที่มีค่า Bootstrap ≥ 50% เท่านั้น

6. วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ

1) ศึกษาอัตราส่วนของ *Bacillus* ต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปใน Hepatopancreas-Intestine ของกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 30 ในช่วงก่อนและหลังทดสอบความต้านทานโรคที่เกิดจาก *V. harveyi* สายพันธุ์ 002

2) ศึกษาอัตราส่วนของ *Bacillus* ต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 30 ในช่วงก่อนและหลังทดสอบความต้านทานโรคที่เกิดจาก *V. harveyi* สายพันธุ์ 002

3) การวิเคราะห์สัดส่วน (%) และชนิดของแบคทีเรียทางทะเลใน Hepatopancreas-Intestine ของกุ้งขาวแวนนาไมในช่วงก่อนและหลังการทดสอบความต้านทานต่อแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* สายพันธุ์ 002

4) การวิเคราะห์สัดส่วน (%) และชนิดของแบคทีเรียทางทะเลในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในช่วงก่อนและหลังการทดสอบความต้านทานต่อแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* สายพันธุ์ 002

5) การวิเคราะห์สัดส่วน (%) และชนิดของแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ใน Hepatopancreas-Intestine ของกุ้งขาวแวนนาไมที่เจริญบนอาหาร TCBS agar ในช่วงก่อนและหลังทดสอบความต้านทานแบคทีเรียก่อโรคจาก *V. harveyi* สายพันธุ์ 002

6) การวิเคราะห์สัดส่วน (%) และชนิดของแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมที่เจริญบนอาหาร TCBS agar ในช่วงก่อนและหลังทดสอบความต้านทานต่อแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* สายพันธุ์ 002

7) การวิเคราะห์สัดส่วน (%) ของ *V. harveyi* และแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ชนิดอื่น ๆ ใน Hepatopancreas-Intestine ของกุ้งขาวแวนนาไมที่เจริญบนอาหาร VHA ในช่วงก่อนและหลังทดสอบความต้านทานต่อแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* สายพันธุ์ 002

8) การวิเคราะห์สัดส่วน (%) และชนิดของแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมที่เจริญบนอาหาร VHA ในช่วงก่อนและหลังการทดสอบความต้านทานแบคทีเรียก่อโรคจาก *V. harveyi* สายพันธุ์ 002

7. การวิเคราะห์ข้อมูลสถิติ

นำข้อมูลที่ได้แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบเชิงซ้อนด้วย Duncan’s multiple rang test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

บทที่ 4
ผลการทดลอง

จากการศึกษาถึงผลของแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมในรูปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งและรูปไมโครแคปซูลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางกายภาพและเคมีของน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในบ่อเพาะเลี้ยงจำลอง การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียใน Hepatopancreas-Intestine และน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมด้วยวิธีทางชีวเคมีและชีวโมเลกุล และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ผลการทดลองแสดงดังต่อไปนี้

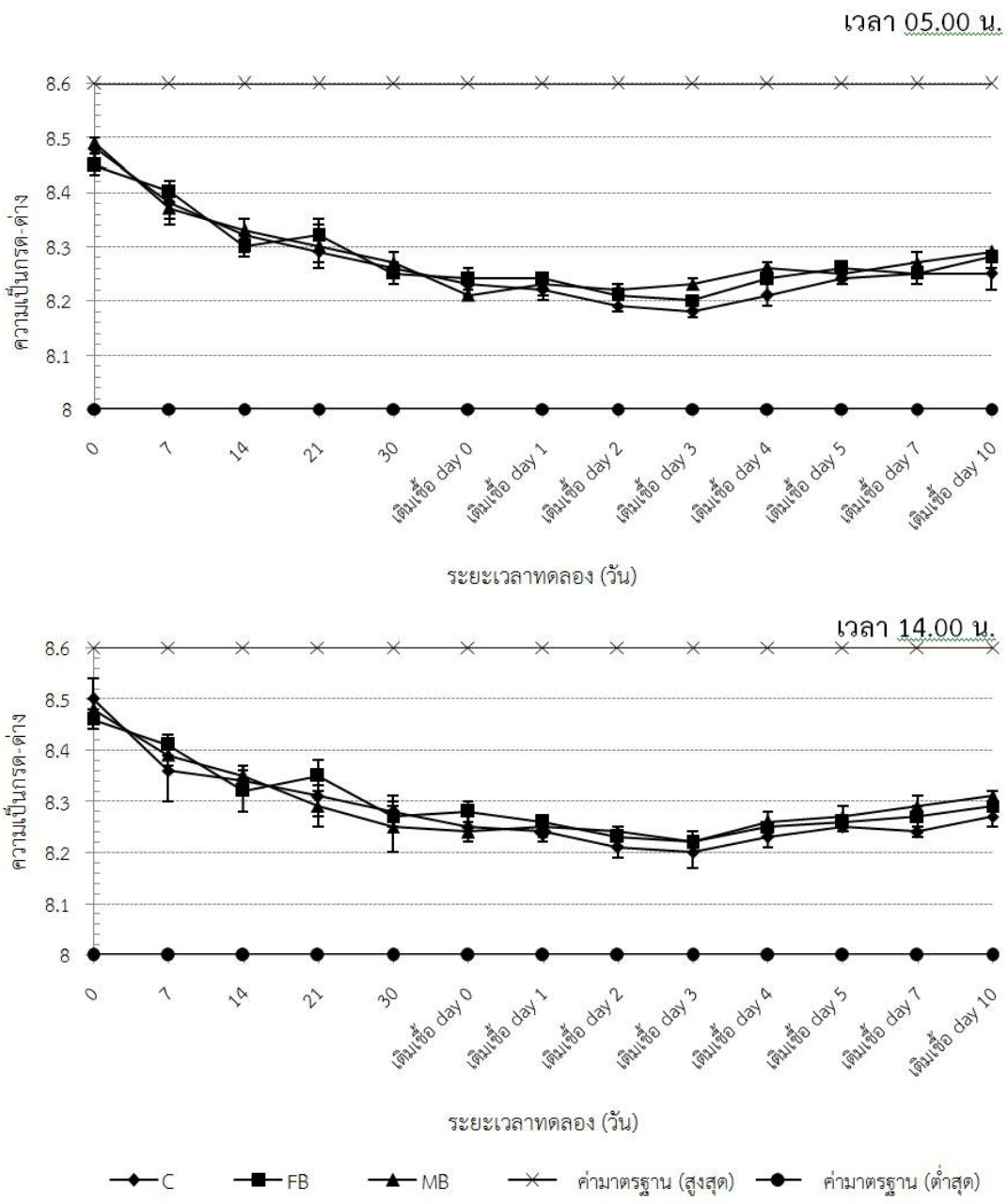
1. ผลของแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมในรูปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งและรูปไมโครแคปซูลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางกายภาพและเคมีของน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในบ่อเพาะเลี้ยงจำลอง

จากการศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียโพรไบโอติกชนิดต่าง ๆ ต่อคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของน้ำในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม โดยทำการตรวจวัดคุณภาพน้ำทางกายภาพและเคมี ได้แก่ ความขุ่น ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ อุณหภูมิ ความเค็ม แอมโมเนีย ไนไทรต์ ไนเทรตและฟอสเฟต โดยเก็บตัวอย่างน้ำ 2 ช่วงเวลา คือ 5.00 และ 14.00 น. ได้ผลการทดลองดังนี้

1.1 ค่าความเป็นกรด-ด่าง

ค่าความเป็นกรด-ด่าง ของน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม ณ เวลา 5.00 น. ของชุดควบคุม ชุดการทดลอง FB และ MB มีค่าเท่ากับ 8.48 ± 0.02, 8.45 ± 0.02 และ 8.49 ± 0.01 ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) จากนั้นค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมมีแนวโน้มลดลงเล็กน้อยจนถึงวันที่ 30 ของการทดลอง โดยในชุดควบคุม ชุดการทดลอง FB และ MB มีค่าเท่ากับ 8.26 ± 0.01, 8.25 ± 0.02 และ 8.27 ± 0.02 ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) เมื่อทำการทดสอบความต้านทานแบคทีเรียก่อโรคพบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมทั้ง 3 ชุดการทดลองมีแนวโน้มลดลงจดถึงวันที่ 3 ของการทดสอบความต้านทานแบคทีเรียก่อโรค โดยในชุดควบคุม ชุดการทดลอง FB และ MB มีค่าเท่ากับ 8.18 ± 0.01, 8.20 ± 0.01 และ 8.23 ± 0.01 ตามลำดับ จากนั้นค่าความเป็นกรด-ด่างของทั้ง 3 ชุดการทดลอง มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจนถึงวันสิ้นสุดการทดสอบความต้านทานแบคทีเรียก่อโรค โดยในชุดควบคุม ชุดการทดลอง FB และ MB มีค่าเท่ากับ 8.25 ± 0.03, 8.28 ± 0.02 และ 8.29 ± 0.02 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) ดังแสดงในภาพที่ 4

สำหรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ของน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม ณ เวลา 14.00 น. ของชุดควบคุม ชุดการทดลอง FB และ MB มีค่าค่อนข้างใกล้เคียงกับค่าความเป็นกรด-ด่าง ณ เวลา 5.00 น. แต่จะมีค่าสูงกว่าเล็กน้อย และมีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง ของน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงเช่นเดียวกับที่พบ ณ เวลา 5.00 น. ดังแสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 4 ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 30 ในช่วงก่อนและหลังการทดสอบความต้านทานต่อแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ณ เวลา 5.00 น. และเวลา 14.00 น.

หมายเหตุ C = ชุดควบคุม

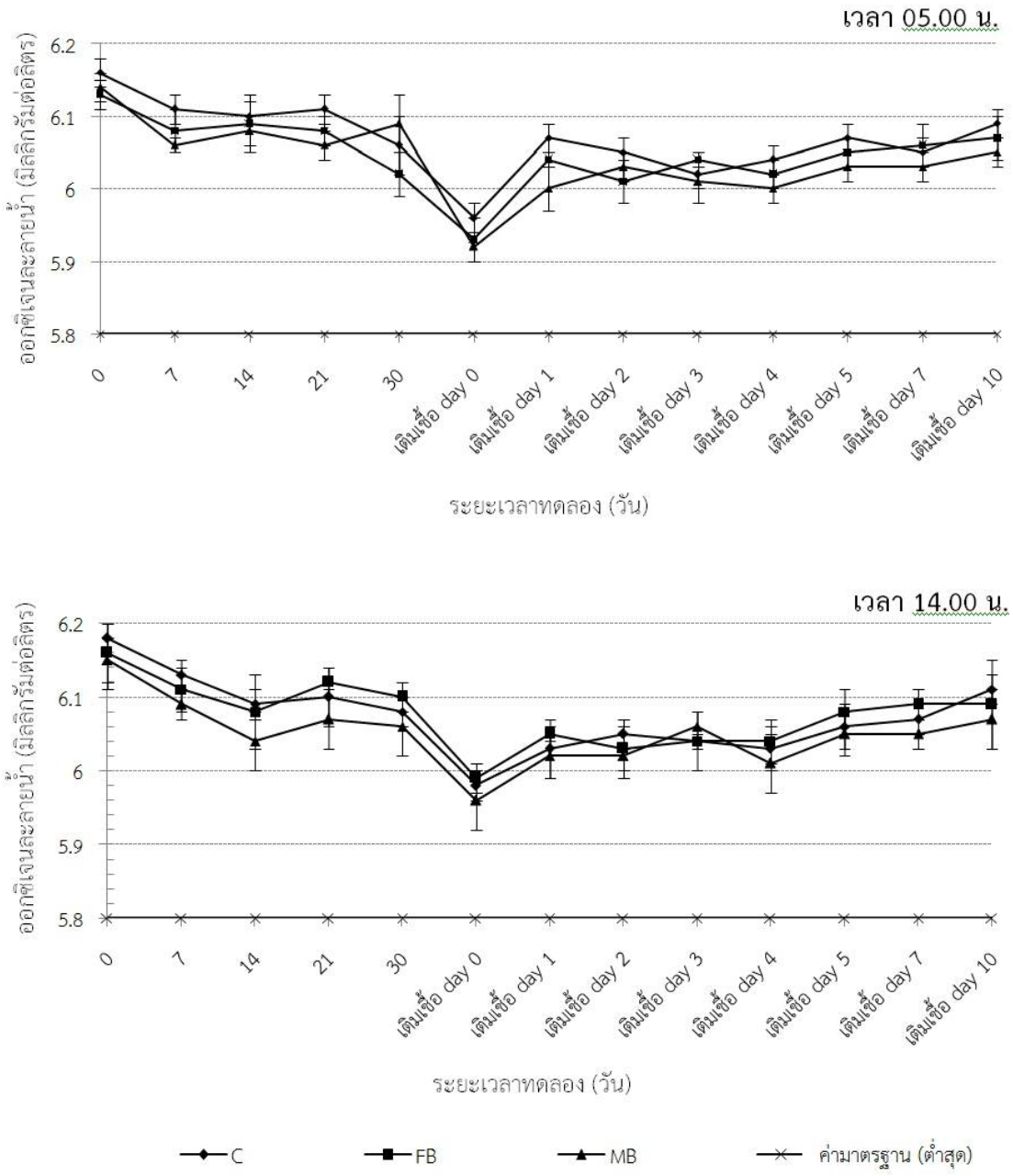
FB = ชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งลงในอาหารเลี้ยงกุ้งให้ได้ความเข้มข้น 10^8 CFU/g

MB = ชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมในรูปไมโครแคปซูลลงในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งให้ได้ความเข้มข้น 10^8 CFU/ml

1.2 ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ (DO)

ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ ณ เวลา 5.00 น. ของชุดควบคุม ชุดการทดลอง FB และ MB ในช่วงเริ่มต้นการทดลองมีค่าเท่ากับ 6.16 ± 0.02, 6.13 ± 0.02 และ 6.14 ± 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งค่าดังกล่าวไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) เมื่อทำการทดลองเป็นเวลา 30 วัน พบว่าปริมาณออกซิเจนละลายน้ำของทั้ง 3 ชุดการทดลอง มีแนวโน้มลดลง โดยชุดควบคุม ชุดการทดลอง FB และ MB มีค่าเท่ากับ 6.06 ± 0.04, 6.02 ± 0.03 และ 6.09 ± 0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งค่าดังกล่าวไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) เมื่อทำการทดสอบความต้านทานต่อแบคทีเรียก่อโรคพบว่าหลังจากเติม *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำของทั้ง 3 ชุดการทดลอง มีค่าลดลง โดยชุดควบคุม ชุดการทดลอง FB และ MB มีค่าเท่ากับ 5.96± 0.02, 5.93 ± 0.03 และ 5.92 ± 0.021 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากนั้นพบว่าปริมาณออกซิเจนละลายน้ำของทั้ง 3 ชุดการทดลอง มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจนถึงวันที่ 10 ของการทดสอบความต้านทานแบคทีเรียก่อโรค โดยชุดควบคุม ชุดการทดลอง FB และ MB มีค่าเท่ากับ 6.09 ± 0.02, 6.07 ± 0.03 และ 6.05 ± 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 5

ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ ณ เวลา 14.00 น. ของชุดควบคุม ชุดการทดลอง FB และ MB ตลอดระยะเวลาการทดลองมีแนวโน้มเช่นเดียวกับที่พบ ณ เวลา 05.00 น. โดยมีค่าสูงกว่าเล็กน้อย ดังแสดงในภาพที่ 5



ภาพที่ 5 ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 30 ในช่วงก่อนและหลังการทดสอบความต้านทานต่อแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ณ เวลา 5.00 น. และเวลา 14.00 น.

หมายเหตุ C = ชุดควบคุม

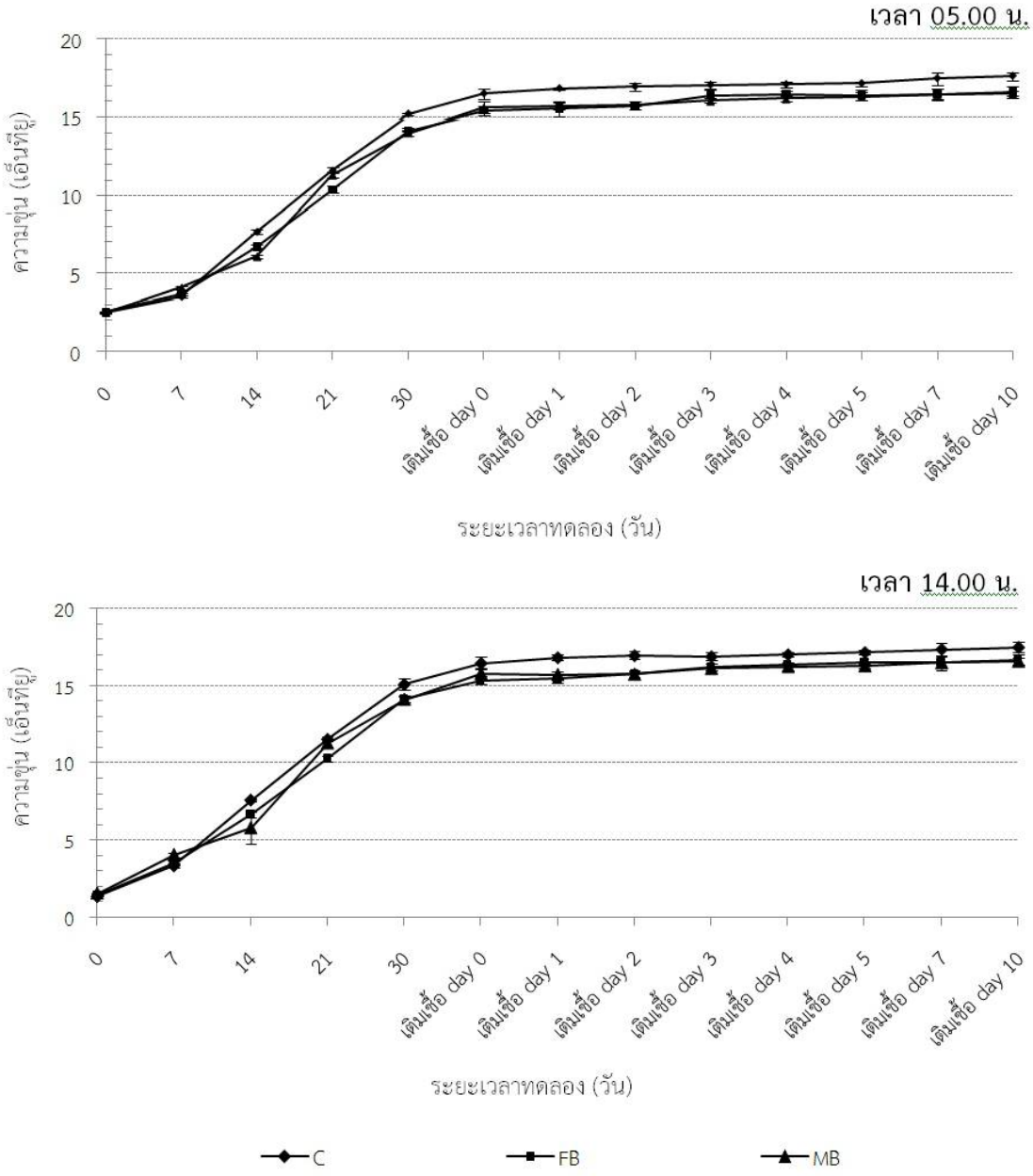
FB = ชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งลงในอาหารเลี้ยงกุ้งให้ได้ความเข้มข้น 10^8 CFU/g

MB = ชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมในรูปไมโครแคปซูลลงในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งให้ได้ความเข้มข้น 10^8 CFU/ml

1.3 ความขุ่น

ค่าความขุ่นของน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม ณ เวลา 5.00 น. ของชุดควบคุม ชุดการทดลอง FB และ MB ในช่วงเริ่มต้นการทดลองมีค่าเท่ากับ 2.46 ± 0.04, 2.53 ± 0.04 และ 2.48 ± 0.03 NTU ตามลำดับ ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) จากนั้นค่าความขุ่นในชุดควบคุมและชุดการทดลอง FB และ MB มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการทดลองจนถึงสิ้นสุดการทดลอง โดยเมื่อสิ้นสุดการทดลองค่าความขุ่นของน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในชุดควบคุม ชุดการทดลอง FB และ MB มีค่าเท่ากับ 17.60 ± 0.26, 16.60 ± 0.36 และ 16.49 ± 0.16 NTU ตามลำดับ ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) ดังแสดงในภาพที่ 6

ค่าความขุ่นของน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม ณ เวลา 14.00 น. ของชุดควบคุม ชุดการทดลอง FB และ MB ตลอดระยะเวลาการทดลองมีค่าใกล้เคียงกับ ณ เวลา 5.00 น. เล็กน้อย และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจนถึงสิ้นสุดการทดลองเช่นเดียวกัน ดังแสดงในภาพที่ 6



ภาพที่ 6 ค่าความขุ่นของน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 30 ในช่วงก่อนและหลังการทดสอบความต้านทานต่อแบคทีเรียก่อโรคจาก *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ณ เวลา 5.00 น. และเวลา 14.00 น.

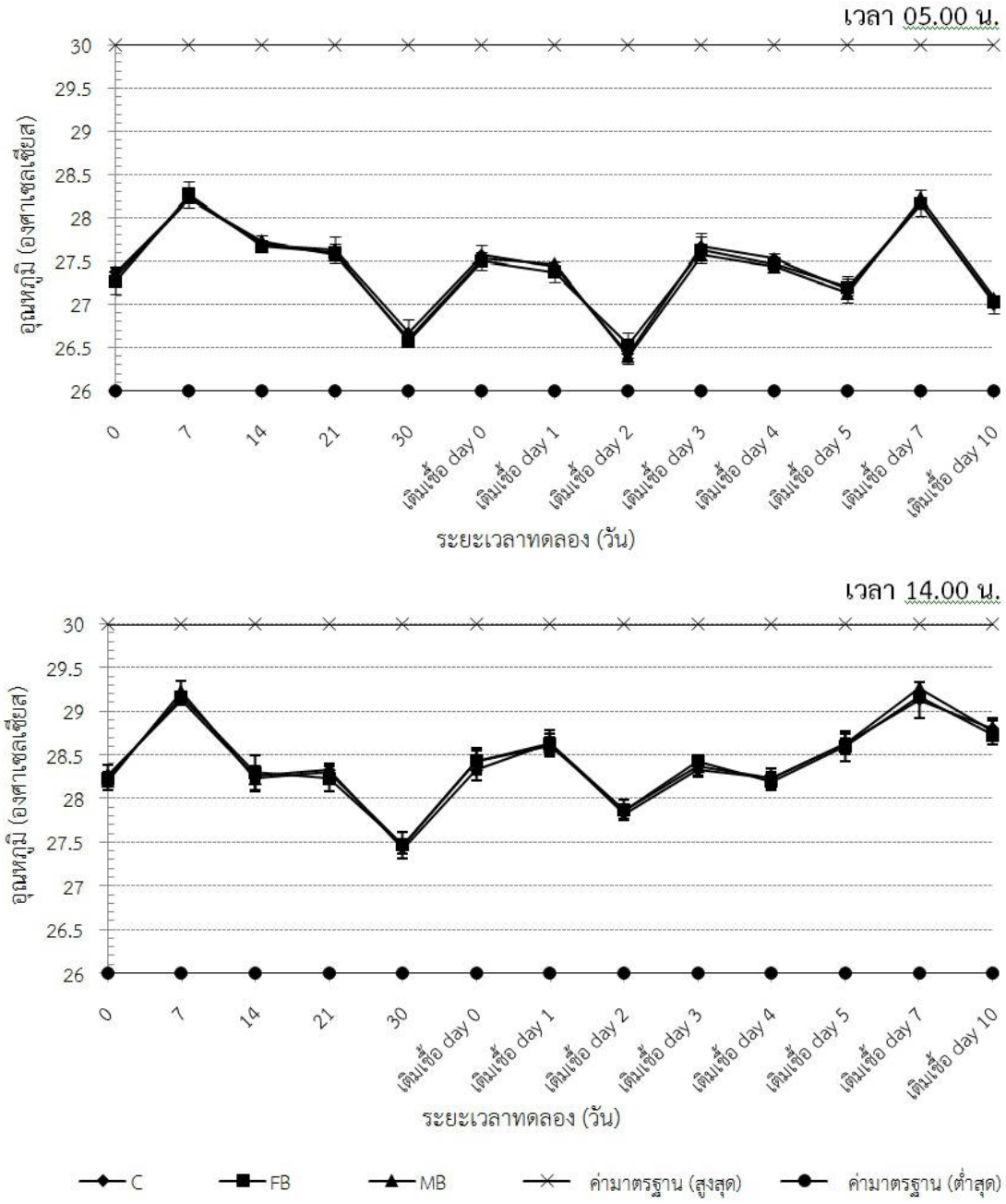
หมายเหตุ C = ชุดควบคุม

FB = ชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งลงในอาหารเลี้ยงกุ้งให้ได้ความเข้มข้น 10^8 CFU/g

MB = ชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมในรูปไมโครแคปซูลลงในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งให้ได้ความเข้มข้น 10^8 CFU/ml

1.4 อุณหภูมิ

อุณหภูมิของน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม ณ เวลา 5.00 น. ของชุดควบคุม ชุดการทดลอง FB และ MB ตลอดระยะเวลาการทดลองมีค่าอยู่ระหว่าง 26.40 ± 0.10 ถึง 28.27 ± 0.15 องศา-เซลเซียส ส่วนอุณหภูมิของน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม ณ เวลา 14.00 น. พบว่ามีอุณหภูมิของน้ำสูงกว่า ณ เวลา 5.00 น. เล็กน้อย โดยตลอดระยะเวลาการทดลองมีค่าอยู่ระหว่าง 27.43 ± 0.06 ถึง 29.27 ± 0.06 องศาเซลเซียส ดังแสดงในภาพที่ 7



ภาพที่ 7 อุณหภูมิของน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 30 ในช่วงก่อนและหลังการทดสอบความต้านทานต่อแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ณ เวลา 5.00 น. และเวลา 14.00 น.

หมายเหตุ C = ชุดควบคุม

FB = ชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งลงในอาหารเลี้ยงกุ้งให้ได้ความเข้มข้น 10^8 CFU/g

MB = ชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมในรูปไมโครแคปซูลลงในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งให้ได้ความเข้มข้น 10^8 CFU/ml

1.5 ความเค็ม

ความเค็มของน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมตลอดระยะเวลาการทดลองมีค่าเท่ากับ 20 ส่วนในพันส่วน

1.6 แอมโมเนีย

จากการศึกษาปริมาณแอมโมเนียในวันเริ่มต้นของการทดลอง ณ เวลา 05.00 น. ทั้ง 3 ชุดการทดลอง มีค่าใกล้เคียงกันและไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) โดยในชุดการทดลอง FB ชุดการทดลอง MB และชุดควบคุม มีค่าเท่ากับ 0.37 ± 0.02, 0.32 ± 0.01 และ 0.38 ± 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ หลังจากเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมเป็นระยะเวลา 30 วัน พบว่าปริมาณแอมโมเนียในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมทั้ง 3 ชุดการทดลอง มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นโดยในชุดควบคุมมีปริมาณแอมโมเนียสูงที่สุดโดยมีค่าเท่ากับ 0.86 ± 0.09 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมากกว่าชุดการทดลองที่เติมโพรไบโอติกผสมทั้ง 2 ชุดการทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยปริมาณแอมโมเนียในชุดการทดลอง FB และชุดการทดลอง MB มีค่าเท่ากับ 0.69 ± 0.04 และ 0.67 ± 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และพบว่าปริมาณแอมโมเนียในชุดการทดลอง FB และชุดการทดลอง MB มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05)

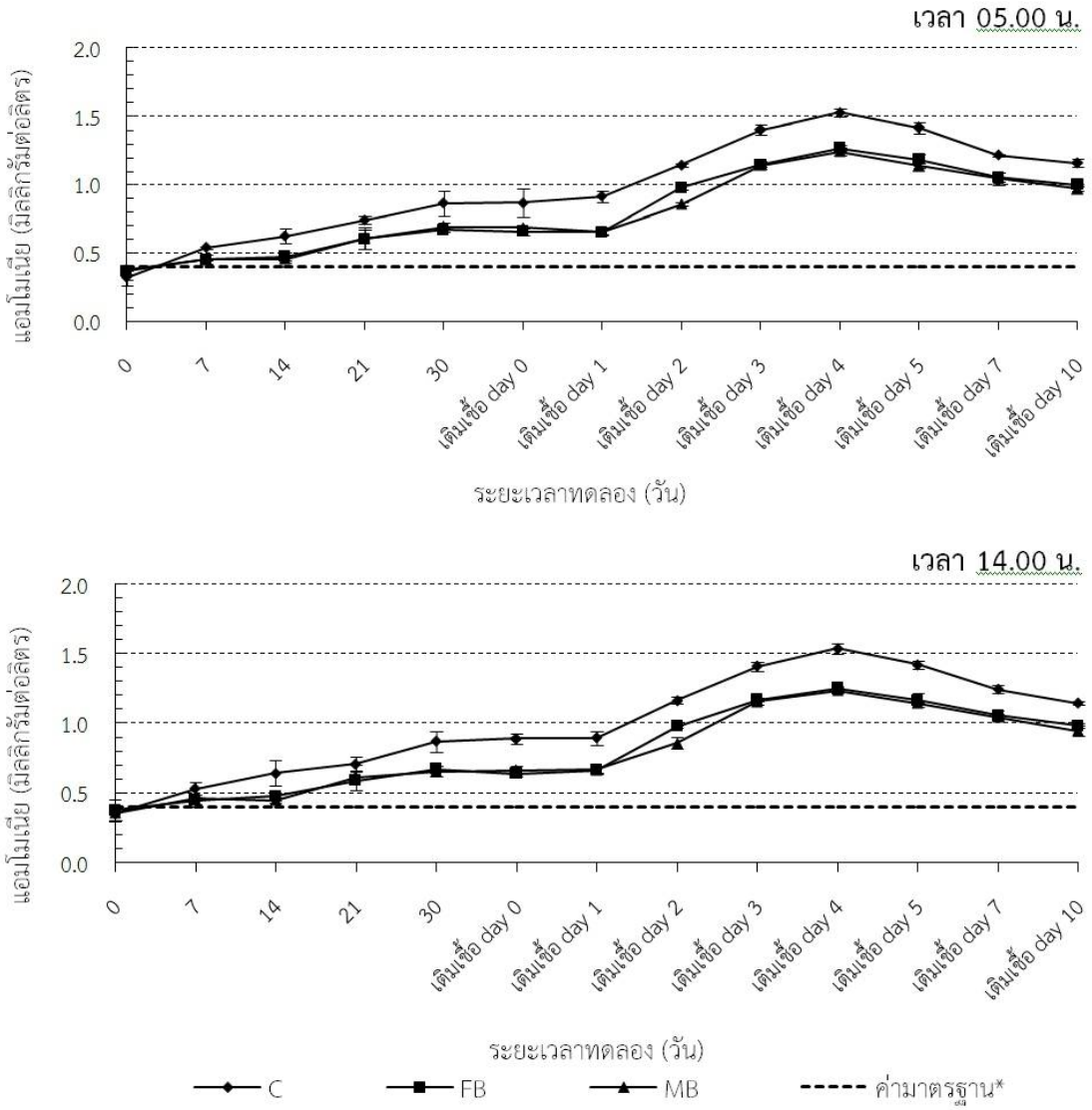
เมื่อทำการทดสอบความต้านทานต่อโรคของกุ้งขาวแวนนาไม โดยการเติม *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ลงในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมให้ได้ความเข้มข้น 10^6 CFU/ml พบว่าปริมาณแอมโมเนียในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมทั้ง 3 ชุดการทดลอง มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น โดยเพิ่มขึ้นสูงที่สุดในวันที่ 4 ของการทดสอบความต้านโรคกุ้งขาวแวนนาไม โดยปริมาณแอมโมเนียในชุดควบคุมเพิ่มขึ้นสูงที่สุด (1.53 ± 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร) และแตกต่างจากชุดการทดลอง FB และชุดการทดลอง MB (ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.27 ± 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 1.24 ± 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) และพบว่าปริมาณแอมโมเนียในชุดการทดลอง FB และชุดการทดลอง MB มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) หลังจากนั้นปริมาณแอมโมเนียทั้ง 3 ชุดการทดลอง มีแนวโน้มลดลงจนถึงวันสิ้นสุดการทดลองโดยในวันสิ้นสุดการทดลองพบว่าแอมโมเนียในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในชุดการทดลองที่เติมโพรไบโอติกผสมมีปริมาณน้อยกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยชุดการทดลอง MB มีค่าต่ำที่สุด (0.97 ± 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร) รองลงมาคือชุดการทดลอง FB (1.00 ± 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร) และชุดควบคุมมีปริมาณสูงที่สุด (1.18 ± 0.03 มิลลิกรัม) และพบว่าปริมาณแอมโมเนียในชุดการทดลอง FB และชุดการทดลอง MB ในวันสิ้นสุดการทดลองมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) ดังแสดงในภาพที่ 8

สำหรับปริมาณแอมโมเนียในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม ณ เวลา 14.00 น. ของทั้ง 4 ชุดการทดลอง มีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงเช่นเดียวกับปริมาณแอมโมเนียในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม ณ เวลา 05.00 น. กล่าวคือปริมาณแอมโมเนียในวันเริ่มต้นของการทดลอง ณ เวลา 14.00 น. ชุดการทดลอง FB ชุดการทดลอง MB และชุดควบคุมมีค่าเท่ากับ 0.38 ± 0.08, 0.36 ± 0.05 และ 0.35 ± 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งปริมาณแอมโมเนียทั้ง 3 ชุดการทดลอง มีค่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) ระหว่างกัน หลังจากเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมเป็นระยะเวลา 30 วัน

พบว่าปริมาณแอมโมเนียในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมทั้ง 3 ชุดการทดลอง มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น โดยปริมาณแอมโมเนียในชุดควบคุมเพิ่มขึ้นสูงที่สุดและมีค่าเท่ากับ 0.87 ± 0.08 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมากกว่าชุดการทดลอง FB (0.67 ± 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร) และชุดการทดลอง MB (0.65 ± 0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) และพบว่าปริมาณแอมโมเนียในชุดการทดลอง FB และชุดการทดลอง MB มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05)

เมื่อทำการทดสอบความต้านทานต่อโรคของกุ้งขาวแวนนาไมโดยการเติม *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ลงในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมให้ได้ความเข้มข้น 10^6 CFU/ml พบว่าปริมาณแอมโมเนียในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมทั้ง 3 ชุดการทดลอง มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นสูงที่สุดในวันที่ 4 ของการทดสอบความต้านโรคกุ้งขาวแวนนาไม โดยปริมาณแอมโมเนียในชุดควบคุมเพิ่มขึ้นสูงที่สุด (1.54 ± 0.00 มิลลิกรัมต่อลิตร) และแตกต่างจากชุดการทดลอง FB (1.25 ± 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร) และชุดการทดลอง MB (1.24 ± 0.12 มิลลิกรัมต่อลิตร) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) และพบว่าปริมาณแอมโมเนียในชุดการทดลอง FB และชุดการทดลอง MB มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) หลังจากนั้นปริมาณแอมโมเนียทั้ง 4 ชุดการทดลอง มีแนวโน้มลดลงจนถึงวันสิ้นสุดการทดลอง โดยในวันสิ้นสุดการทดลองพบว่าแอมโมเนียในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในชุดการทดลองที่เติมโพรไบโอติกผสมมีปริมาณน้อยกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยชุดการทดลอง MB มีค่าต่ำที่สุด (0.94 ± 0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร) รองลงมาคือชุดการทดลอง FB (0.98 ± 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร) และชุดควบคุมมีปริมาณสูงที่สุด (1.14 ± 0.01 มิลลิกรัม) และพบว่าปริมาณแอมโมเนียในชุดการทดลอง FB และชุดการทดลอง MB ในวันสิ้นสุดการทดลองมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) ดังแสดงในภาพที่ 8

เมื่อเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานสำหรับการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลไทย (ไม่ควรมีค่าเกิน 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร) พบว่าปริมาณแอมโมเนียในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมมีปริมาณเกินค่ามาตรฐาน ตั้งแต่วันที่ 7 ของการทดลอง แต่อย่างไรก็ตามพบว่าปริมาณแอมโมเนียในชุดการทดลองที่เติมโพรไบโอติกผสมในรูปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งและรูปแบบไมโครแคปซูลมีค่าต่ำกว่าชุดควบคุมตลอดระยะเวลาทดลอง ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่า *Bacillus* โพรไบโอติกผสมในรูปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งและรูปแบบไมโครแคปซูลมีประสิทธิภาพในการควบคุมปริมาณแอมโมเนียให้มีค่าต่ำกว่าชุดควบคุมและรูปแบบของการใช้โพรไบโอติกไม่มีผลต่อปริมาณแอมโมเนียในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม



ภาพที่ 8 ปริมาณแอมโมเนียในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 30 ในช่วงก่อนและหลังการทดสอบความต้านทานต่อแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ณ เวลา 5.00 น. และเวลา 14.00 น.

หมายเหตุ C = ชุดควบคุม

FB = ชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งลงในอาหารเลี้ยงกุ้งให้ได้ความเข้มข้น 10^8 CFU/g

MB = ชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมในรูปไมโครแคปซูลลงในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งให้ได้ความเข้มข้น 10^8 CFU/ml

* ค่ามาตรฐานจาก National Bureau of Agricultural Commodity and Food Standards, Ministry of Agriculture and Cooperatives (2009)

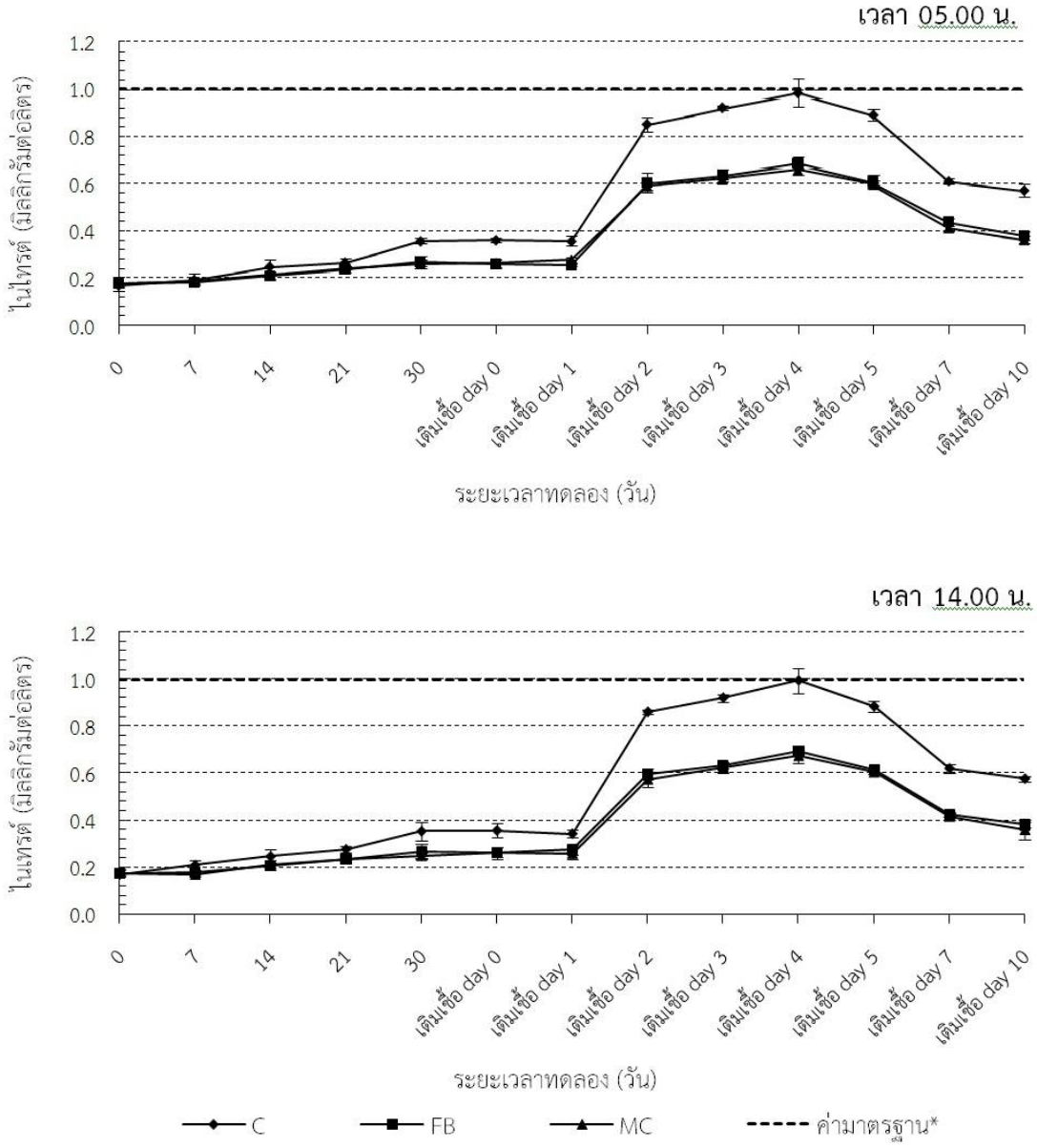
1.7 ไนไทรต์

จากการศึกษาปริมาณไนไทรต์ในวันเริ่มต้นของการทดลอง ณ เวลา 05.00 น. ทั้ง 3 ชุดการทดลอง มีค่าใกล้เคียงกันและไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) โดยในชุดการทดลอง FB ชุดการทดลอง MB และชุดควบคุม มีค่าเท่ากับ 0.18 ± 0.03, 0.18 ± 0.03 และ 0.17 ± 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) หลังจากเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมเป็นระยะเวลา 30 วัน พบว่าปริมาณไนไทรต์ในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมทั้ง 3 ชุดการทดลอง มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น โดยในชุดควบคุมมีปริมาณไนไทรต์เพิ่มขึ้นสูงที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 0.36 ± 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมากกว่าชุดการทดลองที่เติมโพรไบโอติกผสมในรูปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (FB) และรูปแบบไมโครแคปซูล (MB) (ซึ่งทั้ง 2 ชุดการทดลอง มีค่าเท่ากัน คือ 0.26 ± 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) และพบว่าปริมาณไนไทรต์ในชุดการทดลอง FB และชุดการทดลอง MB ในวันเริ่มต้นการทดลองมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) เมื่อทำการทดสอบความต้านทานต่อโรคของกุ้งขาวแวนนาไม โดยการเติม *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ลงในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมให้ได้ความเข้มข้น 10^6 CFU/ml พบว่าปริมาณไนไทรต์ในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมทั้ง 4 ชุดการทดลอง มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นสูงที่สุดในวันที่ 3 ของการทดสอบความต้านโรคกุ้งขาวแวนนาไม โดยปริมาณไนไทรต์ในชุดควบคุมเพิ่มขึ้นสูงที่สุด (0.98 ± 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร) และแตกต่างจากชุดการทดลอง FB (0.69 ± 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร) และชุดการทดลอง MB (0.66 ± 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) และพบว่าปริมาณไนไทรต์ในชุดการทดลอง FB และชุดการทดลอง MB ในวันที่ 4 ของการทดสอบความต้านทานโรคมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) หลังจากนั้นปริมาณไนไทรต์ทั้ง 4 ชุดการทดลอง มีแนวโน้มลดลงจนถึงวันสิ้นสุดการทดลอง โดยในวันสิ้นสุดการทดลองพบว่าไนไทรต์ในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในชุดการทดลองที่เติมโพรไบโอติกผสมมีค่าต่ำกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยไนไทรต์ในชุดการทดลอง MB มีค่าต่ำที่สุด (0.36 ± 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร) รองลงมาคือ ชุดการทดลอง FB ซึ่งมีปริมาณเท่ากันคือ 0.38 ± 0.02 และชุดควบคุมมีค่าสูงที่สุด (0.49 ± 0.01 มิลลิกรัม) และพบว่าปริมาณไนไทรต์ในชุดการทดลอง FB และชุดการทดลอง MB ในวันสิ้นสุดการทดลองมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) ดังแสดงในภาพที่ 9

สำหรับปริมาณไนไทรต์ในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม ณ เวลา 14.00 น. ทั้ง 3 ชุดการทดลอง มีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงเช่นเดียวกับปริมาณไนไทรต์ในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม ณ เวลา 05.00 น. กล่าวคือปริมาณไนไทรต์ในวันเริ่มต้นของการทดลอง ณ เวลา 14.00 น. ของชุดการทดลอง FB MB และชุดควบคุมมีค่าเท่ากับ 0.17 ± 0.02, 0.18 ± 0.02 และ 0.17 ± 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) ระหว่างกัน หลังจากเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมเป็นระยะเวลา 30 วัน พบว่าปริมาณไนไทรต์ในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมทั้ง 3 ชุดการทดลอง มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น โดยในชุดควบคุมมีปริมาณไนไทรต์เพิ่มขึ้นสูงที่สุดโดยมีค่าเท่ากับ 0.35 ± 0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมากกว่าชุดการทดลอง FB (0.27 ± 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร) และชุดการทดลอง MB (0.25 ± 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) และพบว่าปริมาณไนไทรต์ในชุดการทดลอง FB และชุดการทดลอง MB ในวันที่ 30 ของการทดลอง มีค่า

ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) เมื่อทำการทดสอบความต้านทานต่อโรคของกุ้งขาวแวนนาไม โดยการเติม *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ลงในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมให้ได้ความเข้มข้น 10^6 CFU/ml พบว่าปริมาณไนไทรต์ในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมทั้ง 3 ชุดการทดลอง มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นสูงที่สุดในวันที่ 4 ของการทดสอบความต้านโรคกุ้งขาวแวนนาไม โดยปริมาณไนไทรต์ในชุดควบคุมเพิ่มขึ้นสูงที่สุด (0.99 ± 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร) และแตกต่างจากชุดการทดลอง FB (0.69 ± 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร) และชุดการทดลอง MB (0.67 ± 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) และพบว่าปริมาณไนไทรต์ในชุดการทดลอง FB และชุดการทดลอง MB ในวันที่ 4 ของการทดสอบความต้านทานโรคมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) หลังจากนั้นปริมาณไนไทรต์ทั้ง 3 ชุดการทดลอง มีแนวโน้มลดลงจนถึงวันสิ้นสุดการทดลอง โดยในวันสิ้นสุดการทดลองพบว่าไนไทรต์ในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในชุดการทดลอง FB และชุดการทดลอง MB มีปริมาณต่ำกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยไนไทรต์ในชุดการทดลอง MB มีค่าต่ำที่สุด (0.36 ± 0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร) รองลงมาคือชุดการทดลอง FB (0.38 ± 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร) และชุดควบคุมมีปริมาณสูงที่สุดคือ 0.58 ± 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร และพบว่าปริมาณไนไทรต์ในชุดการทดลอง FB และชุดการทดลอง MB ในวันสิ้นสุดการทดลองมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) ดังแสดงในภาพที่ 9

เมื่อเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานสำหรับการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในประเทศไทย (ไนไทรต์ไม่ควรมีค่าเกิน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร) พบว่าไนไทรต์ในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมทั้ง 3 ชุดการทดลอง มีปริมาณไม่เกินค่ามาตรฐานตลอดระยะเวลาการทดลอง และยังพบว่าปริมาณไนไทรต์ในชุดการทดลองที่เติมโพรไบโอติกผสมมีค่าน้อยกว่าในชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) ตลอดระยะเวลาการทดลอง ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่า *Bacillus* โพรไบโอติกผสมในรูปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งและรูปแบบไมโครแคปซูลที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมมีประสิทธิภาพในการควบคุมปริมาณไนไทรต์ให้ต่ำกว่ามาตรฐานได้ดีกว่าชุดควบคุม และรูปแบบของโพรไบโอติกผสมไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณไนไทรต์ในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม



ภาพที่ 9 ปริมาณไนไทรต์ในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 30 ในช่วงก่อนและหลังการทดสอบความต้านทานต่อแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ณ เวลา 5.00 น. และเวลา 14.00 น.

หมายเหตุ C = ชุดควบคุม

FB = ชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งลงในอาหารเลี้ยงกุ้งให้ได้ความเข้มข้น 10^8 CFU/g

MB = ชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมในรูปไมโครแคปซูลลงในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งให้ได้ความเข้มข้น 10^8 CFU/ml

* ค่ามาตรฐานจาก National Bureau of Agricultural Commodity and Food Standards, Ministry of Agriculture and Cooperatives (2009)

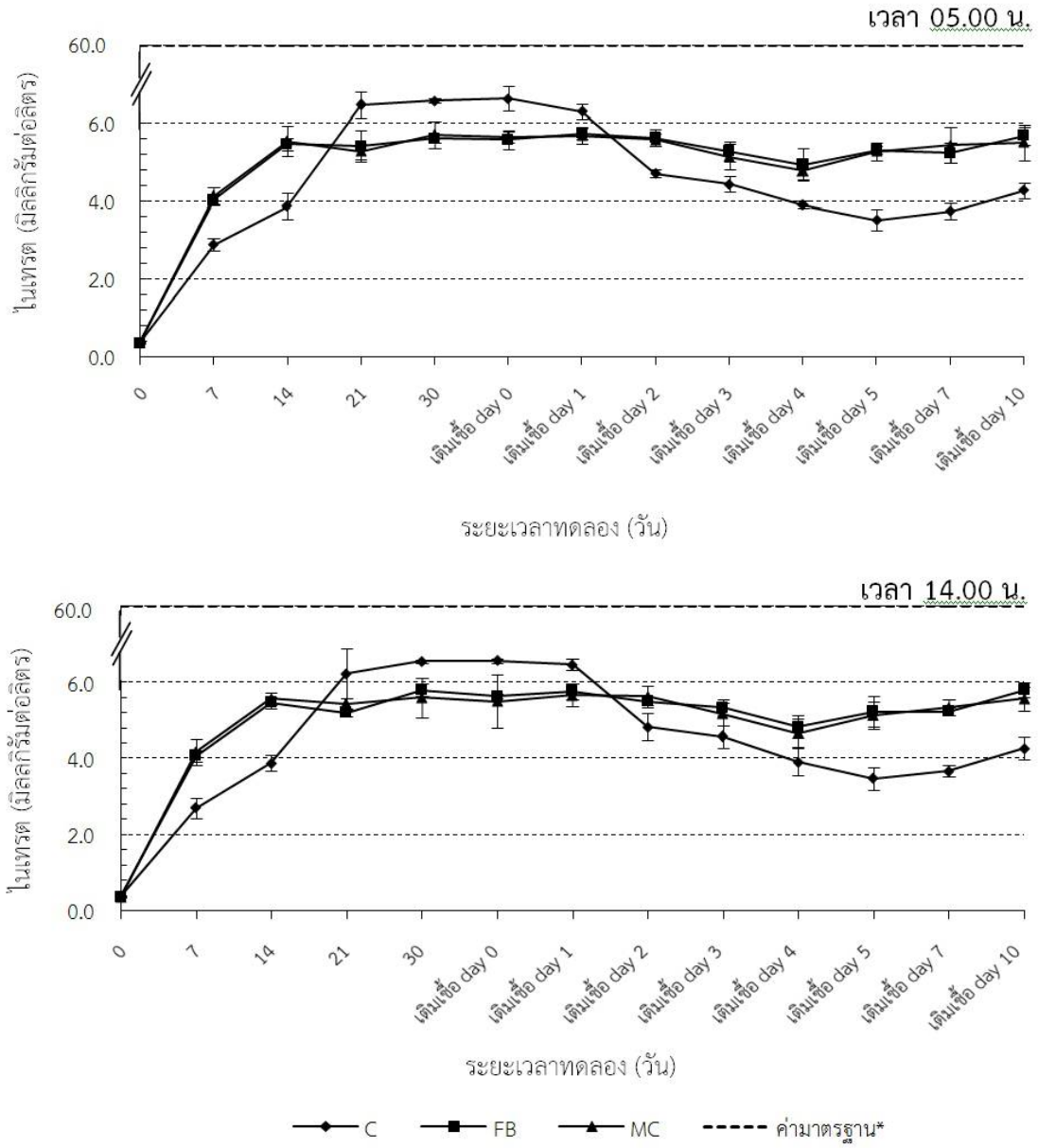
1.8 ไนเทรต

จากการศึกษาปริมาณไนเทรตในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมพบว่า ปริมาณไนเทรตในวันเริ่มต้นการทดลอง ณ เวลา 05.00 น. ของทุกชุดการทดลองมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) โดยชุดการทดลอง FB ชุดการทดลอง MB และชุดควบคุมมีค่าเท่ากับ 0.34 ± 0.04, 0.36 ± 0.02 และ 0.35 ± 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) หลังจากนั้นพบว่าปริมาณไนเทรตในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในชุดควบคุมมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจนถึงวันที่ 21 ของการทดลอง โดยมีค่าเท่ากับ 6.47 ± 0.35 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีปริมาณคงที่ไปจนถึงวันที่ 1 ของการทดสอบความต้านทานโรค โดยมีปริมาณเท่ากับ 6.30 ± 0.20 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากนั้นไนเทรตมีปริมาณลดลงจนถึงวันที่ 5 ของการทดสอบความต้านทานโรค โดยมีค่าเท่ากับ 3.90 ± 0.10 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นปริมาณไนเทรตในชุดควบคุมมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นจนถึงวันสิ้นสุดการทดลอง ส่วนในชุดการทดลอง FB และชุดการทดลอง MB พบว่าปริมาณไนเทรตมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจนถึงวันที่ 14 ของการทดลอง (5.46 ± 0.15 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 5.53 ± 0.38 มิลลิกรัมต่อลิตร) และมีปริมาณค่อนข้างคงที่ไปจนถึงวันสิ้นสุดการทดลอง โดยวันสิ้นสุดการทดลอง พบว่าปริมาณไนเทรตในชุดการทดลองที่เติมโพรไบโอติกผสมมีค่ามากกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยปริมาณไนเทรตในชุดการทดลอง FB มีค่ามากที่สุด (5.67 ± 0.23มิลลิกรัมต่อลิตร) รองลงมาคือชุดการทดลอง MB (5.50 ± 0.46 มิลลิกรัมต่อลิตร) และแตกต่างกับชุดควบคุมซึ่งมีปริมาณไนเทรตน้อยที่สุด (4.27 ± 0.21 มิลลิกรัมต่อลิตร) และพบว่าปริมาณไนเทรตในชุดการทดลอง FB และชุดการทดลอง MB ในวันสิ้นสุดการทดลองมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) ดังแสดงในภาพที่ 10

สำหรับปริมาณไนเทรตในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม ณ เวลา 14.00 น. ทั้ง 3 ชุดการทดลอง มีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงเช่นเดียวกับปริมาณไนเทรตในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม ณ เวลา 05.00 น. กล่าวคือปริมาณไนเทรตในวันเริ่มต้นของการทดลอง ณ เวลา 14.00 น. ของชุดการทดลอง FB ชุดการทดลอง MB และชุดควบคุมมีค่าเท่ากับ 0.35 ± 0.01, 0.34 ± 0.02 และ 0.37 ± 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) หลังจากนั้นพบว่าปริมาณไนเทรตในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในชุดควบคุมมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจนถึงวันที่ 21 ของการทดลอง โดยมีค่าเท่ากับ (6.23 ± 0.47 มิลลิกรัมต่อลิตร) และมีปริมาณคงที่ไปจนถึงวันที่ 1 ของการทดสอบความต้านทานโรค โดยมีปริมาณเท่ากับ 6.47 ± 0.15 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากนั้นไนเทรตมีปริมาณลดลงจนถึงวันที่ 5 ของการทดสอบความต้านทานโรคโดยมีค่าเท่ากับ 3.47 ± 0.31 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นปริมาณไนเทรตในชุดควบคุมมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นจนถึงวันสิ้นสุดการทดลอง ส่วนในชุดการทดลอง FB และชุดการทดลอง MB พบว่าปริมาณไนเทรตมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจนถึงวันที่ 14 ของการทดลอง (5.47 ± 0.15 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 5.57 ± 0.15 มิลลิกรัมต่อลิตร) และมีปริมาณค่อนข้างคงที่ไปจนถึงวันสิ้นสุดการทดลอง โดยวันสิ้นสุดการทดลองพบว่าปริมาณไนเทรตในชุดการทดลองที่เติมโพรไบโอติกผสมมีค่ามากกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยปริมาณไนเทรตในชุดการทดลอง FB มีค่ามากที่สุด (5.80 ± 0.20 มิลลิกรัมต่อลิตร) รองลงมาคือชุดการทดลอง MB (5.57 ± 0.31 มิลลิกรัมต่อลิตร) และแตกต่างกับชุดควบคุมซึ่งมีปริมาณไนเทรตน้อยที่สุด (4.27 ± 0.31 มิลลิกรัมต่อลิตร) และพบว่าปริมาณไนเทรตในชุดการทดลอง FB และชุดการ

ทดลอง MB ในวันสิ้นสุดการทดลองมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 10

เมื่อเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานซึ่งไนเทรตไม่ควรมีค่าเกิน 60 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าจากการศึกษาในครั้งนี้ไนเทรตในทุกชุดการทดลองมีค่าไม่เกินค่ามาตรฐานตลอดระยะเวลาการทดลอง ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าโพรไบโอติกผสมในรูปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งและรูปแบบไมโครแคปซูลสามารถควบคุมปริมาณไนเทรตในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมให้มีปริมาณค่อนข้างคงที่ได้ดีกว่าชุดควบคุม



ภาพที่ 10 ปริมาณไนเทรตในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 30 ในช่วงก่อนและหลังการทดสอบความต้านทานต่อแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ณ เวลา 5.00 น. และเวลา 14.00 น.

หมายเหตุ C = ชุดควบคุม

FB = ชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งลงในอาหารเลี้ยงกุ้งให้ได้ความเข้มข้น 10^8 CFU/g

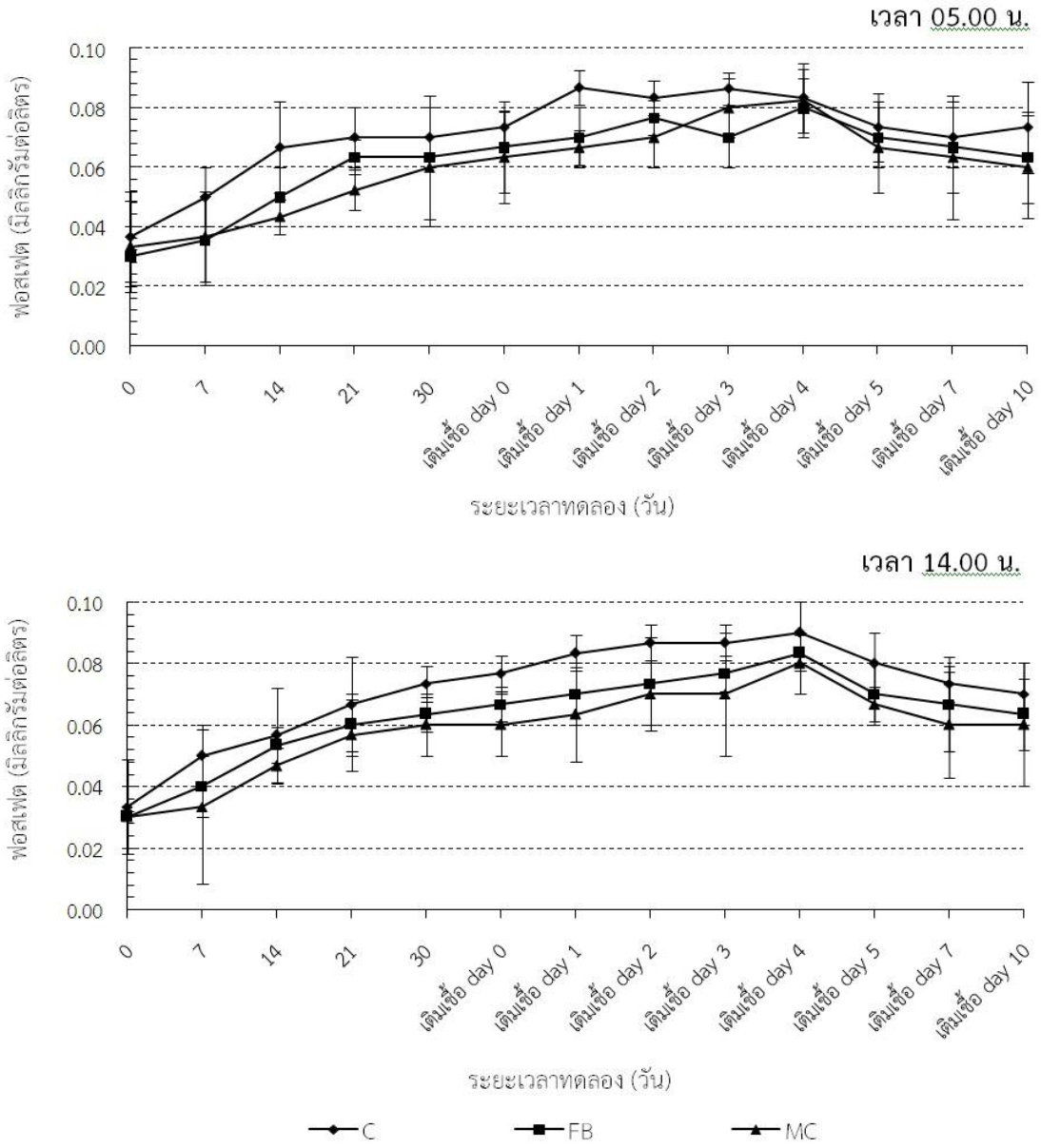
MB = ชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมในรูปไมโครแคปซูลลงในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งให้ได้ความเข้มข้น 10^8 CFU/ml

* ค่ามาตรฐานจาก National Bureau of Agricultural Commodity and Food Standards, Ministry of Agriculture and Cooperatives (2009)

1.9 ฟอสเฟต

จากการตรวจวัดปริมาณฟอสเฟตที่เกิดขึ้นในบ่อเลี้ยงกุ้งจำลองของทุกชุดการทดลอง พบว่าปริมาณฟอสเฟตในวันเริ่มต้นการทดลองมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) โดยพบว่าเวลา 05.00 น. ในชุดการทดลอง FB ชุดการทดลอง MB และชุดควบคุม มีค่าเท่ากับ 0.04 ± 0.02, 0.03 ± 0.01 และ 0.03 ± 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากนั้นปริมาณฟอสเฟตในทุกชุดการทดลองมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจนถึงวันที่ 4 ของการทดสอบความต้านทานโรค โดยในชุดการทดลอง FB ชุดการทดลอง MB และชุดควบคุมมีค่าเท่ากันคือ 0.08 ± 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้ง 3 ชุดการทดลอง จากนั้นปริมาณฟอสเฟตทั้ง 3 ชุดการทดลอง มีแนวโน้มลดลงจนถึงวันสิ้นสุดการทดลอง โดยในวันสิ้นสุดการทดลองพบว่าปริมาณฟอสเฟตในชุดการทดลองที่เติมโพรไบโอติกผสมมีค่าน้อยกว่าชุดควบคุมแต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) โดยในชุดการทดลอง FB ชุดการทดลอง MB และชุดควบคุมมีค่าเท่ากับ 0.06 ± 0.01, 0.06 ± 0.02 และ 0.07 ± 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 11

ส่วนปริมาณฟอสเฟตที่เวลา 14.00 น. มีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงคล้ายกับปริมาณฟอสเฟต ณ เวลา 05.00 น. กล่าวคือในวันเริ่มต้นการทดลองปริมาณฟอสเฟตในชุดการทดลอง FB ชุดการทดลอง MB และชุดควบคุม มีค่าเท่ากับ 0.03 ± 0.02, 0.03 ± 0.01 และ 0.03 ± 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากนั้นปริมาณฟอสเฟตในทุกชุดการทดลองมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจนถึงวันที่ 4 ของการทดสอบความต้านทานโรค โดยในชุดการทดลอง FB ชุดการทดลอง MB และชุดควบคุมมีค่าเท่ากับคือ 0.09 ± 0.01, 0.08 ± 0.01 และ 0.08 ± 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากนั้นปริมาณฟอสเฟตทั้ง 3 ชุดการทดลอง มีแนวโน้มลดลงจนถึงวันสิ้นสุดการทดลอง โดยในวันสิ้นสุดการทดลองพบว่าปริมาณฟอสเฟตในชุดการทดลองที่เติมโพรไบโอติกผสมมีค่าน้อยกว่าชุดควบคุมแต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) โดยในชุดการทดลอง FB ชุดการทดลอง MB และชุดควบคุมมีค่าเท่ากับ 0.07 ± 0.01, 0.06 ± 0.01 และ 0.06 ± 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 11 ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่า *Bacillus* โพรไบโอติกผสมในรูปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งและรูปแบบไมโครแคปซูลสามารถควบคุมปริมาณฟอสเฟตในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมได้



ภาพที่ 11 ปริมาณฟอสเฟตในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 30 ในช่วงก่อนและหลังการทดสอบความต้านทานต่อแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ณ เวลา 5.00 น. และเวลา 14.00 น.

หมายเหตุ C = ชุดควบคุม

FB = ชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งลงในอาหารเลี้ยงกุ้งให้ได้ความเข้มข้น 10^8 CFU/g

MB = ชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมในรูปไมโครแคปซูลลงในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งให้ได้ความเข้มข้น 10^8 CFU/ml

2. การแพร่กระจายของแบคทีเรียใน Hepatopancreas-Intestine และน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมด้วยวิธีทางชีวเคมีและชีวโมเลกุล

2.1 การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี

เมื่อจำแนกชนิดแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกันจาก Hepatopancreas-Intestine และน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ (MA, TCBS agar และ VHA) และนำมาศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 5 เมื่อนำแบคทีเรียที่แตกต่างกันแต่ละไอโซเลทมาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้นสามารถจำแนกแบคทีเรียออกเป็น 13 ไอโซเลท ที่มีคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีแตกต่างกัน ดังตารางที่ 6-10

ตารางที่ 5 คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่นำมาจัดจำแนกทั้ง 13 ไอโซเลท

ไอโซเลท	แกรม	รูปร่าง	Oxidase	Catalase	TSI
1	+	ท่อน	-	+	-
2	-	ท่อน	+	+	N/N
3	-	ท่อน	+	+	N/N
4	+	กลม	-	+	-
5	+	กลม	**-**	+	**-**
6	+	ท่อน	-	+	-
7	+	ท่อน	-	+	-
8	-	ท่อน	+	+w	-
9	-	ท่อน	+	+	-
10	-	ท่อน	+	+	-
11	-	ท่อน	+	+	-
12	**-**	ท่อน	+	-	**-**
13	**-**	ท่อน	+	+	**-**

<u>หมายเหตุ</u> + = 90 - 100% of strain are positive

- = 90 - 100% of strain are negative

N/N = ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของสีอาหาร

ตารางที่ 6 คุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 1, 6 และ 7

การทดสอบทางชีวเคมี	ไอโซเลท		
	1	6	7
Anaerobic growth	-	-	-
Acid from ammonium salt glucose	+	-	-
Acid from arabinose	-	-	-
Citrate utilization test	-	+	-
Growth at 50 $^{\circ}$C	-	-	-
Growth in 7% NaCl	-	+	-
Motility test	-	+	+
Nitrate reduction test	-	-	-
Vogas-Proskauer test	-	+	-
Strach hydrolysis	-	-	-

<u>หมายเหตุ</u> + = 90 - 100% of strain are positive
- = 90 - 100% of strain are negative

ตารางที่ 7 คุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 2

การทดสอบทางชีวเคมี	ไอโซเลท 2
TSI	N/N
Motility	-
OF-glucose	-
OF- manitol	-
Indole	-
Nitrate reduced	-
Gelatin	-
Esculin	-
Urease	-
Pigment	เหลือง

หมายเหตุ + = 90 - 100% of strain are positive
- = 90 - 100% of strain are negative
N/N = ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของสีอาหาร

ตารางที่ 8 คุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 3

การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี	ไอโซเลทที่ 3
TSI	N/N
Motility	+
Gas from nitrate	-
Indole	-
10% lactose	-
OF-manitol	+
Growth in 6.5% Nacl	-
Lysine	-
Acetamide	-
Bile esculin	-
H_2S in TSI	-
Pigment	ชมพู

<u>หมายเหตุ</u> + = 90 - 100% of strain are positive
- = 90 - 100% of strain are negative
N/N = ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของสีอาหาร

ตารางที่ 9 คุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 4 และ 5

การทดสอบทางชีวเคมี	ไอโซเลท	
	4	5
Coagulase	-	-
Glucose fermentation	+	+
Urease	-	-
Nitrate	-	-
Esculin		+
Vogas-Proskauer test	+	+
Gelatin	-	-
Motility	-	-
Acid-manitol	-	-
Acid-xylose	-	+
Acid-maltose	-	+
Acid-sucrose	+w	+
Acid-mannose	-	+
Pigment	White	White

<u>หมายเหตุ</u> + = 90 - 100% of strain are positive
- = 90 - 100% of strain are negative

ตารางที่ 10 คุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 8-13

การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี	ไอโซเลทที่					
	8	9	10	11	12	13
Carbohydrate metabolism (OF medium) test	Fermentative	Fermentative	Fermentative	Fermentative	Fermentative	Fermentative
O/129 sensitivity test	+	+	+	+	+	+
D-manitol utilization	+	+	-	+	+	+
Oxidase test	+	+	+	+	+	+
Indole production test	-	-	+	-	+	-
Citrate utilization test	-	-	-	-	+	-
Lysine decarboxylase test	+	-	+	+	+	+
Motility test	+	+	+	+	+	+
Methyl red test	+	-	+	+	-	-
Voges-Proskauer test	-	-	-	-	-	-
Acid from L-arabinose	-	+	+	+	+	+
Growth in 0% NaCl	-	-	-	-	-	-
Growth in 3% NaCl	+	+	-	+	+	+
Growth in 8% NaCl	+	+	-	+	-	-
Growth in 10% NaCl	-	+	-	-	-	-
Gas from D-glucose	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 10 คุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 8-13 (ต่อ)

การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี	ไอโซเลทที่					
	8	9	10	11	12	13
Ornithine decarboxylase test	-	-	-	-	+	-
Nitrate to Nitrite test	+	-	+	+	+	+
Cellobiose utilization test	-	-	-	-	+	-
Growth on TCBS agar	Y	G	G	G	G	Y

หมายเหตุ + = 90 - 100% of strain are positive
- = 90 - 100% of strain are negative
G = Green
Y = Yellow

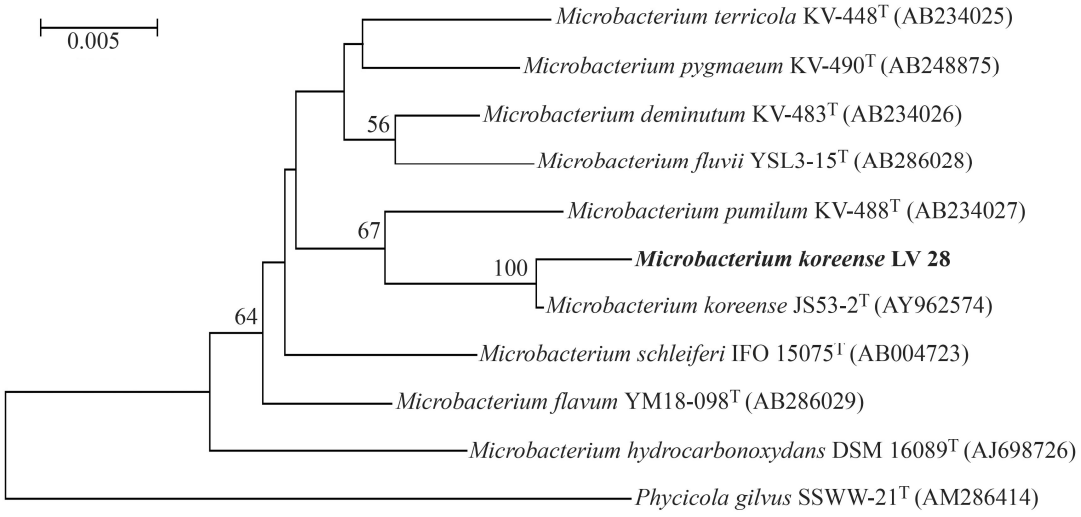
2.2 การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล

เมื่อนำแบคทีเรียแต่ละชนิดมาทำการยืนยันชนิดซ้ำอีกครั้งด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทมาเปรียบเทียบความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีในฐานข้อมูลจาก Eztaxon (ตารางที่ 11) จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์แต่ละไอโซเลทที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวงศ์วานวิวัฒนาการพบว่า แบคทีเรียไอโซเลทที่ 1 มีความใกล้ชิดทางวิวัฒนาการกับ *Microbacterium koreense* JS53-2^{T} (เลข Accession AY962574) 98.74% ดังภาพที่ 12 แบคทีเรียไอโซเลทที่ 2 มีความใกล้ชิดทางวิวัฒนาการกับ *Tamlana crocina* HST1-43^{T} (เลข Accession AM286230) 98.80% ดังภาพที่ 13 แบคทีเรียไอโซเลทที่ 3 มีความใกล้ชิดทางวิวัฒนาการกับ *Shewanella* sp. โดยใกล้ชิดกับ *Shewanella amazonensis* SB2B^{T} (เลข Accession CP000507) 93.64% ดังภาพที่ 14 แบคทีเรียไอโซเลทที่ 4 มีความใกล้ชิดทางวิวัฒนาการกับ *Staphylococcus haemolyticus* ATCC 29970^{T} (เลข Accession L37600) 98.49% ดังภาพที่ 15 แบคทีเรียไอโซเลทที่ 5 มีความใกล้ชิดทางวิวัฒนาการกับ *Staphylococcus arlettae* ATCC43957^{T} (เลข Accession AB009933) 98.76% ดังภาพที่ 16 แบคทีเรียไอโซเลทที่ 6 มีความใกล้ชิดทางวิวัฒนาการกับ *Bacillus aryabhattai* B8W22^{T} (เลข Accession EF114313) 99.79% ดังภาพที่ 17 แบคทีเรียไอโซเลทที่ 7 มีความใกล้ชิดทางวิวัฒนาการกับ *Halobacillus kuroshimensis* IS-Hb7^{T} (เลข Accession AB195680) 97.92% ดังภาพที่ 18 แบคทีเรียไอโซเลทที่ 8 มีความใกล้ชิดทางวิวัฒนาการกับ

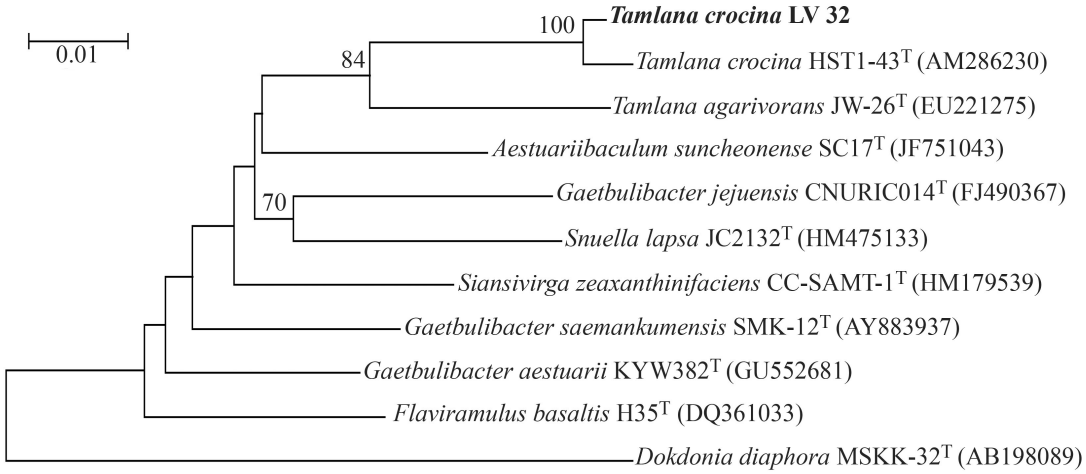
Vibrio sp. โดยใกล้ชิดกับ *Vibrio campbellii* ATCC 25920^{T} (เลข Accession X74692) 98.86% ดังภาพที่ 19 แบคทีเรียไอโซเลทที่ 9 มีความใกล้ชิดทางวิวัฒนาการกับ *Vibrio diabolicus* HE800^{T} (X99762) 97.56% ดังภาพที่ 20 แบคทีเรียไอโซเลทที่ 10 มีความใกล้ชิดทางวิวัฒนาการกับ *Vibrio* sp. โดยใกล้ชิดกับ *Vibrio campbellii* ATCC 25920^{T} (เลข Accession X74692) 99.07% % ดังภาพที่ 21 แบคทีเรียไอโซเลทที่ 11 มีความใกล้ชิดทางวิวัฒนาการกับ *Vibrio* sp. โดยใกล้ชิดกับ *Vibrio owensii* DY05^{T} (เลข Accession GU018180) 95.48% ดังภาพที่ 22 แบคทีเรียไอโซเลทที่ 13 มีความใกล้ชิดทางวิวัฒนาการกับ *Vibrio campbellii* ATCC 25920^{T} (เลข Accession X74692) 98.74% ดังภาพที่ 23 ส่วนแบคทีเรียไอโซเลทที่ 12 นั้น สามารถจำแนกได้เป็น *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 จึงไม่ได้นำมาจัดจำแนกด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล

ตารางที่ 11 ชนิดของแบคทีเรียที่จัดจำแนกได้จาก Hepatopancreas-Intestine และน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมโดยวิธีทางชีวโมเลกุล

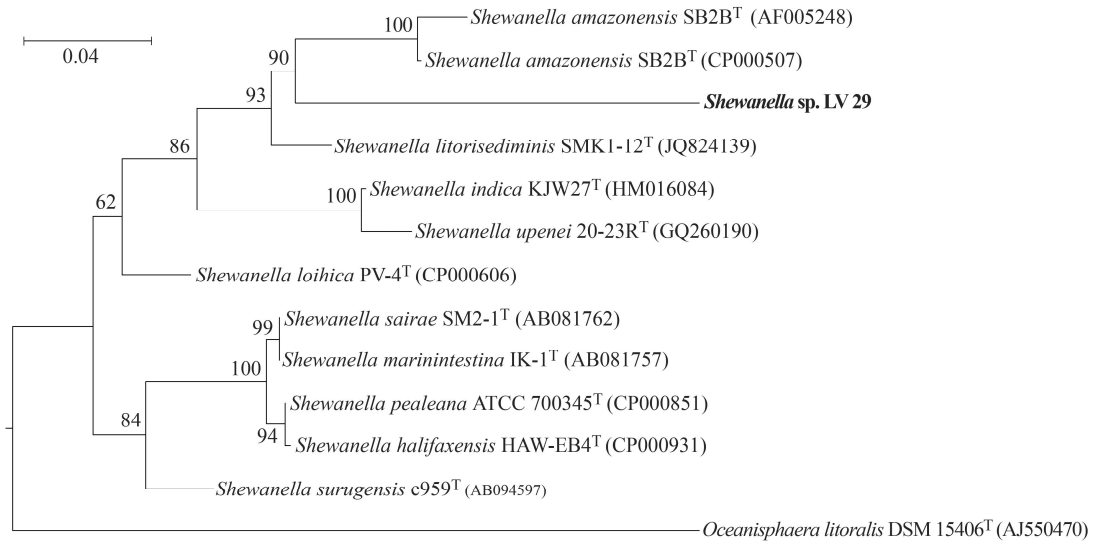
ไอโซเลทที่	ชนิดของแบคทีเรียที่แยกได้	แบคทีเรียอ้างอิง	หมายเลข Accession number ของแบคทีเรียอ้างอิง	ความคล้ายคลึง (%)
1	*Microbacterium koreense* LV 28	*Microbacterium koreense* JS53-2^{T}	AY962574	98.74
2	*Tamlana crocina* LV 32	*Tamlana crocina* HST1-43^{T}	AM286230	98.80
3	*Shewanella* sp. LV29	*Shewanella amazonensis* SB2B^{T}	CP000507	93.64
4	*Staphylococcus haemolyticus* LV 31	*Staphylococcus haemolyticus* ATCC 29970^{T}	L37600	98.49
5	*Staphylococcus arlettae* LV 30	*Staphylococcus arlettae* ATCC43957^{T}	AB009933	98.76
6	*Bacillus aryabhattai* LV 26	*Bacillus aryabhattai* B8W22^{T}	EF114313	99.79
7	*Halobacillus kuroshimensis* LV 27	*Halobacillus kuroshimensis* IS-Hb7^{T}	AB195680	97.92
8	*Vibrio* sp. LV 35	*Vibrio campbellii* ATCC 25920^{T}	X74692	98.86
9	*Vibrio diabolicus* LV 34	*Vibrio diabolicus* HE800^{T}	X99762	97.56
10	*Vibrio* sp. LV 37	*Vibrio campbellii* ATCC 25920^{T}	X74692	99.07
11	*Vibrio* sp. LV 36	*Vibrio owensii* DY05^{T}	GU018180	95.48
13	*Vibrio campbellii* LV 33	*Vibrio campbellii* ATCC 25920^{T}	X74692	99.08



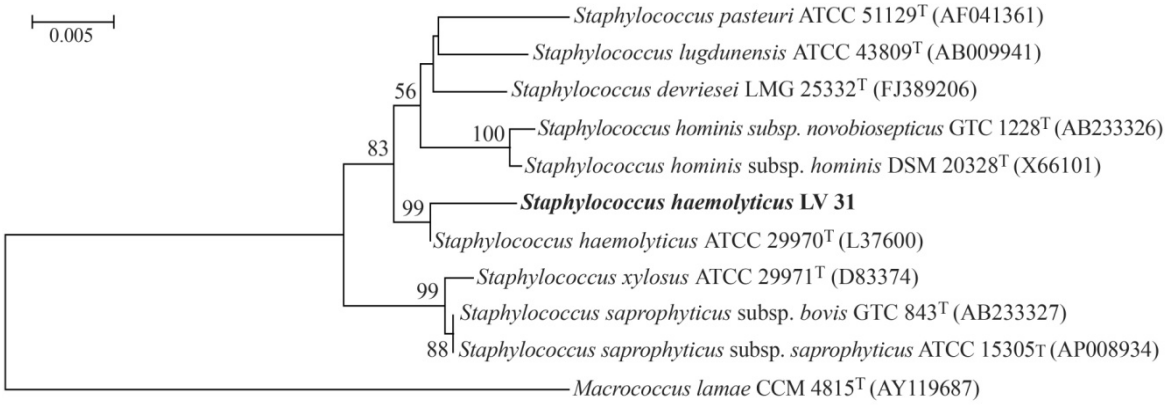
ภาพที่ 12 วงศ์วานวิวัฒนาการบนพื้นฐานของยีน 16S rRNA ของ *Microbacterium koreense* LV 28 ซึ่งสร้างแผนภาพสายสัมพันธ์ทางวงศ์วานวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ด้วยเทคนิค Distance-based methods แบบ Neighbor-joining โดยวิเคราะห์หาค่า Bootstrap จำนวน 1,000 ครั้ง (แสดงค่า Bootstrap ที่มีค่า ≥50% เท่านั้น) และใช้ *Phycicola gilvus* SSWW-21^{T} เป็น Outgroup เส้นสเกลแสดงถึงระยะห่างทางวิวัฒนาการมีค่าเท่ากับ 0.005



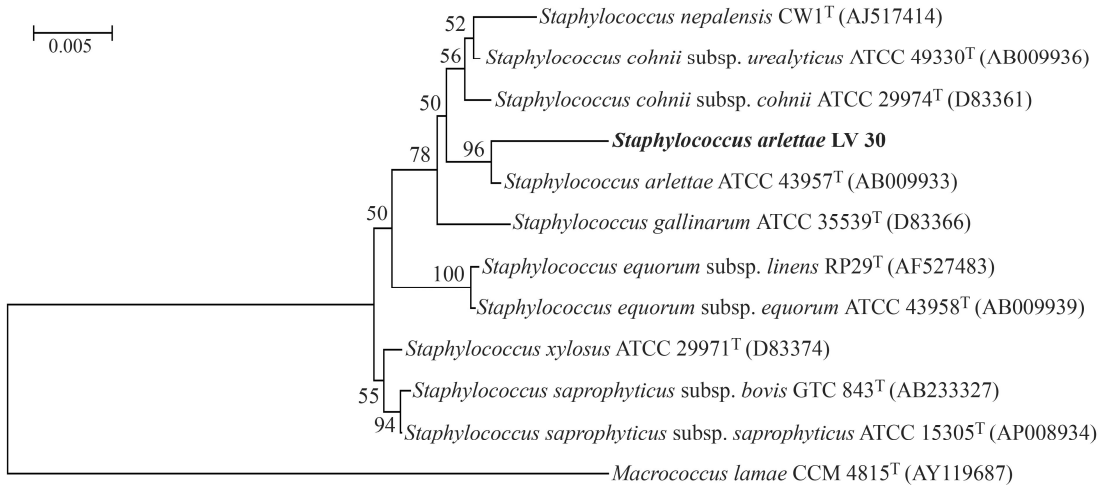
ภาพที่ 13 วงศ์วานวิวัฒนาการบนพื้นฐานของยีน 16S rRNA ของ *Tamlana crocina* LV 32 ซึ่งสร้างแผนภาพสายสัมพันธ์ทางวงศ์วานวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ด้วยเทคนิค Distance-based methods แบบ Neighbor-joining โดยวิเคราะห์หาค่า Bootstrap จำนวน 1,000 ครั้ง (แสดงค่า Bootstrap ที่มีค่า ≥50% เท่านั้น) และใช้ *Dokdonia diaphora* MSKK-32^{T} เป็น Outgroup เส้นสเกลแสดงถึงระยะห่างทางวิวัฒนาการมีค่าเท่ากับ 0.01



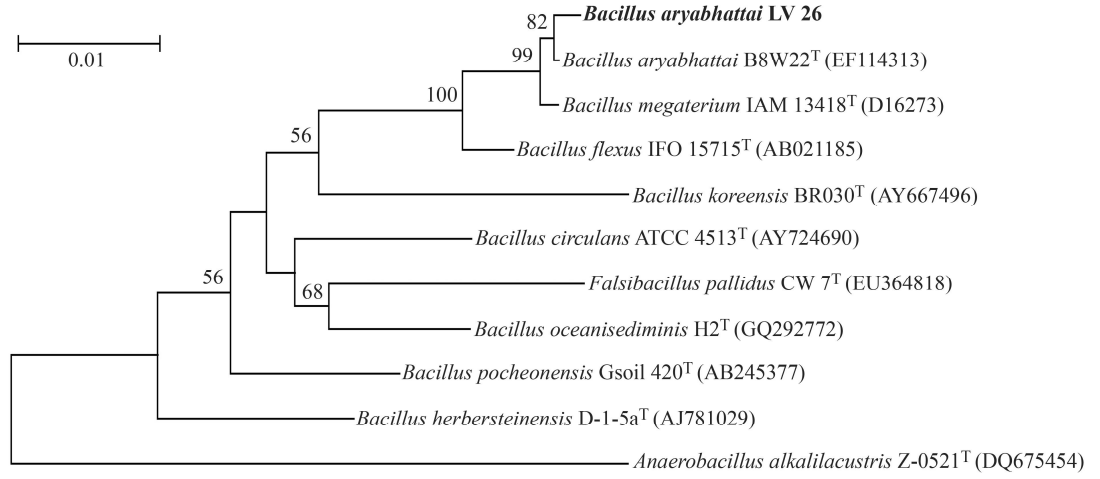
ภาพที่ 14 วงศ์วานวิวัฒนาการบนพื้นฐานของยีน 16S rRNA ของ *Shewanella* sp. LV29 ซึ่งสร้างแผนภาพสายสัมพันธ์ทางวงศ์วานวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) เทคนิค Character-based methods วิธีแมกซิมัมลค์ลิฮูด (Maximum likelihood) โดยวิเคราะห์หาค่า Bootstrap จำนวน 100 ครั้ง (แสดงค่า Bootstrap ที่มีค่า≥50% เท่านั้น) และใช้ *Oceanisphaera litoralis* DSM 15406^T เป็น Outgroup เส้นสเกลแสดงถึงระยะห่างทางวิวัฒนาการมีค่าเท่ากับ 0.04



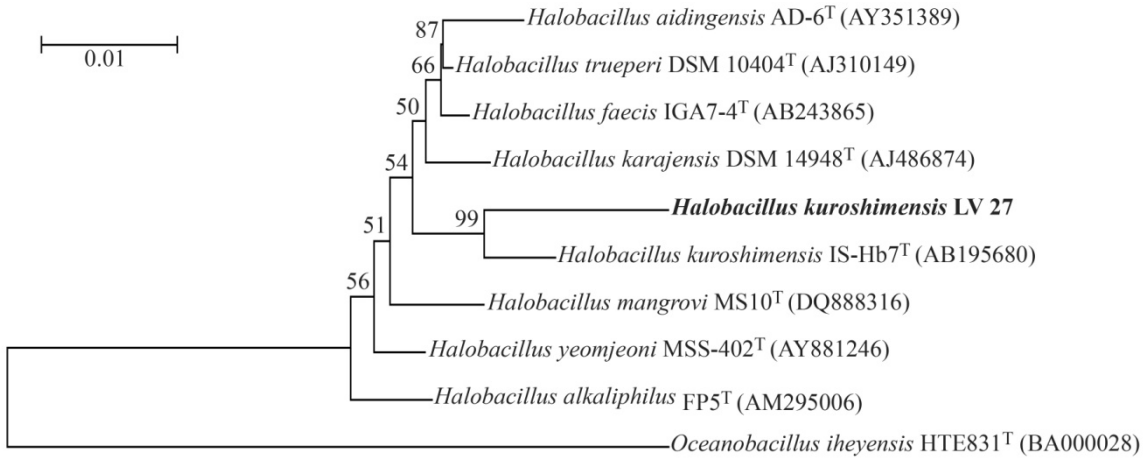
ภาพที่ 15 วงศ์วานวิวัฒนาการบนพื้นฐานของยีน 16S rRNA ของ *Staphylococcus haemolyticus* LV 31 ซึ่งสร้างแผนภาพสายสัมพันธ์ทางวงศ์วานวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ด้วยเทคนิค Distance-based methods แบบ Neighbor-joining โดยวิเคราะห์หาค่า Bootstrap จำนวน 1,000 ครั้ง (แสดงค่า Bootstrap ที่มีค่า ≥50% เท่านั้น) และใช้ *Macrococcus lamae* CCM 4815^T เป็น Outgroup เส้นสเกลแสดงถึงระยะห่างทางวิวัฒนาการมีค่าเท่ากับ 0.005



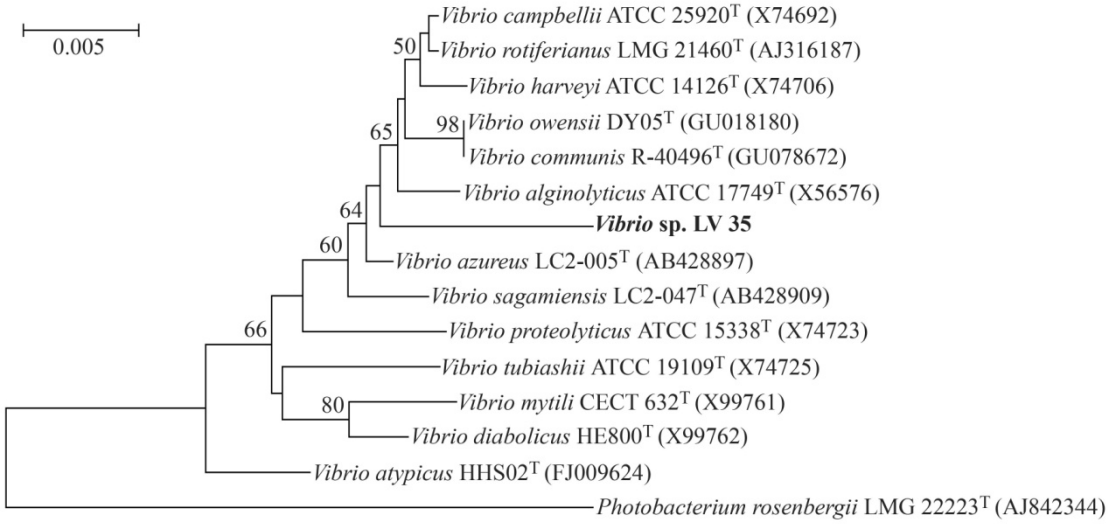
ภาพที่ 16 วงศ์วานวิวัฒนาการบนพื้นฐานของยีน 16S rRNA ของ *Staphylococcus arlettae* LV 30 ซึ่งสร้างแผนภาพสายสัมพันธ์ทางวงศ์วานวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ด้วยเทคนิค Distance-based methods แบบ Neighbor-joining โดยวิเคราะห์หาค่า Bootstrap จำนวน 1,000 ครั้ง (แสดงค่า Bootstrap ที่มีค่า ≥50% เท่านั้น) และใช้ *Macrococcus lamae* CCM 4815^{T} เป็น Outgroup เส้นสเกลแสดงถึงระยะห่างทางวิวัฒนาการมีค่าเท่ากับ 0.005



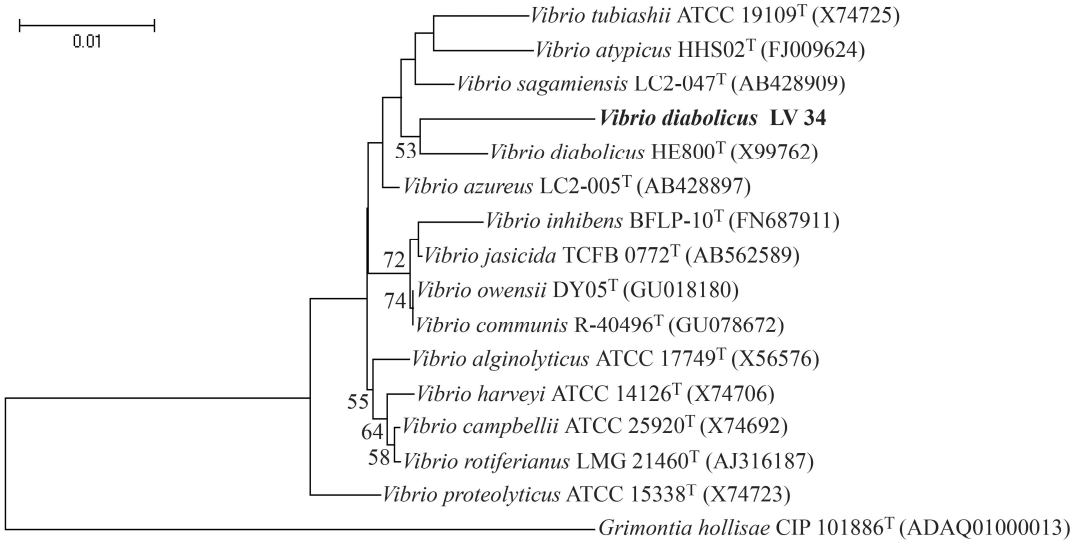
ภาพที่ 17 วงศ์วานวิวัฒนาการบนพื้นฐานของยีน 16S rRNA ของ *Bacillus aryabhattai* LV 26 ซึ่งสร้างแผนภาพสายสัมพันธ์ทางวงศ์วานวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ด้วยเทคนิค Distance-based methods แบบ Neighbor-joining โดยวิเคราะห์หาค่า Bootstrap จำนวน 1,000 ครั้ง (แสดงค่า Bootstrap ที่มีค่า ≥50% เท่านั้น) และใช้ *Anaerobacillus alkalilacustris* Z-0521^{T} เป็น Outgroup เส้นสเกลแสดงถึงระยะห่างทางวิวัฒนาการมีค่าเท่ากับ 0.01



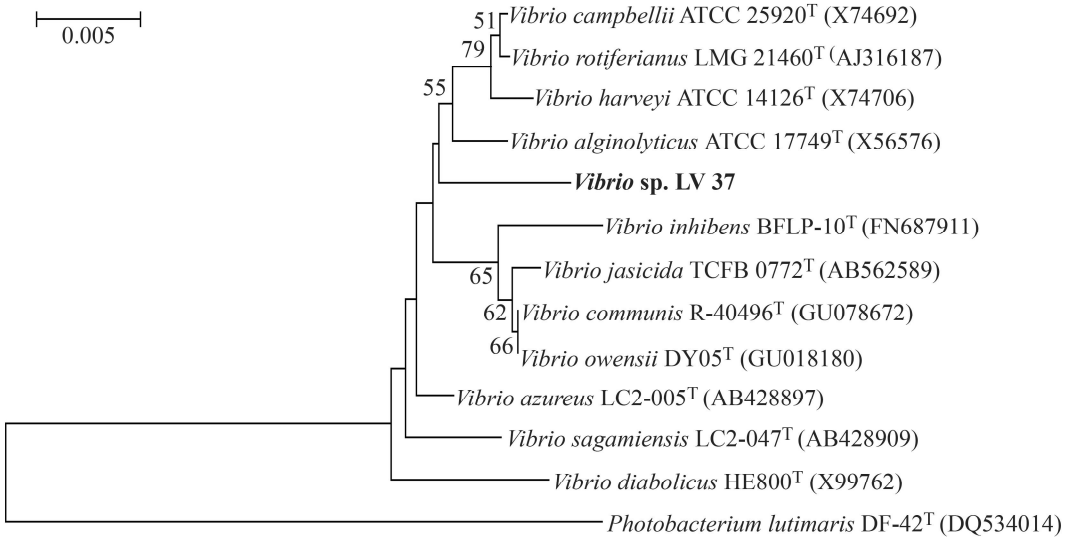
ภาพที่ 18 วงศ์วานวิวัฒนาการบนพื้นฐานของยีน 16S rRNA ของ *Halobacillus kuroshimensis* LV 27 ซึ่งสร้างแผนภาพสายสัมพันธ์ทางวงศ์วานวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ด้วยเทคนิค Distance-based methods แบบ Neighbor-joining โดยวิเคราะห์หาค่า Bootstrap จำนวน 1,000 ครั้ง (แสดงค่า Bootstrap ที่มีค่า ≥50% เท่านั้น) และใช้ *Oceanobacillus iheyensis* HTE831^{T} เป็น Outgroup เส้นสเกลแสดงถึงระยะห่างทางวิวัฒนาการมีค่าเท่ากับ 0.01



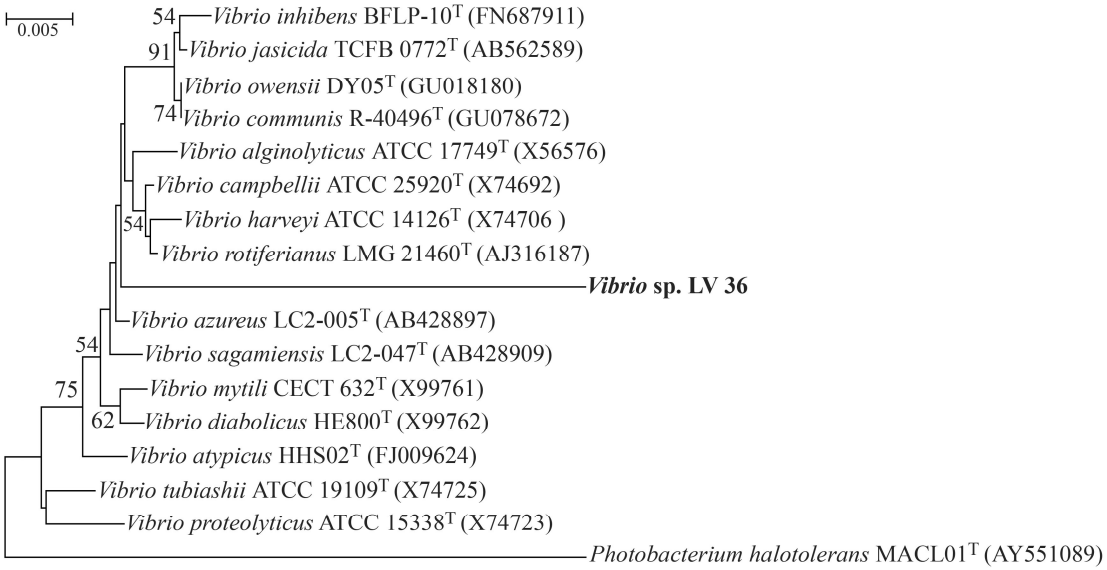
ภาพที่ 19 วงศ์วานวิวัฒนาการบนพื้นฐานของยีน 16S rRNA ของ *Vibrio* sp. LV 35 ซึ่งสร้างแผนภาพสายสัมพันธ์ทางวงศ์วานวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ด้วยเทคนิค Distance-based methods แบบ Neighbor-joining โดยวิเคราะห์หาค่า Bootstrap จำนวน 1,000 ครั้ง (แสดงค่า Bootstrap ที่มีค่า ≥50% เท่านั้น) และใช้ *Photobacterium rosenbergii* LMG 22223^{T} เป็น Outgroup เส้นสเกลแสดงถึงระยะห่างทางวิวัฒนาการมีค่าเท่ากับ 0.005



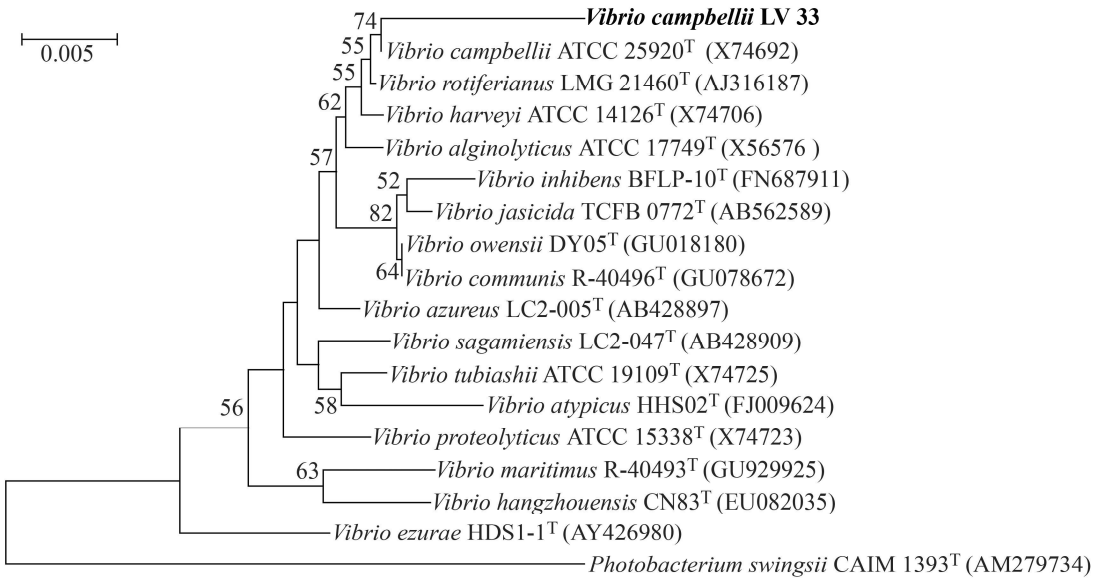
ภาพที่ 20 วงศ์วานวิวัฒนาการบนพื้นฐานของยีน 16S rRNA ของ *Vibrio diabolicus* LV 34 ซึ่งสร้างแผนภาพสายสัมพันธ์ทางวงศ์วานวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ด้วยเทคนิค Distance-based methods แบบ Neighbor-joining โดยวิเคราะห์หาค่า Bootstrap จำนวน 1,000 ครั้ง (แสดงค่า Bootstrap ที่มีค่า ≥50% เท่านั้น) และใช้ *Grimontia hollisaei* CIP 101886^{T} เป็น Outgroup เส้นสเกลแสดงถึงระยะห่างทางวิวัฒนาการมีค่าเท่ากับ 0.01



ภาพที่ 21 วงศ์วานวิวัฒนาการบนพื้นฐานของยีน 16S rRNA ของ *Vibrio* sp. LV 37 ซึ่งสร้างแผนภาพสายสัมพันธ์ทางวงศ์วานวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ด้วยเทคนิค Distance-based methods แบบ Neighbor-joining โดยวิเคราะห์หาค่า Bootstrap จำนวน 1,000 ครั้ง (แสดงค่า Bootstrap ที่มีค่า ≥50% เท่านั้น) และใช้ *Photobacterium lutimaris* DF-42^{T} เป็น Outgroup เส้นสเกลแสดงถึงระยะห่างทางวิวัฒนาการมีค่าเท่ากับ 0.005



ภาพที่ 22 วงศ์วานวิวัฒนาการบนพื้นฐานของยีน 16S rRNA ของ *Vibrio* sp. LV 36 ซึ่งสร้างแผนภาพสายสัมพันธ์ทางวงศ์วานวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ด้วยเทคนิค Distance-based methods แบบ Neighbor-joining โดยวิเคราะห์หาค่า Bootstrap จำนวน 1,000 ครั้ง (แสดงค่า Bootstrap ที่มีค่า ≥50% เท่านั้น) และใช้ *Photobacterium halotolerans* MACL01^{T} เป็น Outgroup เส้นสเกลแสดงถึงระยะห่างทางวิวัฒนาการมีค่าเท่ากับ 0.005



ภาพที่ 23 วงศ์วานวิวัฒนาการบนพื้นฐานของยีน 16S rRNA ของ *Vibrio campbellii* LV 33 ซึ่งสร้างแผนภาพสายสัมพันธ์ทางวงศ์วานวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ด้วยเทคนิค Distance-based methods แบบ Neighbor-joining โดยวิเคราะห์หาค่า Bootstrap จำนวน 1,000 ครั้ง (แสดงค่า Bootstrap ที่มีค่า ≥50% เท่านั้น) และใช้ *Photobacterium swingsii* CAIM 1393^T เป็น Outgroup เส้นสเกลแสดงถึงระยะห่างทางวิวัฒนาการมีค่าเท่ากับ 0.005

3. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของแบคทีเรียชนิดต่างๆ

3.1 การศึกษาอัตราส่วนของ *Bacillus* ต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดใน Hepatopancreas-Intestine ของกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 30 ในช่วงก่อนและหลังทดสอบความต้านทานโรคที่เกิดจาก *V. harveyi* สายพันธุ์ 002

อัตราส่วนของ *Bacillus* ต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดใน Hepatopancreas-Intestine ของกุ้งขาวแวนนาไมในชุดการทดลอง FB หลังจากเพาะเลี้ยงด้วยโพรไบโอติกผสมในรูปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง พบว่ามีอัตราส่วนของ *Bacillus* ต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดเท่ากับ 2.55 ± 1.88 % ซึ่งมากกว่าชุดการทดลอง MB (0.04 ± 0.03 %) และชุดควบคุม (0.011 ± 0.002 %) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) หลังจากเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมเป็นเวลา 30 วัน พบว่าอัตราส่วนของ *Bacillus* ต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดใน Hepatopancreas-Intestine ของกุ้งขาวแวนนาไมในชุดการทดลอง FB และชุดการทดลอง MB มีค่าเพิ่มขึ้น โดยในชุดการทดลอง FB เพิ่มจาก 2.55 ± 1.88 % เป็น 88.68 ± 4.66 % และชุดการทดลอง MB เพิ่มจาก 0.04 ± 0.03 % เป็น 51.70 ± 21.30 % ซึ่งมีความแตกต่างกับวันเริ่มต้นการทดลองและแตกต่างกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) สำหรับอัตราส่วนของ *Bacillus* ต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในชุดควบคุมเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยจาก 0.011 ± 0.002 % เป็น 0.02 ± 0.01 % ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) กับวันเริ่มต้นการทดลอง (ตารางที่ 12)

เมื่อทำการทดสอบความต้านทานโรคของกุ้งขาวแวนนาไมโดยเติม *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ลงในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10^6 CFU/ml พบว่าอัตราส่วนของ *Bacillus* ต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดใน Hepatopancreas-Intestine ของกุ้งขาวแวนนาไมทั้ง 3 ชุดการทดลอง มีค่าลดลงโดยชุดการทดลอง FB ลดลงจาก 88.68 ± 4.66 % เหลือ 1.26 ± 0.28 % (ลดลงประมาณ 80 %), ชุดการทดลอง MB ลดลงจาก 51.70 ± 21.30 % เหลือ 0.11 ± 0.02 % (ลดลงประมาณ 50 %) ในวันที่ 2 ของการทดลอง ส่วนในชุดควบคุมไม่สามารถตรวจพบอัตราส่วน *Bacillus* ได้ หลักจากเติม *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ภายใน 2 ชั่วโมง จากนั้นในวันที่ 4 ของการทดสอบความต้านทานโรคของกุ้งขาวแวนนาไมพบว่า อัตราส่วนของ *Bacillus* ต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดใน Hepatopancreas-Intestine ของกุ้งขาวแวนนาไมทั้ง 3 ชุดการทดลองเพิ่มขึ้น โดยชุดควบคุมเพิ่มจาก 0 % เป็น 0.008 ± 0.002 %, ชุดการทดลอง FB เพิ่มจาก 1.26 ± 0.28 % เป็น 13.34 ± 3.49% ตามลำดับ ส่วนในชุดการทดลอง MB นั้น พบว่าอัตราส่วนของ *Bacillus* ต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดมีค่าเพิ่มขึ้นในวันที่ 5 ของการทดลอง โดยมีค่าเท่ากับ 1.75 ± 1.07 % หลังจากนั้นพบว่าอัตราส่วนของ *Bacillus* ต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงวันสิ้นสุดการทดลอง โดยในวันสิ้นสุดการทดลองพบว่าอัตราส่วนของ *Bacillus* ต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในชุดการทดลอง FB มีค่าเท่ากับ 84.78 ± 14.99 % และแตกต่างกับชุดการทดลอง MB (25.13 ± 4.44 %) และชุดควบคุม (0.009 ± 0.004 %) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 12

ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่า *Bacillus* โพรไบโอติกผสมในรูปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งและรูปแบบไมโครแคปซูลสามารถรอดชีวิตและเจริญใน Hepatopancreas-Intestine ของกุ้งขาวแวนนาไมได้ ส่งผลให้อัตราส่วนของ *Bacillus* ต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดใน Hepatopancreas-Intestine ของกุ้งขาวแวนนาไมทั้ง 2 ชุดการทดลองเพิ่มขึ้น และการเติม *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ลงในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมให้ได้ความเข้มข้น 10^6 CFU/ml ส่งผลให้อัตราส่วนของ *Bacillus* ต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดใน Hepatopancreas-Intestine ของกุ้งขาวแวนนาไมทั้ง 3 ชุดการทดลองลดลง

ตารางที่ 12 อัตราส่วนของ *Bacillus* ต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดใน Hepatopancreas-Intestine ของกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 30 ในช่วงก่อนและหลังการทดสอบความต้านทานโรคที่เกิดจาก *V. harveyi* สายพันธุ์ 002

ระยะเวลาทดลอง	อัตราส่วนของ *Bacillus* ต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดใน Hepatopancreas-Intestine (%)				
ชุดการทดลอง	เลี้ยงด้วยโพรไบโอติก 2 ชั่วโมง	เลี้ยงด้วยโพรไบโอติก 30 วัน	เติม *V. harveyi* 2 ชั่วโมง	เติม *V. harveyi* 1 วัน	เติม *V. harveyi* 2 วัน
C	$0.011 \pm 0.002^{(b,123)}$	$0.02 \pm 0.01^{(c,12)}$	$0^{(c,4)}$	$0^{(b,4)}$	$0^{(b,4)}$
FB	$2.55 \pm 1.88^{(a,45)}$	$88.68 \pm 4.66^{(a,1)}$	$9.20 \pm 5.28^{(a,45)}$	$1.17 \pm 0.45^{(a,5)}$	$1.26 \pm 0.28^{(a,5)}$
MB	$0.04 \pm 0.03^{(b,3)}$	$51.70 \pm 21.30^{(b,1)}$	$0.86 \pm 0.72^{(b,3)}$	$0.11 \pm 0.01^{(b,3)}$	$0.11 \pm 0.02^{(b,3)}$

หมายเหตุ C = ชุดควบคุม

FB = ชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งลงในอาหารเลี้ยงกุ้งให้ได้ความเข้มข้น 10^8 CFU/g

MB = ชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมในรูปไมโครแคปซูลลงในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งให้ได้ความเข้มข้น 10^8 CFU/ml

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

ตัวเลขที่เหมือนกันในแนวนอนแสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางที่ 12 อัตราส่วนของ *Bacillus* ต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดใน Hepatopancreas-Intestine ของกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 30 ในช่วงก่อนและหลังการทดสอบความต้านทานโรคที่เกิดจาก *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 (ต่อ)

ระยะเวลาทดลอง	อัตราส่วนของ *Bacillus* ต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดใน Hepatopancreas-Intestine (%)				
ชุดการทดลอง	เติม *V. harveyi* 3 วัน	เติม *V. harveyi* 4 วัน	เติม *V. harveyi* 5 วัน	เติม *V. harveyi* 7 วัน	เติม *V. harveyi* 10 วัน
C	$0^{(b,3)}$	$0.008 \pm 0.002^{(b,23)}$	$0.01 \pm 0.01^{(b,12)}$	$0.02 \pm 0.02^{(c,1)}$	$0.009 \pm 0.004^{(c,123)}$
FB	$1.46 \pm 0.54^{(a,5)}$	$13.34 \pm 3.49^{(a,4)}$	$65.53 \pm 7.20^{(a,3)}$	$77.11 \pm 6.37^{(a,2)}$	$84.78 \pm 14.99^{(a,12)}$
MB	$0.11 \pm 0.04^{(b,3)}$	$0.10 \pm 0.02^{(b,3)}$	$1.75 \pm 1.07^{(b,3)}$	$7.32 \pm 1.59^{(b,3)}$	$25.13 \pm 4.44^{(b,2)}$

หมายเหตุ C = ชุดควบคุม

FB = ชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งลงในอาหารเลี้ยงกุ้งให้ได้ความเข้มข้น 10^8 CFU/g

MB = ชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมในรูปไมโครแคปซูลลงในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งให้ได้ความเข้มข้น 10^8 CFU/ml

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

ตัวเลขที่เหมือนกันในแนวนอนแสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.2 ศึกษาอัตราส่วนของ *Bacillus* ต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 30 ในช่วงก่อนและหลังทดสอบความต้านทานโรคที่เกิดจาก *V. harveyi* สายพันธุ์ 002

จากการศึกษาอัตราส่วนของ *Bacillus* ต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมหลังจากเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมด้วย *Bacillus* โพรไบโอติกผสมเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง พบว่าอัตราส่วนของ *Bacillus* ต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในชุดการทดลอง MB มีค่าสูงที่สุด (14.39 ± 0.20 %) และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) กับชุดการทดลอง FB (3.30 ± 0.51 %) และชุดควบคุม (0.90 ± 0.03 %) เมื่อทำการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมเป็นเวลา 30 วัน พบว่าอัตราส่วนของ *Bacillus* ต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในชุดการทดลอง MB และชุดการทดลอง FB มีปริมาณเพิ่มมากขึ้น และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) กับวันเริ่มต้นการทดลอง โดยมีค่าเท่ากับ 92.55±3.79 % และ 88.04 ± 8.62 % ซึ่งทั้ง 2 ชุดการทดลอง มีอัตราส่วนของ *Bacillus* ต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) ส่วนชุดควบคุมพบว่าอัตราส่วนของ *Bacillus* ต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดมีแนวโน้มคงที่ (C = 0.92 ± 0.11 %) และไม่แตกต่างกับวันเริ่มต้นการทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) และยังพบว่าอัตราส่วนของ *Bacillus* ต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดของชุดควบคุมในวันที่ 30 ของการทดลอง มีค่าน้อยกว่าชุดการทดลอง MB และชุดการทดลอง FB อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

เมื่อทำการทดสอบความต้านทานโรคของกุ้งขาวแวนนาไมโดยเติม *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ลงในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10^6 CFU/ml พบว่าอัตราส่วนของ *Bacillus* ต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมทั้ง 3 ชุดการทดลอง มีค่าลดลงโดยชุดการทดลอง MB มีค่าลดลงเหลือ 0.87 ± 0.55 % ชุดการทดลอง FB มีค่าลดลงเหลือ 0.03 ± 0.01 % และมีแนวโน้มคงที่ไปจนถึงวันที่ 7 ของการทดสอบความต้านทานโรค ส่วนชุดควบคุมไม่สามารถตรวจพบ *Bacillus* ได้จนถึงวันที่ 5 ของการทดสอบความต้านทานแบคทีเรียก่อโรคเช่นเดียวกัน หลังจากนั้นอัตราส่วนของ *Bacillus* ต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจนถึงวันสิ้นสุดการทดลอง โดยในวันสิ้นสุดการทดลองอัตราส่วนของ *Bacillus* ต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในชุดการทดลอง MB (71.22 ± 9.58 %) มีค่าสูงที่สุดและแตกต่างจากชุดการทดลอง FB (8.72 ± 1.10 %) และชุดควบคุม (0.16 ± 0.07 %) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) ดังแสดงในตารางที่ 13

ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่า *Bacillus* โพรไบโอติกผสมในรูปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง สามารถรอดชีวิตและเจริญในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมได้ ส่งผลให้อัตราส่วนของ *Bacillus* ต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมทั้ง 2 ชุดการทดลองเพิ่มขึ้น และการเติม *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ลงในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมให้ได้ความเข้มข้น 10^6 CFU/ml มีผลต่ออัตราส่วนของ *Bacillus* ต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมทั้ง 3 ชุดการทดลอง โดยทำให้มีอัตราส่วนลดลง

ตารางที่ 13 อัตราส่วนของ *Bacillus* ต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม ระยะโพสลาวา 30 ในช่วงก่อนและหลังการทดสอบความต้านทานโรคที่เกิดจาก *V. harveyi* สายพันธุ์ 002

ระยะเวลาทดลอง	อัตราส่วนของ *Bacillus* ต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (%)				
ชุดการทดลอง	เลี้ยงด้วยโพรไบโอติก 2 ชั่วโมง	เลี้ยงด้วยโพรไบโอติก 30 วัน	เติม *V. harveyi* 2 ชั่วโมง	เติม *V. harveyi* 1 วัน	เติม *V. harveyi* 2 วัน
C	$0.90 \pm 0.03^{(c,1)}$	$0.92 \pm 0.11^{(b,1)}$	$0^{(b,3)}$	$0^{(b,3)}$	$0^{(b,3)}$
FB	$3.30 \pm 0.51^{(b,3)}$	$88.04 \pm 8.62^{(a,1)}$	$0.03 \pm 0.01^{(b,4)}$	$0.09 \pm 0.02^{(b,4)}$	$0.86 \pm 0.26^{(b,3)}$
MB	$14.39 \pm 0.20^{(a,4)}$	$92.55 \pm 3.79^{(a,1)}$	$0.87 \pm 0.55^{(a,3)}$	$0.94 \pm 0.04^{(a,3)}$	$9.15 \pm 0.29^{(a,3)}$

หมายเหตุ C = ชุดควบคุม

FB = ชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งลงในอาหารเลี้ยงกุ้งให้ได้ความเข้มข้น 10^8 CFU/g

MB = ชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมในรูปไมโครแคปซูลลงในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งให้ได้ความเข้มข้น 10^8 CFU/ml

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

ตัวเลขที่เหมือนกันในแนวนอนแสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางที่ 13 อัตราส่วนของ *Bacillus* ต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 30 ในช่วงก่อนและหลังการทดสอบความต้านทานโรคที่เกิดจาก *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 (ต่อ)

ระยะเวลาทดลอง	อัตราส่วนของ *Bacillus* ต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (%)				
ชุดการทดลอง	เติม *V. harveyi* 3 วัน	เติม *V. harveyi* 4 วัน	เติม *V. harveyi* 5 วัน	เติม *V. harveyi* 7 วัน	เติม *V. harveyi* 10 วัน
C	$0^{(c,3)}$	$0^{(c,3)}$	$0^{(c,3)}$	$0.21 \pm 0.09^{(c,2)}$	$0.16 \pm 0.07^{(c,2)}$
FB	$0.99 \pm 0.21^{(b,3)}$	$0.93 \pm 0.16^{(b,3)}$	$0.93 \pm 0.85^{(a,3)}$	$8.71 \pm 0.56^{(b,2)}$	$8.72 \pm 1.10^{(b,2)}$
MB	$9.37 \pm 0.18^{(a,3)}$	$9.27 \pm 0.55^{(a,3)}$	$9.35 \pm 0.45^{(b,3)}$	$43.71 \pm 11.38^{(a,2)}$	$71.22 \pm 9.58^{(a,2)}$

หมายเหตุ C = ชุดควบคุม

FB = ชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งลงในอาหารเลี้ยงกุ้งให้ได้ความเข้มข้น 10^8 CFU/g

MB = ชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมในรูปไมโครแคปซูลลงในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งให้ได้ความเข้มข้น 10^8 CFU/ml

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

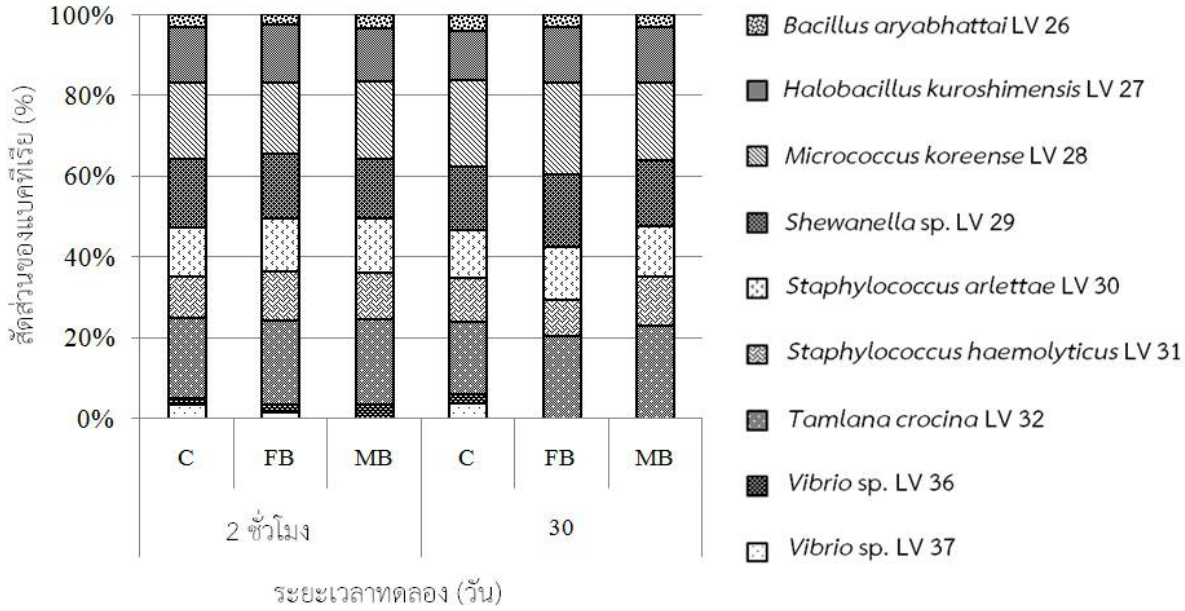
ตัวเลขที่เหมือนกันในแนวนอนแสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.3 สัดส่วน (%) และชนิดของแบคทีเรียทางทะเลใน Hepatopancreas-Intestine ของกุ้งขาวแวนนาไมในช่วงก่อนและหลังการทดสอบความต้านทานต่อแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* สายพันธุ์ 002

ชนิดของแบคทีเรียทางทะเลใน Hepatopancreas-Intestine ของกุ้งขาวแวนนาไมในช่วงเริ่มต้นการทดลองสามารถจำแนกได้ 9 ชนิด ได้แก่ *Bacillus aryabhattai* LV 26, *Halobacillus kuroshimensis* LV 27, *Micrococcus koreense* LV 28, *Shewanella* sp. LV 29, *Staphylococcus arlettae* LV 30, *Staphylococcus haemolyticus* LV 31, *Tamlana crocina* LV 32, *Vibrio* sp. LV 36 และ *Vibrio* sp. LV 37 ตามลำดับ เมื่อดูสัดส่วนของแบคทีเรียแต่ละชนิดพบว่า แบคทีเรียชนิดเด่นในแต่ละชุดการทดลองตลอดระยะเวลา 30 วัน คือ *Tamlana crocina* LV 32 (17.73-22.78%), *Micrococcus koreense* LV 28 (17.84-22.76%), *Shewanella* sp. LV 29 (14.59-17.89%), *Staphylococcus haemolyticus* LV 31 (8.94-12.27%), *Staphylococcus arlettae* LV 30 (11.8-13.64%) และ *Halobacillus kuroshimensis* LV 27 (12.92-14.24%) ส่วนแบคทีเรียที่พบส่วนน้อย ได้แก่ *Vibrio* sp. LV 36 (2.02-2.87%), *Bacillus aryabhattai* LV 26 (2.62-4.09%) และ *Vibrio* sp. LV 37 (0.48-4.04%) ตามลำดับ โดยในวันที่ 30 ของการทดลอง ไม่สามารถตรวจพบ *Vibrio* sp. LV 36 และ *Vibrio* sp. LV 37 ในชุดการทดลองที่เติมโพรไบโอติก (FB และ MB) ดังแสดงในภาพที่ 24

เมื่อทดสอบความต้านทานแบคทีเรียก่อโรคพบว่าการเติม *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ไม่มีผลต่อปริมาณแบคทีเรียทางทะเลใน Hepatopancreas-Intestine ของกุ้งขาวแวนนาไมทั้ง 3 ชุดการทดลอง โดยตรวจพบ *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ในแต่ละชุดการทดลองในสัดส่วนเพียงเล็กน้อยซึ่งแบคทีเรียชนิดเด่นใน Hepatopancreas-Intestine ของกุ้งขาวแวนนาไมในแต่ละชุดการทดลองยังคงเป็นชนิดเดิมเช่นเดียวกับก่อนทดสอบความต้านทานแบคทีเรียก่อโรค และแบคทีเรียแต่ละชนิดมีสัดส่วนค่อนข้างคงที่ตลอดระยะเวลาการทดสอบความต้านทานแบคทีเรียก่อโรคเป็นเวลา 10 วัน ดังแสดงในภาพที่ 25

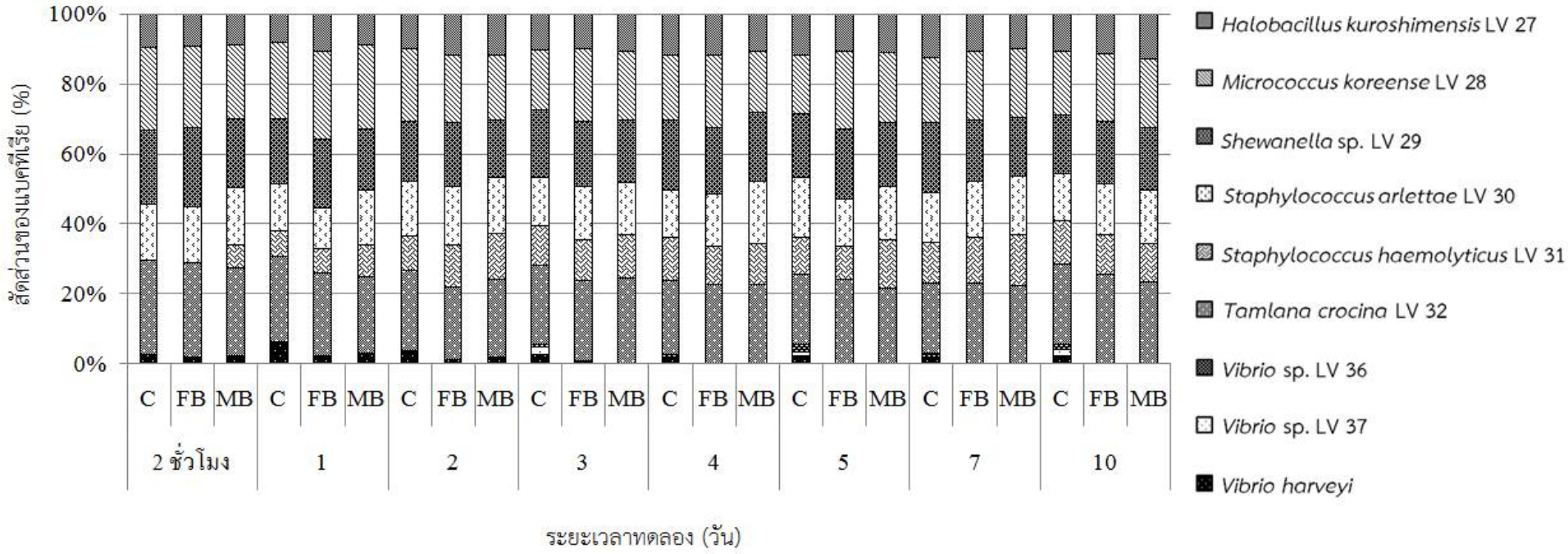


ภาพที่ 24 สัดส่วนและชนิดของแบคทีเรียทางทะเลใน Hepatopancreas-Intestine ของกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 30 ก่อนการทดสอบความต้านทานต่อแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* สายพันธุ์ 002

หมายเหตุ C = ชุดควบคุม

FB = ชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งลงในอาหารเลี้ยงกุ้งให้ได้ความเข้มข้น 10^8 CFU/g

MB = ชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมในรูปไมโครแคปซูลลงในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งให้ได้ความเข้มข้น 10^8 CFU/ml



ภาพที่ 25 สัดส่วนและชนิดของแบคทีเรียทางทะเลใน Hepatopancreas-Intestine ของกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 30 หลังทดสอบความต้านทานต่อแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* สายพันธุ์ 002

หมายเหตุ C = ชุดควบคุม

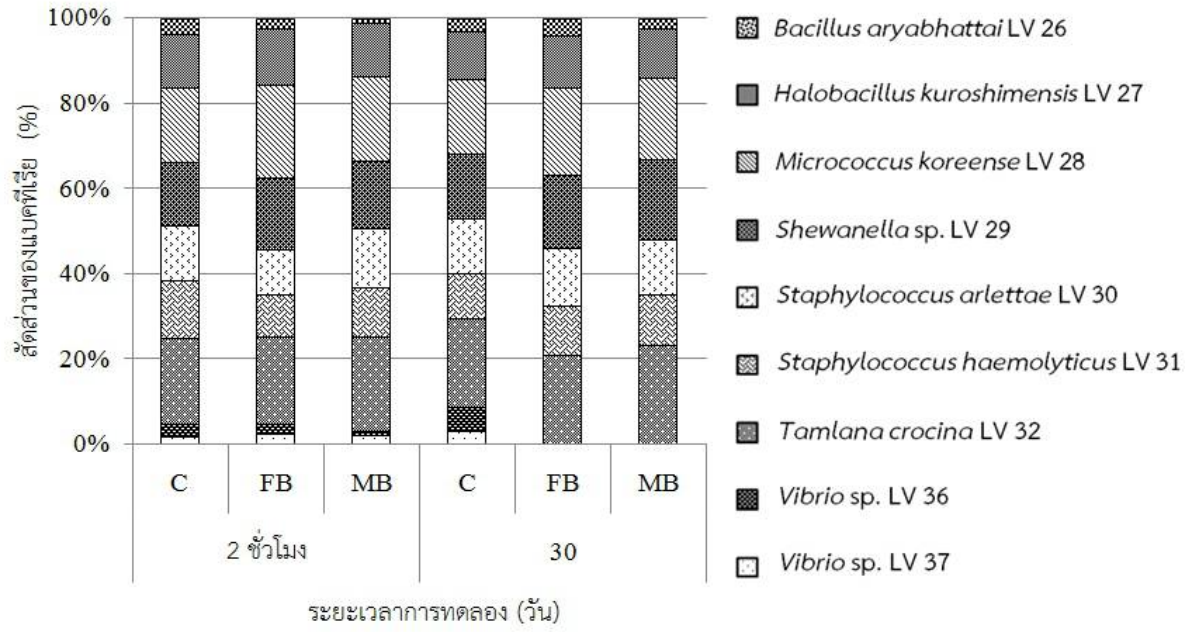
FB = ชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งลงในอาหารเลี้ยงกุ้งให้ได้ความเข้มข้น 10^8 CFU/g

MB = ชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมในรูปไมโครแคปซูลลงในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งให้ได้ความเข้มข้น 10^8 CFU/ml

3.4 สัดส่วน (%) และชนิดของแบคทีเรียทางทะเลในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในช่วงก่อนและหลังการทดสอบความต้านทานต่อแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* สายพันธุ์ 002

ชนิดของแบคทีเรียทางทะเลในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในช่วงก่อนทดสอบความต้านทานแบคทีเรียก่อโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 สามารถจำแนกแบคทีเรียได้ 8 ชนิด เช่นเดียวกับที่พบใน Hepatopancreas-Intestine ของกุ้งขาวแวนนาไม และสัดส่วนของแบคทีเรียทางทะเลแต่ละชนิดในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมของแต่ละชุดการทดลองมีค่าใกล้เคียงกับที่พบใน Hepatopancreas-Intestine ของกุ้งขาวแวนนาไม ดังแสดงในภาพที่ 26

เมื่อทดสอบความต้านทานแบคทีเรียก่อโรคของกุ้งขาวแวนนาไม พบว่าการเติม *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 มีผลต่อสัดส่วนแบคทีเรียทางทะเลในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมของทั้ง 3 ชุดการทดลอง โดยหลังจากเติม *V. harveyi* เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียทางทะเลชนิดเด่นที่พบในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมของทั้ง 3 ชุดการทดลอง คือ *V. harveyi* (63.71-67.28%) รองลงมาคือ *Tamlana crocina* LV 32 (10.60-12.50%), *Micrococcus koreense* LV 28 (9.40-10.14%) *Shewanella* sp. LV 29 (4.70-8.47%) และ *Staphylococcus arlettae* LV 30 (2.99-5.24%) ตามลำดับ ส่วน *Halobacillus kuroshimensis* LV 27, *Staphylococcus haemolyticus* LV 31, *Vibrio* sp. LV 36 และ *Vibrio* sp. LV 37 ไม่สามารถตรวจพบได้ จากนั้นพบว่าสัดส่วนของ *V. harveyi* ลดลงจนถึงสิ้นสุดการทดลอง โดยสัดส่วนของ *V. harveyi* ทั้ง 2 ชุดที่ได้รับโพรไบโอติกมีค่าน้อยกว่าที่พบในชุดควบคุม ส่วนแบคทีเรียทางทะเลชนิดอื่น ๆ มีสัดส่วนเพิ่มขึ้นและสามารถตรวจพบแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ที่หายไปตั้งแต่วันที่ 2 ของการทดสอบความต้านทานแบคทีเรียก่อโรคเป็นต้นไป อย่างไรก็ตามในชุดการทดลองที่เติมโพรไบโอติกไม่สามารถตรวจพบสัดส่วนของ *Vibrio* sp. LV 36 และ *Vibrio* sp. LV 37 ตลอดระยะเวลาการทดสอบความต้านทานแบคทีเรียก่อโรค ดังแสดงในภาพที่ 27

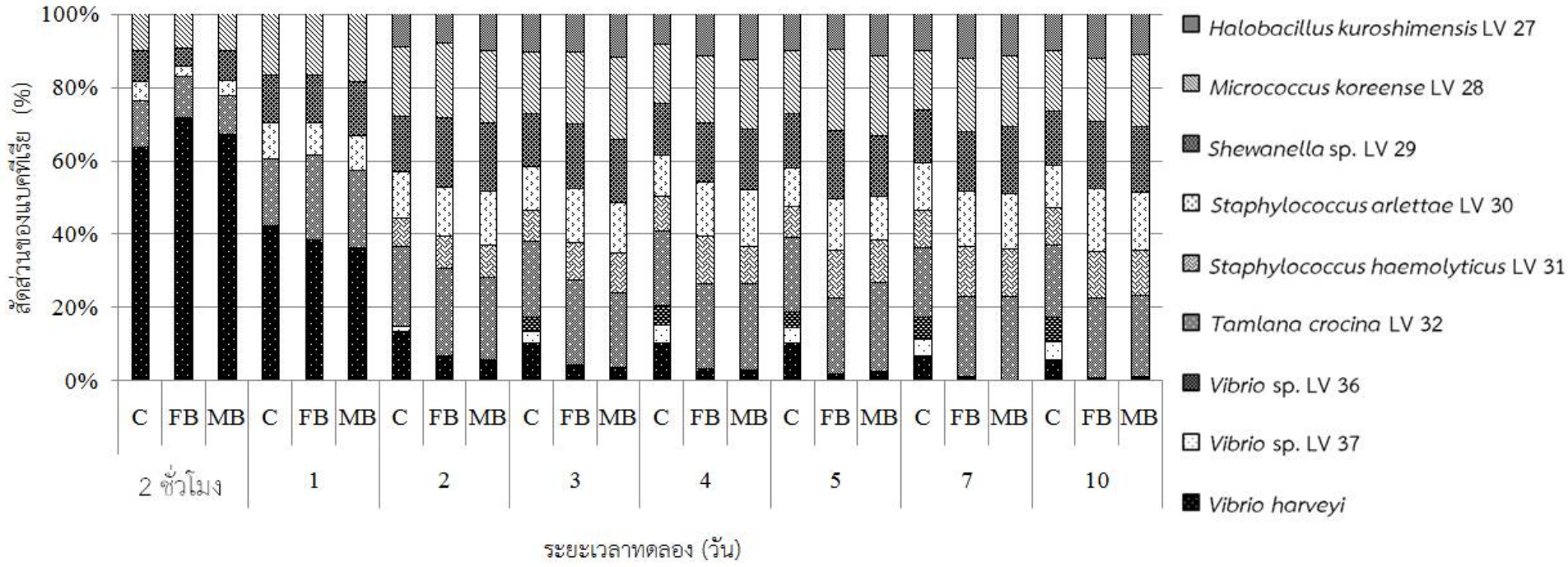


ภาพที่ 26 สัดส่วนและชนิดของแบคทีเรียทางทะเลในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 30 ก่อนทดสอบความต้านทานต่อแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* สายพันธุ์ 002

หมายเหตุ C = ชุดควบคุม

FB = ชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งลงในอาหารเลี้ยงกุ้งให้ได้ความเข้มข้น 10^8 CFU/g

MB = ชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมในรูปไมโครแคปซูลลงในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งให้ได้ความเข้มข้น 10^8 CFU/ml



ภาพที่ 27 สัดส่วนและชนิดของแบคทีเรียทางทะเลในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมหลังทดสอบความต้านทานต่อแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* สายพันธุ์ 002

หมายเหตุ C = ชุดควบคุม

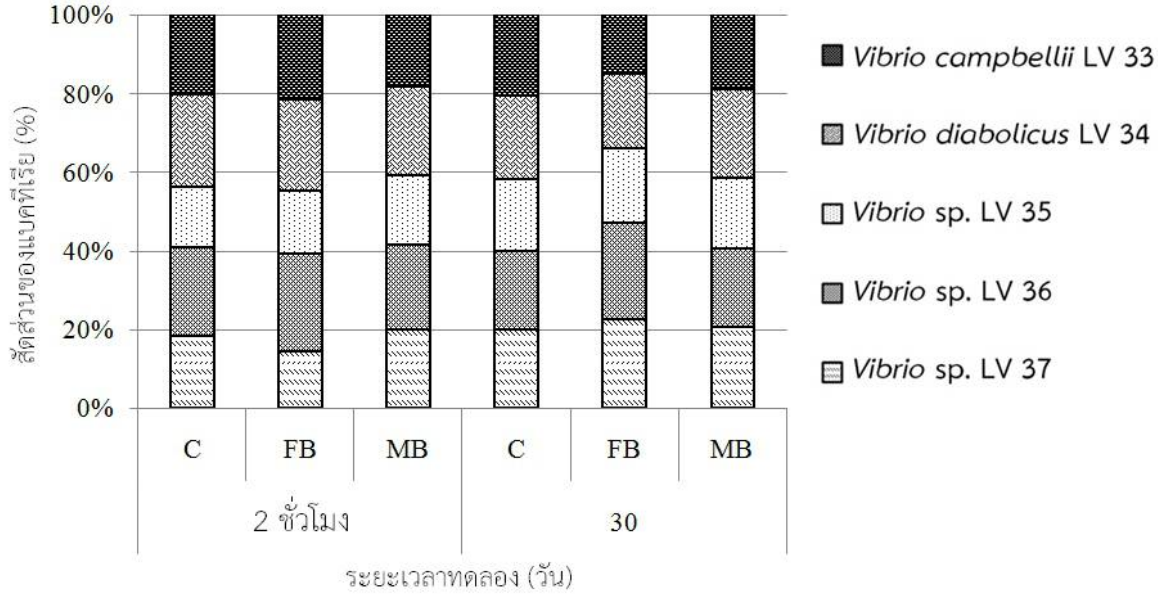
FB = ชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งลงในอาหารเลี้ยงกุ้งให้ได้ความเข้มข้น 10^8 CFU/g

MB = ชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมในรูปไมโครแคปซูลลงในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งให้ได้ความเข้มข้น 10^8 CFU/ml

3.5 สัดส่วน (%) และชนิดของแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ใน Hepatopancreas-Intestine ของกุ้งขาวแวนนาไมที่เจริญบนอาหาร TCBS agar ในช่วงก่อนและหลังทดสอบความต้านทานแบคทีเรียก่อโรคจาก *V. harveyi* สายพันธุ์ 002

แบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ใน Hepatopancreas-Intestine ของกุ้งขาวแวนนาไมในช่วง 30 วันก่อนการทดสอบความต้านทานแบคทีเรียก่อโรคจำแนกได้ 5 ชนิด ได้แก่ *Vibrio campbellii* LV 33, *Vibrio diabolicus* LV 34, *Vibrio* sp. LV 35, *Vibrio* sp. LV 36 และ *Vibrio* sp. LV 37 โดยแบคทีเรียชนิดเด่นใน Hepatopancreas-Intestine ของทั้ง 3 ชุด ตลอดระยะเวลาการทดลอง 30 วัน คือ *Vibrio* sp. LV 36 (20.00 -25.00%), *Vibrio diabolicus* LV 34 (18.87 -23.47%), *Vibrio* sp. LV 37 (14.29 -22.64%), *Vibrio campbellii* LV 33 (15.09 -21.43%) และ *Vibrio* sp. LV 35 (15.31 - 18.87%) ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 28 จากผลการทดลองจะพบว่าสัดส่วนของแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae แต่ละชนิดใน Hepatopancreas-Intestine ของแต่ละชุดการทดลองมีค่าไม่แตกต่างกัน แต่อย่างไรก็ตามสัดส่วนของแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae แต่ละชนิดใน Hepatopancreas-Intestine ของชุดที่เติมโพรไบโอติกทั้ง 2 ชุด คำนวณมาจากปริมาณที่น้อยกว่าในชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

เมื่อทดสอบความต้านทานแบคทีเรียก่อโรคพบว่าการเติม *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ลงในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมมีผลต่อสัดส่วนของแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ใน Hepatopancreas-Intestine ของกุ้งขาวแวนนาไมทั้ง 3 ชุดการทดลอง โดยหลังจากเติม *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 พบว่าแบคทีเรียชนิดเด่นที่พบใน Hepatopancreas-Intestine ของกุ้งขาวแวนนาไมทั้ง 3 ชุดการทดลอง คือ *V. harveyi* (51.79-59.38%) รองลงมาคือ *Vibrio* sp. LV 36 (16.41- 21.43%), *Vibrio diabolicus* LV 34 (18.75- 19.64%) ส่วนแบคทีเรียที่พบส่วนน้อย ได้แก่ *Vibrio campbellii* LV 33 (2.34-7.14%) ส่วน *Vibrio* sp. LV 37 ตรวจพบเฉพาะในชุดควบคุม (3.12%) และ *Vibrio* sp. LV 35 ไม่สามารถตรวจพบทั้ง 3 ชุดการทดลอง แต่สามารถตรวจพบได้ตั้งแต่วันที่ 1 ของการทดสอบเป็นต้นไป และพบว่าสัดส่วนของ *V. harveyi* เพิ่มสูงขึ้นจนถึงวันที่ 2 ของการทดสอบจากนั้นมีสัดส่วนลดลงและมีสัดส่วนค่อนข้างคงที่ตั้งแต่วันที่ 7 ไปจนถึงวันที่ 10 ของการทดสอบความต้านทานแบคทีเรียก่อโรค ดังแสดงในภาพที่ 29

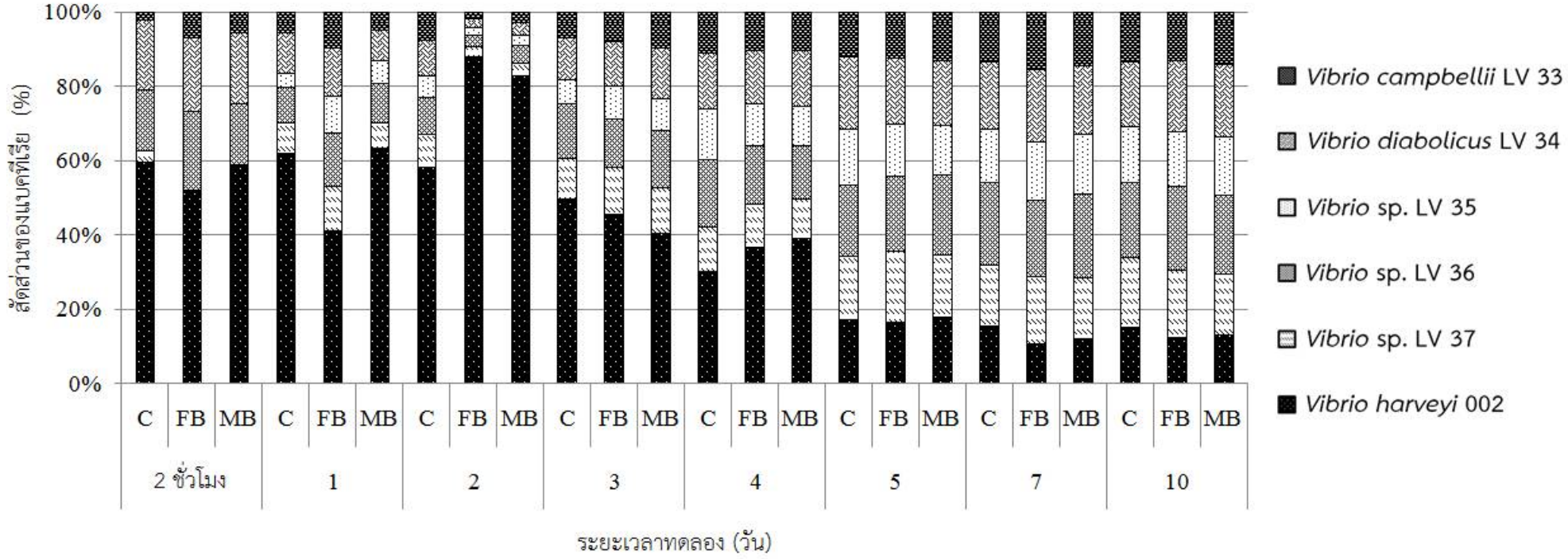


ภาพที่ 28 สัดส่วนและชนิดของแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ใน Hepatopancreas-Intestine ของกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 30 บนอาหาร TCBS agar ก่อนทดสอบความต้านทานต่อแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* สายพันธุ์ 002

หมายเหตุ C = ชุดควบคุม

FB = ชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งลงในอาหารเลี้ยงกุ้งให้ได้ความเข้มข้น 10^8 CFU/g

MB = ชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมในรูปไมโครแคปซูลลงในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งให้ได้ความเข้มข้น 10^8 CFU/ml



ภาพที่ 29 สัดส่วนและชนิดของแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ใน Hepatopancreas-Inteastine ของกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 30 บนอาหาร TCBS agar หลังทดสอบความต้านทานต่อแบคทีเรียก่อโรคจาก *V. harveyi* สายพันธุ์ 002

หมายเหตุ C = ชุดควบคุม

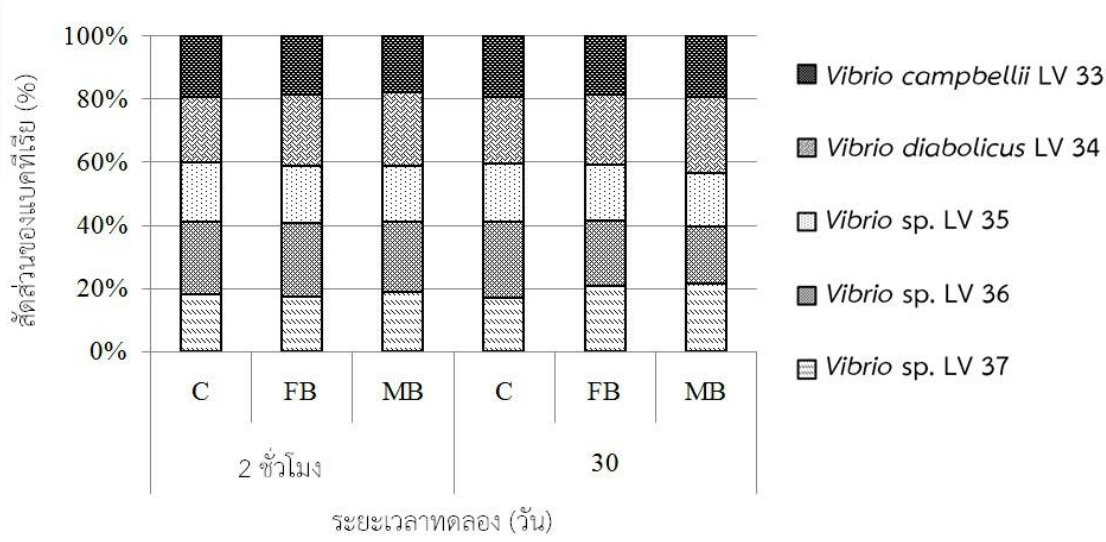
FB = ชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งลงในอาหารเลี้ยงกุ้งให้ได้ความเข้มข้น 10^8 CFU/g

MB = ชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมในรูปไมโครแคปซูลลงในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งให้ได้ความเข้มข้น 10^8 CFU/ml

3.6 สัดส่วน (%) และชนิดของแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมที่เจริญบนอาหาร TCBS agar ในช่วงก่อนและหลังทดสอบความต้านทานต่อแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* สายพันธุ์ 002

ชนิดของแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมสามารถจำแนกได้เป็น 6 ชนิด เช่นเดียวกับที่พบใน Hepatopancreas-Intestine โดยแบคทีเรียชนิดเด่นที่พบในทั้ง 3 ชุดการทดลอง ตลอดระยะเวลา 30 วัน ก่อนทดสอบความต้านทานแบคทีเรียก่อโรค คือ *Vibrio* sp. LV 36 (18.31 -23.94%), *Vibrio diabolicus* LV 34 (20.90-23.94%), *Vibrio* sp. LV 37 (16.90-21.13%), *Vibrio campbellii* LV 33 (18.18 - 19.72%) และ *Vibrio* sp. LV 35 (16.90 -18.66%) ดังแสดงในภาพที่ 30

เมื่อทดสอบความต้านทานโรคจาก *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 พบว่าแบคทีเรียชนิดเด่นในแต่ละชุดการทดลองคือ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 002 คิดเป็นสัดส่วน 100 เปอร์เซ็นต์ หลังจากเติม *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นพบว่า *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 มีสัดส่วนลดลงเพียงเล็กน้อยในวันที่ 1 ของการทดสอบความต้านทานแบคทีเรียก่อโรค และมีสัดส่วนสูงสุดในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมของทั้ง 3 ชุดการทดลอง ตลอดระยะเวลาการทดสอบความต้านทานแบคทีเรียก่อโรคเป็นระยะเวลา 10 วัน ดังแสดงในภาพที่ 31

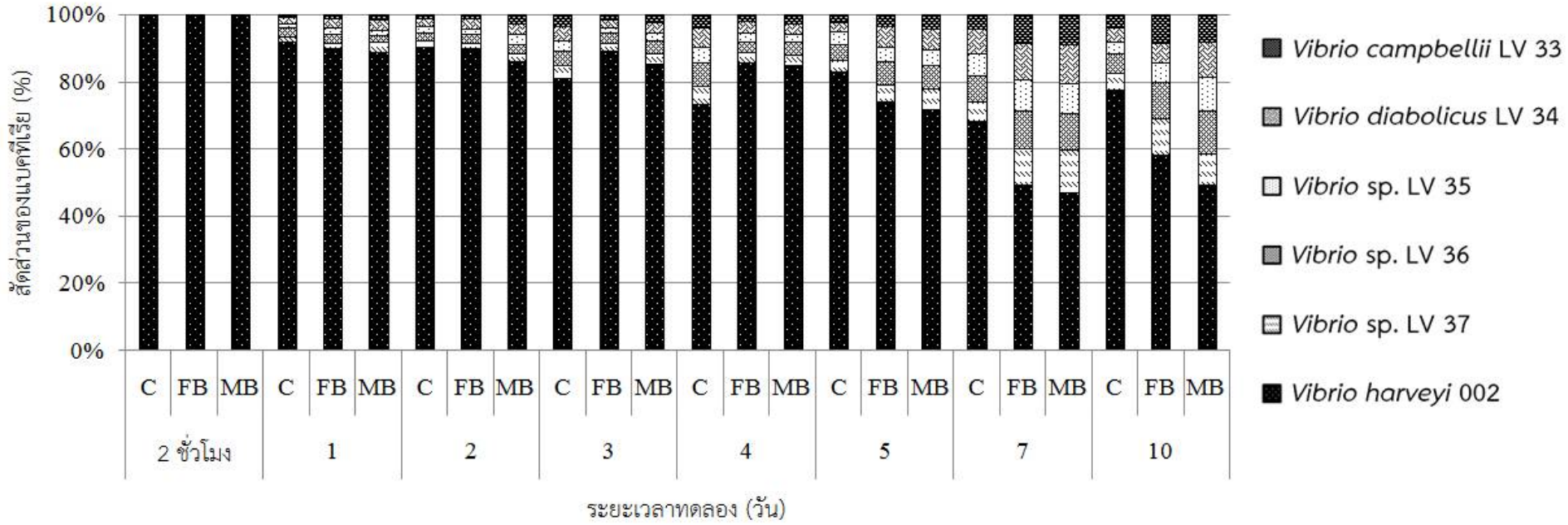


ภาพที่ 30 สัดส่วนและชนิดของแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม ระยะโพสลาวา 30 บนอาหาร TCBS agar ก่อนทดสอบความต้านทานต่อแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* สายพันธุ์ 002

หมายเหตุ C = ชุดควบคุม

FB = ชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งลงในอาหารเลี้ยงกุ้งให้ได้ความเข้มข้น 10^8 CFU/g

MB = ชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมในรูปไมโครแคปซูลลงในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งให้ได้ความเข้มข้น 10^8 CFU/ml



ภาพที่ 31 สัดส่วนและชนิดของแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ในน้ำที่ใช้เพาะลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 30 บนอาหาร TCBS agar หลังทดสอบความต้านทานต่อแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* สายพันธุ์ 002

หมายเหตุ C = ชุดควบคุม

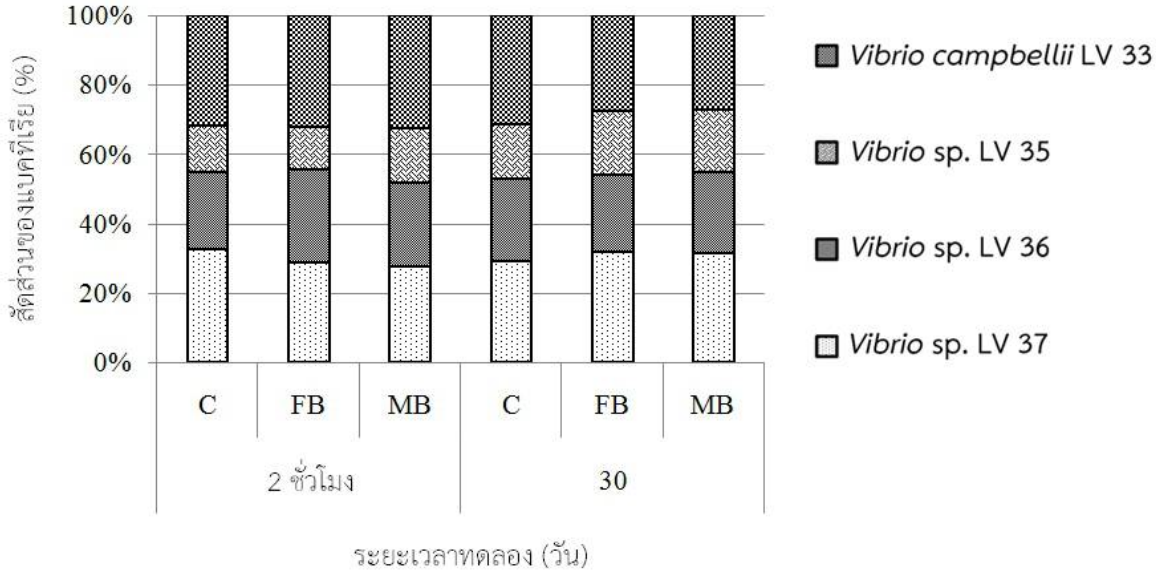
FB = ชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งลงในอาหารเลี้ยงกุ้งให้ได้ความเข้มข้น 10^8 CFU/g

MB = ชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมในรูปไมโครแคปซูลลงในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งให้ได้ความเข้มข้น 10^8 CFU/ml

3.7 สัดส่วน (%) ของ *V. harveyi* และแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ชนิดอื่น ๆ ใน Hepatopancreas-Intestine ของกุ้งขาวแวนนาไมที่เจริญบนอาหาร VHA ในช่วงก่อนและหลังทดสอบความต้านทานต่อแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* สายพันธุ์ 002

ชนิดของแบคทีเรียใน Hepatopancreas-Intestine ของกุ้งขาวแวนนาไมที่เจริญบนอาหาร VHA ในช่วงการทดลอง 30 วันก่อนทดสอบความต้านทานแบคทีเรียก่อโรคจาก *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 พบว่าจำแนกได้ 4 ชนิด ได้แก่ *Vibrio campbellii* LV 33, *Vibrio* sp. LV 35, *Vibrio* sp. LV 36 และ *Vibrio* sp. LV 37 โดยตรวจไม่พบ *V. harveyi* ตลอดระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 30 วัน สำหรับแบคทีเรียชนิดเด่นตลอดระยะเวลาการทดลอง 30 วัน ก่อนทำการทดสอบความต้านทานแบคทีเรียก่อโรค คือ *Vibrio campbellii* LV 33 (27.20 -32.61%), *Vibrio* sp. LV 37 (27.72-32.67%), *Vibrio* sp. LV 36 (21.96-26.92%) และ *Vibrio* sp. LV 35 (12.39-18.58%) ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 32

เมื่อทดสอบความต้านทานต่อแบคทีเรียก่อโรคของกุ้งขาวแวนนาไมพบว่าการเติม *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 มีผลต่อปริมาณแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ชนิดอื่น ๆ ใน Hepatopancreas-Intestine ของกุ้งขาวแวนนาไมโดยหลังจากเติม *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่าชนิดของแบคทีเรียที่พบใน Hepatopancreas-Intestine ของกุ้งขาวแวนนาไมของทั้ง 3 ชุดการทดลอง คือ *V. harveyi* เพียงชนิดเดียว จากนั้นพบว่าสัดส่วนของ *V. harveyi* ใน Hepatopancreas-Intestine ของกุ้งขาวแวนนาไมในแต่ละชุดการทดลองมีสัดส่วนลดลงตั้งแต่วันที่ 1 ไปจนถึงวันที่ 10 ของการทดสอบความต้านทานแบคทีเรียก่อโรค และสามารถตรวจพบแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ชนิดอื่น ๆ ที่หายไป โดย *V. harveyi* มีสัดส่วนค่อนข้างสูงตลอดระยะเวลาการทดสอบความต้านทานต่อแบคทีเรียก่อโรคเป็นเวลา 10 วัน แต่อย่างไรก็ตามสัดส่วนของแบคทีเรียในชุดที่เติมโพรไบโอติกทั้ง 2 ชุด คำนวณมาจากปริมาณที่มีค่าน้อยกว่าในชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 33

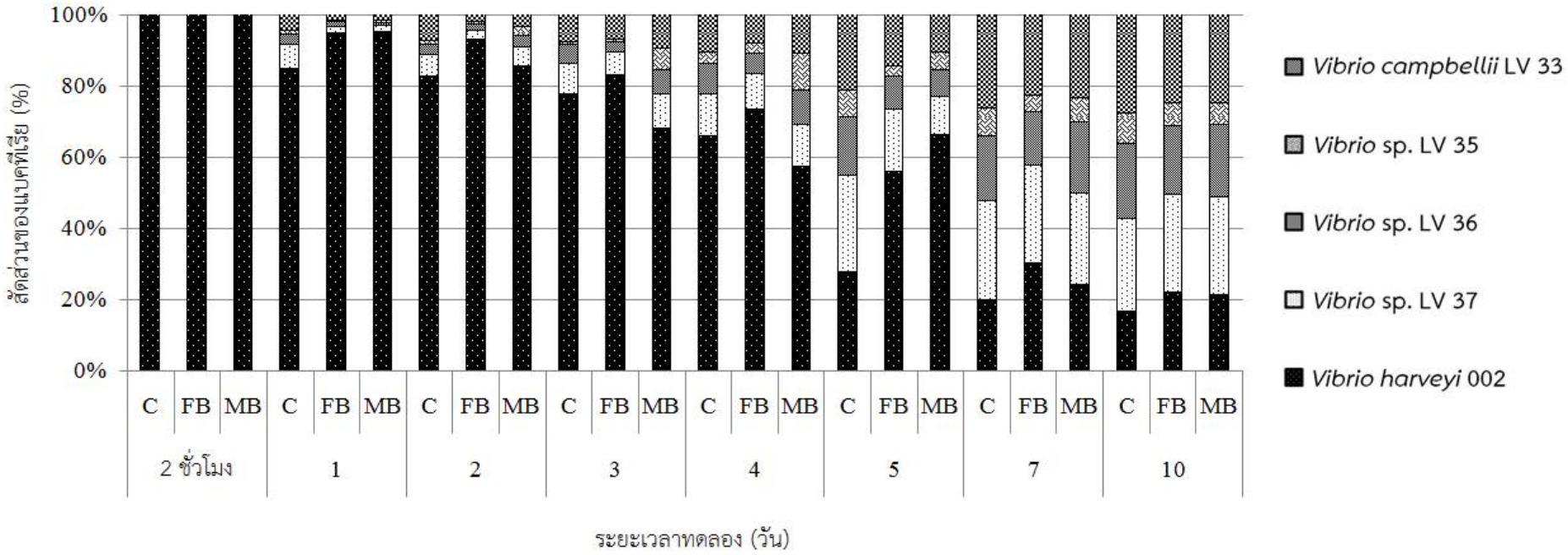


ภาพที่ 32 สัดส่วนของ *V. harveyi* และแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ใน Hepatopancreas-Intestine ของกุ้งขาวแวนนาไมบนอาหาร VHA ก่อนทดสอบความต้านทานต่อแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* สายพันธุ์ 002

หมายเหตุ C = ชุดควบคุม

FB = ชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งลงในอาหารเลี้ยงกุ้งให้ได้ความเข้มข้น 10^8 CFU/g

MB = ชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมในรูปไมโครแคปซูลลงในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งให้ได้ความเข้มข้น 10^8 CFU/ml



ภาพที่ 33 สัดส่วนของ *V. harveyi* และแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ชนิดอื่น ๆ ที่ไม่ใช่ *V. harveyi* ใน Hepatopancreas ของกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 30 บนอาหาร VHA หลังทดสอบความต้านทานต่อแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* สายพันธุ์ 002

หมายเหตุ C = ชุดควบคุม

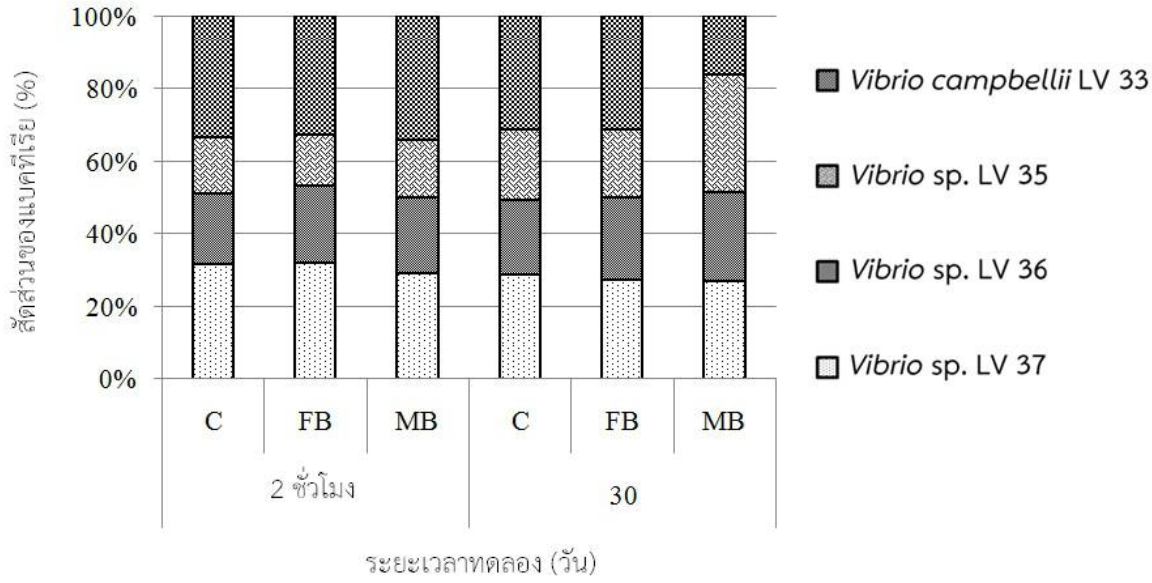
FB = ชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งลงในอาหารเลี้ยงกุ้งให้ได้ความเข้มข้น 10^8 CFU/g

MB = ชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมในรูปไมโครแคปซูลลงในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งให้ได้ความเข้มข้น 10^8 CFU/ml

3.8 สัดส่วน (%) และชนิดของแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมที่เจริญบนอาหาร VHA ในช่วงก่อนและหลังการทดสอบความต้านทานแบคทีเรียก่อโรคจาก *V. harveyi* สายพันธุ์ 002

ชนิดของแบคทีเรียในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมที่เจริญบนอาหาร VHA ของทั้ง 3 ชุดการทดลอง ในช่วงระยะ 30 วัน ก่อนทดสอบความต้านทานแบคทีเรียก่อโรคสามารถจำแนกได้เป็น 4 ชนิด เช่นเดียวกับที่พบใน Hepatopancreas-Intestine ของกุ้งขาวแวนนาไมโดยตรวจไม่พบ *V. harveyi* แบคทีเรียชนิดเด่นที่พบในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมทั้ง 3 ชุดการทดลองตลอดระยะเวลา 30 วัน ได้แก่ *Vibrio campbellii* LV 33 (16.22 -33.57%), *Vibrio* sp. LV 37 (27.03 - 32.03%), *Vibrio* sp. LV 36 (19.71- 24.32%) และ *Vibrio* sp. LV 35 (14.06 - 32.43%) ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 34

เมื่อทดสอบความต้านทานแบคทีเรียก่อโรคพบว่าแบคทีเรียชนิดเด่นในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมตลอดระยะเวลาการทดสอบความต้านทานต่อแบคทีเรียก่อโรคเป็นเวลา 10 วัน คือ *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 โดยในช่วงเริ่มต้นการทดลองหลังจากเติม *V. harveyi* ในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่าชนิดของแบคทีเรียที่พบในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมของทั้ง 3 ชุดการทดลอง คือ *V. harveyi* 100% จากนั้นพบว่าสัดส่วนของ *V. harveyi* ลดลงเล็กน้อย และสามารถตรวจพบสัดส่วนของแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ที่หายไป แต่อย่างไรก็ตามสัดส่วนของแบคทีเรียในชุดที่เติมโพรไบโอติกทั้ง 2 ชุด คำนวณมาจากปริมาณที่มีค่าน้อยกว่าในชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 35

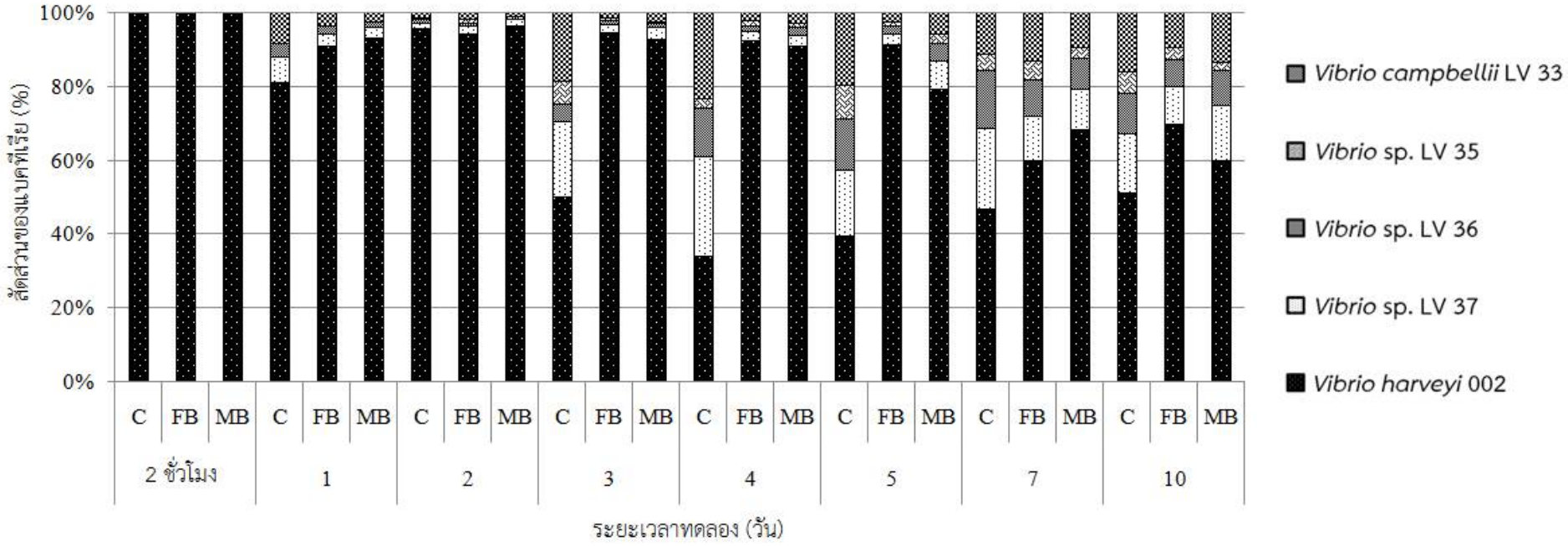


ภาพที่ 34 สัดส่วนของ *V. harveyi* และแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมบนอาหาร VHA ก่อนทดสอบความต้านทานแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* สายพันธุ์ 002

หมายเหตุ C = ชุดควบคุม

FB = ชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งลงในอาหารเลี้ยงกุ้งให้ได้ความเข้มข้น 10^8 CFU/g

MB = ชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมในรูปไมโครแคปซูลลงในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งให้ได้ความเข้มข้น 10^8 CFU/ml



ภาพที่ 35 สัดส่วนของ *V. harveyi* และแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ชนิดอื่น ๆ ที่ไม่ใช่ *V. harveyi* ในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 30 บนอาหาร VHA หลังทดสอบความต้านทานต่อแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* สายพันธุ์ 002

หมายเหตุ C = ชุดควบคุม

FB = ชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งลงในอาหารเลี้ยงกุ้งให้ได้ความเข้มข้น 10^8 CFU/g

MB = ชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมในรูปไมโครแคปซูลลงในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งให้ได้ความเข้มข้น 10^8 CFU/ml

บทที่ 5
สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

สรุปผลการทดลอง

1. แบคทีเรียโพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (FB) และรูปไมโครแคปซูล (MB) มีประสิทธิภาพเท่าเทียมกันในด้านการควบคุมคุณภาพน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมระยะวัยอ่อน (โพสลาวา 30) โดยเฉพาะอย่างยิ่งการลดปริมาณแอมโมเนียและไนไทรต์ให้มีค่าน้อยกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

2. อัตราส่วนของ *Bacillus* ต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดใน Hepatopancreas-Intestine ของกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 30 ในช่วงก่อนและหลังทดสอบความต้านทานโรคที่เกิดจาก *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 สามารถสรุปได้ว่า *Bacillus* โพรไบโอติกผสมในรูปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งและรูปแบบไมโครแคปซูลสามารถรอดชีวิตและเจริญใน Hepatopancreas-Intestine ของกุ้งขาวแวนนาไมได้ ส่งผลให้อัตราส่วนของ *Bacillus* ต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดใน Hepatopancreas-Intestine ของกุ้งขาวแวนนาไมทั้ง 2 ชุดการทดลองเพิ่มขึ้น และการเติม *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ลงในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมให้ได้ความเข้มข้น 10^6 CFU/ml ส่งผลให้อัตราส่วนของ *Bacillus* ต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดใน Hepatopancreas-Intestine ของกุ้งขาวแวนนาไมทั้ง 3 ชุดการทดลองลดลง

3. ชนิดของแบคทีเรียทางทะเลใน Hepatopancreas-Intestine ของกุ้งขาวแวนนาไมในช่วงเริ่มต้นการทดลองสามารถจำแนกได้ 9 ชนิด ได้แก่ *Bacillus aryabhattai* LV 26, *Halobacillus kuroshimensis* LV 27, *Micrococcus koreense* LV 28, *Shewanella* sp. LV 29, *Staphylococcus arlettae* LV 30, *Staphylococcus haemolyticus* LV 31, *Tamlana crocina* LV 32, *Vibrio* sp. LV 36 และ *Vibrio* sp. LV 37 เมื่อพิจารณาสัดส่วนของแบคทีเรียแต่ละชนิดพบว่าแบคทีเรียชนิดเด่นในแต่ละชุดการทดลองตลอดระยะเวลา 30 วัน คือ *Tamlana crocina* LV 32 (17.73-22.78%), *Micrococcus koreense* LV 28 (17.84-22.76%), *Shewanella* sp. LV 29 (14.59-17.89%), *Staphylococcus haemolyticus* LV 31 (8.94-12.27%), *Staphylococcus arlettae* LV 30 (11.8-13.64%) และ *Halobacillus kuroshimensis* LV 27 (12.92-14.24%) ส่วนแบคทีเรียที่พบส่วนน้อยได้แก่ *Vibrio* sp. LV 36 (2.02-2.87%), *Bacillus aryabhattai* LV 26 (2.62-4.09%) และ *Vibrio* sp. LV 37 (0.48-4.04%) ตามลำดับ เมื่อทดสอบความต้านทานแบคทีเรียก่อโรคพบว่าการเติม *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ไม่มีผลต่อปริมาณแบคทีเรียทางทะเลใน Hepatopancreas-Intestine ของกุ้งขาวแวนนาไมทั้ง 3 ชุดการทดลอง โดยตรวจพบ *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ในแต่ละชุดการทดลองในสัดส่วนเพียงเล็กน้อย ซึ่งแบคทีเรียชนิดเด่นใน Hepatopancreas-Intestine ของกุ้งขาวแวนนาไมในแต่ละชุดการทดลองยังคงเป็นชนิดเดิมเช่นเดียวกับก่อนทดสอบความต้านทานแบคทีเรียก่อโรค และแบคทีเรียแต่ละชนิดมีสัดส่วนค่อนข้างคงที่ตลอดระยะเวลาการทดสอบความต้านทานแบคทีเรียก่อโรคเป็นเวลา 10 วัน

4. แบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ใน Hepatopancreas-Intestine ของกุ้งขาวแวนนาไมในช่วง 30 วันก่อนการทดสอบความต้านทานแบคทีเรียก่อโรคจำแนกได้ 5 ชนิด ได้แก่ *Vibrio campbellii* LV 33, *Vibrio diabolicus* LV 34, *Vibrio* sp. LV 35, *Vibrio* sp. LV 36 และ *Vibrio* sp. LV 37 โดยแบคทีเรียชนิดเด่นใน Hepatopancreas-Intestine ของทั้ง 3 ชุดการทดลอง ตลอดระยะเวลาการทดลอง 30 วัน คือ *Vibrio* sp. LV 36 (20.00 -25.00%), *Vibrio diabolicus* LV 34 (18.87 -23.47%), *Vibrio* sp. LV 37 (14.29 -22.64%), *Vibrio campbellii* LV 33 (15.09 - 21.43%) และ *Vibrio* sp. LV 35 (15.31 - 18.87%) ตามลำดับ เมื่อทดสอบความต้านทานแบคทีเรียก่อโรคพบว่าการเติม *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ลงในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมมีผลต่อสัดส่วนของแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ใน Hepatopancreas-Intestine ของกุ้งขาวแวนนาไมทั้ง 3 ชุดการทดลอง โดยหลังจากเติม *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 พบว่าแบคทีเรียชนิดเด่นที่พบใน Hepatopancreas-Intestine ของกุ้งขาวแวนนาไมทั้ง 3 ชุดการทดลอง คือ *V. harveyi* (51.79-59.38%) รองลงมาคือ *Vibrio* sp. LV 36 (16.41- 21.43%), *Vibrio diabolicus* LV 34 (18.75-19.64%) ส่วนแบคทีเรียที่พบส่วนน้อย ได้แก่ *Vibrio campbellii* LV 33 (2.34-7.14%) และพบว่าสัดส่วนของ *V. harveyi* เพิ่มสูงขึ้นจนถึงวันที่ 2 ของการทดสอบจากนั้นมีสัดส่วนลดลงและมีสัดส่วนค่อนข้างคงที่ตั้งแต่วันที่ 7 ไปจนถึงวันที่ 10 ของการทดสอบความต้านทานแบคทีเรียก่อโรค

5. *V. harveyi* เป็นแบคทีเรียที่ตรวจไม่พบใน Hepatopancreas-Intestine ของกุ้งขาวแวนนาไมในช่วงการทดลอง 30 วันก่อนทดสอบความต้านทานแบคทีเรียก่อโรคจาก *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 เมื่อทดสอบความต้านทานต่อแบคทีเรียก่อโรคของกุ้งขาวแวนนาไมพบว่าการเติม *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 มีผลต่อปริมาณแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ชนิดอื่น ๆ ใน Hepatopancreas-Intestine ของกุ้งขาวแวนนาไม โดยหลังจากเติม *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่าชนิดของแบคทีเรียที่พบใน Hepatopancreas-Intestine ของกุ้งขาวแวนนาไมของทั้ง 3 ชุดการทดลอง คือ *V. harveyi* เพียงชนิดเดียว จากนั้นพบว่าสัดส่วนของ *V. harveyi* ใน Hepatopancreas-Intestine ของกุ้งขาวแวนนาไมในแต่ละชุดการทดลองมีสัดส่วนลดลงตั้งแต่วันที่ 1 ไปจนถึงวันที่ 10 ของการทดสอบความต้านทานแบคทีเรียก่อโรค และสามารถตรวจพบแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ชนิดอื่น ๆ ที่หายไป โดย *V. harveyi* มีสัดส่วนค่อนข้างสูงตลอดระยะเวลาการทดสอบความต้านทานต่อแบคทีเรียก่อโรคเป็นเวลา 10 วัน แต่อย่างไรก็ตามสัดส่วนของแบคทีเรียในชุดที่เติมโพรไบโอติกทั้ง 2 ชุด คำนวณมาจากปริมาณที่มีค่าน้อยกว่าในชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

อภิปรายผลการทดลอง

1. บทบาทของแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมต่อการควบคุมคุณภาพน้ำ

การศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมทั้ง 2 รูปแบบ คือ แบคทีเรียโพรไบโอติกผสมในรูปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (FB) และรูปไมโครแคปซูล (MB) สามารถควบคุมคุณภาพน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมทั้งระยะวัยอ่อน (โพสลาวา 30) ได้แก่ แอมโมเนีย ไนไทรต์ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ สอดคล้องกับการศึกษาของ Nimrat et al. (2012) ที่พบว่า *Bacillus* โพรไบโอติกผสมในรูปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งที่เหมือนกับการศึกษาในครั้งนี้ สามารถลดปริมาณแอมโมเนียและไนไทรต์ในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม รวมถึงการศึกษาของ Jueliang et al. (2011) ที่

ทำการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมน้ำหนักประมาณ 7-8 กรัม ด้วยโพรไบโอติกทางการค้าพบว่าปริมาณไนไทรต์ในชุดควบคุม (มีค่าระหว่าง 0.149 ± 0.026 – 1.853 ± 0.066 มิลลิกรัมต่อลิตร) มีค่าสูงกว่าชุดที่ให้อาหารผสมโพรไบโอติก (0.128 ± 0.032 – 1.146 ± 0.058 มิลลิกรัมต่อลิตร) ตลอดระยะเวลาทดลอง ส่วน Somboon et al. (2009) ที่ทำการศึกษาถึงการใช้โพรไบโอติกทางการค้าจำนวน 3 ยี่ห้อ ที่มี *Bacillus* เป็นองค์ประกอบ สำหรับการอนุบาลลูกกุ้งขาวแวนนาไมตั้งแต่ระยะนอเพลียสจนถึงระยะโพสลาวา 8 โดยการเติมโพรไบโอติก (ความเข้มข้น 2 ส่วนในล้านส่วน) ในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม พบว่าปริมาณไนเทรตในชุดการทดลองที่เติมโพรไบโอติกทางการค้ามีปริมาณต่ำกว่าชุดควบคุม ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 1.208 ± 0.014 – 3.896 ± 0.108 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 1.388 ± 0.013 – 4.044 ± 0.082 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และ Wang et al. (2005) พบว่าการเติมโพรไบโอติกทางการค้ากลุ่ม *Bacillus* เพื่อการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมระยะวัยรุ่น (Juvenile) ในบ่อดินประเทศจีน เป็นระยะเวลา 120 วัน สามารถลดปริมาณฟอสเฟตในชุดการทดลองที่เติมโพรไบโอติกทางการค้าให้มีค่าต่ำกว่าชุดควบคุม โดยมีค่าเท่ากับ 0.01 – 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 0.01 – 0.08 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ถึงแม้ว่าปริมาณแอมโมเนียในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมทั้ง 3 ชุดการทดลอง มีค่าเกินเกณฑ์มาตรฐาน อาจเนื่องมาจากเกิดการสะสมและกระบวนการย่อยสลายของเศษอาหารเม็ดสำเร็จรูปที่เหลือจากการกินของกุ้งขาวแวนนาไมซึ่งมีส่วนประกอบของโปรตีนสูง รวมทั้งอาจเกิดจากกุ้งขาวแวนนาไมที่เพาะเลี้ยงในครั้งนี้เกิดการตายและถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีย์และเปลี่ยนเป็นแอมโมเนียในที่สุด โดยทั่วไปปริมาณแอมโมเนียในน้ำที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลในประเทศไทยที่กำหนดโดยสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติควรมีค่าไม่เกิน 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร (National Bureau of Agricultural Commodity and Food Standards Ministry of Agriculture and Cooperatives, 2009) แต่กุ้งขาวแวนนาไมในการศึกษาครั้งนี้สามารถเจริญเติบโตได้อย่างปกติ อาจเนื่องมาจากกุ้งขาวแวนนาไมสามารถปรับตัวให้เข้ากับปริมาณแอมโมเนียในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม อีกทั้งปริมาณแอมโมเนียในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมอาจมีความเข้มข้นไม่เพียงพอต่อการเกิดความเป็นพิษในกุ้งขาวแวนนาไม ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Frias-Espericuete et al. (2000) ที่พบว่าปริมาณแอมโมเนียในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1.22 มิลลิกรัมต่อลิตร ยังไม่มีความเป็นพิษต่อกุ้งขาวแวนนาไม และรายงานของ Chen and Lin (1992) รายงานว่าแอมโมเนียในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งระดับความเข้มข้นเท่ากับ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ถือว่าเป็นระดับความเข้มข้นสูงที่สุดที่ยังไม่มีความเป็นพิษต่อกุ้งกลุ่มพีเนียส ส่วนปริมาณไนไทรต์ที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงกุ้งไม่ควรมีค่าเกิน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (National Bureau of Agricultural Commodity and Food Standards Ministry of Agriculture and Cooperatives, 2009) ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ปริมาณไนไทรต์ในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมมีค่าไม่เกินค่ามาตรฐานตลอดการทดลองเป็นระยะเวลา 120 วัน

การลดลงของปริมาณแอมโมเนียและไนไทรต์ของน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในชุดการทดลองที่เติมโพรไบโอติกผสมทั้ง 2 รูปแบบ เนื่องจากโพรไบโอติกผสมที่ผสมลงในอาหารเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมบางส่วนหลุดจากเม็ดอาหารออกมาสู่น้ำที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง รวมทั้งโพรไบโอติกบางส่วนที่ไม่ได้ยึดเกาะใน Hepatopancreas-Intestine ของกุ้งขาวแวนนาไมหลุดออกมาพร้อมกับ

สิ่งขับถ่ายของกุ้งขาวแวนนาไมมาอยู่ในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยง โพรไบโอติกผสมที่ใช้ในครั้งนี้สามารถสร้างเอนไซม์ (Extracellular enzyme) ย่อยสลายสารอินทรีย์และของเสียในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม ส่งผลให้แอมโมเนียในบ่อลดลง อีกทั้ง *Bacillus* โพรไบโอติกผสมที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้อาจมีความสามารถในการเปลี่ยนแอมโมเนียและไนไทรต์โดยผ่านปฏิกิริยาไนทริฟิเคชัน (Hargreaves, 1998; Burrell et al., 1999; Moriarty et al., 2005; Rao et al., 2000; Tsai and Chen, 2002) ซึ่งไนไทรต์ที่เพิ่มขึ้นในช่วงแรกอาจเกิดจากปฏิกิริยา Ammonia oxidation ซึ่งแอมโมเนียจะถูกเปลี่ยนเป็นไนไทรต์ และหลังจากนั้นไนไทรต์จะถูกเปลี่ยนเป็นไนเทรต โดยปฏิกิริยา Nitrite oxidation และอาจเปลี่ยนเป็นก๊าซไนโตรเจนได้โดยปฏิกิริยา Denitrification (Kim et al., 2005; Lakshmanan and Soundarapandian, 2008; Nimrat et al., 2011; 2012; Wang et al., 2005) ซึ่งไนไทรต์เป็นสารตัวกลางที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาไนทริฟิเคชัน (Hargreaves, 1998; Pierce et al., 1993; Tsai and Chen, 2002) ที่มีความสำคัญต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมากที่สุดชนิดหนึ่ง เนื่องจากไนไทรต์เป็นสารที่มีความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำ (Chen et al., 1990; Chen and Lin, 1991; Tsai and Chen, 2002) หากในระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีไนไทรต์สะสมอยู่ปริมาณสูงจะส่งผลให้กุ้งเกิดความเครียด ทำให้อัตราการเจริญเติบโตของกุ้งลดลง (Lin and Chen, 2003) และยังทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระบบการทำงานของเลือดกุ้งโดยทำให้ฮีโมโกลบินเปลี่ยนเป็นเมทฮีโมโกลบิน (Methemoglobin) ที่ไม่สามารถขนถ่ายออกซิเจนในเลือดได้ ส่งผลให้ระบบหายใจของกุ้งผิดปกติส่งผลให้กุ้งขาวแวนนาไมมีอัตราการตายที่สูงขึ้น (Hargreaves, 1998; Lin and Chen, 2003; Tsai and Chen, 2002)

2. ความสัมพันธ์ของแบคทีเรียชนิดต่างๆ ที่พบใน Hepatopancreas-Intestine และในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 30 ในช่วงก่อนและหลังทดสอบความต้านทานโรคที่เกิดจาก *V. harveyi* สายพันธุ์ 002

อัตราส่วนของปริมาณ *Bacillus* ต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดใน Hepatopancreas-Intestine ของกุ้งขาวแวนนาไม รวมทั้งน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม พบว่าชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมทั้งสองรูปแบบมีอัตราส่วนของ *Bacillus* เพิ่มขึ้นมากกว่า 80% การศึกษาของ Nimrat et al. (2011) ที่ทำการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมระยะซูเอีย 3 ถึงโพสลาวา 21 ด้วย *Bacillus* โพรไบโอติกผสม พบว่า *Bacillus* ในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในวันสุดท้ายของการทดลองมีค่าเพิ่มขึ้น 51.72 ± 8.79 % และการศึกษาของ Nimrat et al. (2012) ที่เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมระยะซูเอีย 3 ถึง โพสลาวา 22 ด้วยแบคทีเรียโพรไบโอติกกลุ่มเดียวกัน พบว่าปริมาณ *Bacillus* ในกุ้งขาวแวนนาไมและน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้น 50.80 ± 1.20 % อีกทั้ง Rengpipat et al. (1998) ได้รายงานถึงการเพิ่มขึ้นของปริมาณ *Bacillus* มากกว่า 50% เมื่อเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำด้วยโพรไบโอติก *Bacillus* สายพันธุ์ S11 ในรูปแบบ Lyophilized เซลล์เป็นระยะเวลา 100 วัน

ชนิดและสัดส่วนของแบคทีเรียทางทะเลใน Hepatopancreas-Intestine และน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 30 พบว่าชนิดของแบคทีเรียมีความแตกต่างจากที่พบในกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 60 โดยการทดลองครั้งนี้สามารถจำแนกชนิดของแบคทีเรียทางทะเลได้ทั้งหมด 10 ชนิด ได้แก่ *B. brevis*, *B. firmus*, *B. pumilus*, *Kytococcus sedentarius*,

Methylobacterium spp., *Sphingomonas paucimobilis*, *Sphingobacterium multivorum*, *Staphylococcus auricularis*, *V. cincinnatiensis* และ *V. parahaemolyticus* โดยแบคทีเรียชนิดเด่นที่พบใน Hepatopancreas-Intestine และน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในช่วงเริ่มต้นการทดลอง คือ *Sphingomonas paucimobilis*, *B. firmus*, *Methylobacterium* spp, *Sphingomonas multivorum*, *B. brevis* , *Kytococcus sedentarius* และ *Staphylococcus auricularis* ตามลำดับ และแบคทีเรียที่พบส่วนน้อย (1-5%) ได้แก่ *B. pumilus*, *V. parahaemolyticus* และ *V. cincinnatiensis* ตามลำดับ แบคทีเรียทางทะเลที่พบในการทดลองครั้งนี้พบว่าแบคทีเรียกลุ่มเด่นที่พบไม่ใช่แบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae สอดคล้องกับการศึกษาของ Vandenberghe et al. (1999) ซึ่งรายงานว่าแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ไม่ใช่แบคทีเรียกลุ่มเด่นในกุ้งขาวแวนนาไม ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของ Moss et al. (2000) ที่พบว่า *Vibrio*, *Aeromonas* และ *Pseudomonas* เป็นแบคทีเรียชนิดเด่นในระบบทางเดินอาหารของกุ้งขาวแวนนาไม จากหลาย ๆ รายงานการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Photobacterium*, *Pseudoalteromonas, Pseudomonas* และ *Vibrio* เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นที่พบได้ในระบบทางเดินอาหารของกุ้ง (Dempsey et al., 1989; Oxley et al., 2002; Yasuda and Kitao, 1980) ส่วน *Staphylococcus* และ *Micrococcus* เป็นแบคทีเรียที่สามารถพบได้ทั่วไปในสิ่งมีชีวิต (Goodwin, 2005) หลังจากทำการทดลองเป็นเวลา 30 วัน พบว่าไม่สามารถตรวจพบ *V. parahaemolyticus* และ *V. cincinnatiensis* ในชุดที่ได้รับโพรไบโอติกทั้ง 3 ชุดการทดลอง แต่ยังคงตรวจพบในชุดควบคุม ทั้งนี้เนื่องจากแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมที่เติมมีความสามารถในการลดปริมาณแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ให้มีปริมาณน้อยกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) สอดคล้องกับการศึกษาของ Boonthai et al. (2011) ที่พบว่าการเติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมกลุ่ม *Bacillus* ในการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำสามารถกำจัด *V. parahaemolyticus* ในทางเดินอาหารได้

สำหรับชนิดและสัดส่วนของแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ใน Hepatopancreas-Intestine และน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมที่เจริญบนอาหาร TCBS agar พบว่าสามารถจำแนกชนิดของแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae จาก Hepatopancreas-Intestine และน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมได้ทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ *V. parahaemolyticus*, *V. cincinnatiensis*, *V. damsela*, *V. fluvialis* และ *V. alginolyticus* โดยแบคทีเรียชนิดเด่นใน Hepatopancreas-Intestine และน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม คือ *V. cincinnatiensis*, *V. fluvialis*, *V. alginolyticus*, *V. damsel* และ *V. parahaemolyticus* ตามลำดับ ชนิดของแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ที่พบในการทดลองครั้งนี้คล้ายกับที่พบในการศึกษาของ Gomez-Gil (1998) ซึ่งคัดแยกแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae จาก Hepatopancreas น้ำเลือด และทางเดินอาหารของกุ้งขาวแวนนาไมที่มีสุขภาพดีพบว่าสามารถจำแนกแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ *Photobacterium phosphoreum*, *V alginolyticus*, *V. damsela*, *V. mimicus*, *V. ordalii*, *V. parahaemolyticus*, *V. pelagius*, *V. splendidus*, *V. tubiashii*, *V. vulnificus* และ *Vibrio* sp. ตามปกติแล้วการแพร่กระจายของแบคทีเรียกลุ่มนี้มีความแตกต่างกันในกุ้งที่เป็นโรคและกุ้งที่มีสุขภาพแข็งแรง กล่าวคือ กุ้งที่ป่วยเป็นโรคมักพบแบคทีเรียชนิดเด่นเพียง 1 หรือ 2 ชนิด (Song et al., 1993; de la Pena et al., 1993; Yang et al., 1992) ยกตัวอย่างเช่น ในกุ้งกุลาดำที่ป่วยและใกล้ตายในประเทศไต้หวันพบแบคทีเรียที่แยกได้จาก

Hepatopacres เป็นแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ถึง 86.4% โดย *Vibrio* ชนิดเด่นมี 2 ชนิด คือ *V. damsela* 22.4% และ *V. harveyi* 26.9% (Chen et al., 1992)

แบคทีเรียโพรไบโอติกผสมในรูปแบบไมโครแคปซูลเป็นทางเลือกหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมที่สามารถช่วยเกษตรกรลดการใช้สารเคมี และยาปฏิชีวนะในการเพาะเลี้ยง ทำให้ผลผลิตที่ได้มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม โดยแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมที่อยู่ในรูปไมโครแคปซูลสามารถช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโต อัตราการรอดชีวิต ความต้านทานต่อการเกิดโรคของกุ้งขาวแวนนาไม และปรับปรุงคุณภาพน้ำ โดยเฉพาะอย่างยิ่งแอมโมเนียและไนไทรต์ อย่างไรก็ตามการใช้โพรไบโอติกให้ประสบความสำเร็จได้นั้น ผู้ใช้ต้องมีความรู้ความเข้าใจถึงคุณสมบัติของจุลินทรีย์ รวมทั้งวิธีการใช้และเก็บรักษาที่ถูกวิธีเพื่อให้การนำผลิตภัณฑ์เหล่านี้ไปใช้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดและมีความยั่งยืนในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

กิจการ ศุภมาตย์ วุฒิพร พรหมขุนทอง ชุติมา ตันติกิตติ และ Rudolf Hoffmann. (2543). ระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ. *วารสารสงขลานครินทร์ ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 22* (ฉบับพิเศษ), 582-586.

ชลอ ลิ้มสุวรรณ. (2543). *กุ้งไทย 2000*. กรุงเทพฯ: เจริญรัฐการพิมพ์.

ธนพงศ์ แสงซื่อ, สุรีรัตน์ เงินดวง, เชิดชัย เฉวียงหงส์, บงกช สโรชวิกสัต, ศรีสุคล ปานเจริญ, ปรีชา เอกธรรมสุทธิ์, อนุชิต เกตุรวม, กัญญา คงเขียว และวิชัย ลาภจตุพร. (2547). กุ้งขาว อินเทคค์. *วารสารริมบ่อ, ฉบับพิเศษ*, ISBN 0859-8762.

นฤมล อัศวเกศมณี. (2549). *การเลี้ยงปลาน้ำจืด*. คณะเทคโนโลยีการเกษตร, มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา.

บุญรัตน์ ประทุมชาติ. (2546). *เอกสารประกอบการสอนวิชาการ 309473 การเพาะเลี้ยงชายฝั่ง*. ภาควิชาวาริชศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.

บุญรัตน์ ประทุมชาติ, อรสา สุริยาพันธุ์, กิตติยา อุปถัมป์ และสว่างพงศ์ สมมาตร. (2550). *กระบวนการสะสมแร่ธาตุของกุ้งขาว (Litopenaeus vannamei) และประยุกต์การเสริมแร่ธาตุในระบบอนุบาลและการเลี้ยงในเชิงพาณิชย์*. กรุงเทพฯ: รายงานการวิจัยงบประมาณแผ่นดิน.

ปภาศิริ ศรีโสภาภรณ์. (2543). *รายงานการวิจัยเรื่องระบบการต่อต้านการเกิดโรคของกุ้งกุลาดำ*. ภาควิชาวาริชศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.

ปาจรีย์ จือเหลียง, ชลอ ลิ้มสุวรรณ, นิติ ชูเชิด, วัชริยา ภูรีวิโรจน์กุล และพรเลิศ จันทร์รัชชกูล. (2555). ผลของการใช้แบคทีเรียกลุ่มสร้างสปอร์ต่อ *Vibrio* spp. การเจริญเติบโต และอัตราการรอดของกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) ในฟาร์มเลี้ยงกุ้ง. *เทคโนโลยีการประมง*, *6*(1), 65 - 74.

ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธ์. (2545ก). *ศาสตร์ของกุ้งขาวลิโทพีเนียสแวนนาไม*. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์. (2545ข). ศาสตร์ของกุ้งขาวลิโทพีเนียส แวนนาไม (ตอนที่ 1). *วารสารสัตว์น้ำ*, *14*(158), 87 - 90.

ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธ์. (2547ก). ศาสตร์ของกุ้งขาว ลิโทพีเนียส แวนนาไม. *สัตว์น้ำ*, *15*(173), 69-72.

ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์. (2547ข). ศาสตร์ของกุ้งขาวลิโทพีเนียส แวนนาไม. *สัตว์น้ำ, 15*(180), 63-67.

ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์. (2548). ศาสตร์ของกุ้งขาวลิโทพีเนียส แวนนาไม (ตอนที่ 13). *วารสารสัตว์น้ำ, 17*(196), 109 - 112.

พุทธ ส่องแสงจินดา. (2544). *การจัดการสารประกอบไนโตรเจนและออกซิเจนในฟาร์มเลี้ยงกุ้งระบบปิด*. กลุ่มวิจัยวิศวกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและสิ่งแวดล้อม, ศูนย์วิจัยการพัฒนาและเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลฝั่งอ่าวไทย, กรมประมง, สงขลา.

พุทธ ส่องแสงจินดา. (2546). *พิษจากการสะสมของไนไตรท์*. เข้าถึงได้จาก http://www.thaishrimp.net

ภวัต สังขะวัฒนะ. (2544). *การพัฒนาผลิตภัณฑ์นมหมักคล้ายโยเกิร์ตโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์โพรไบโอติก*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

มั่นสิน ตัณฑุลเวศม์ และไพพรรณ พรประภา. (2539). *การจัดการคุณภาพน้ำและการบำบัดน้ำเสียในบ่อเลี้ยงปลาและสัตว์น้ำอื่น ๆ*. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ไมตรี ดวงสวัสดิ์ และจารุวรรณ สมศิริ. (2528). *คุณสมบัติของน้ำและวิธีวิเคราะห์สำหรับการวิจัยทางการประมง*. กรุงเทพฯ: เจริญรัฐการพิมพ์.

วิชัย ลาภจตุพร. (2546) จุลินทรีย์และโปรไบโอติก. *วารสารสัตว์น้ำ*, *14*(161), 151-153.

วิภูษิต มัณฑะจิตร, วรวิทย์ ชีวาพร และสมถวิล จริตควร. (2534). *ปัจจัยทางนิเวศวิทยาที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ, Penaeus monodon Fabricius (ปัจจัยทางชีวภาพ)*. ภาควิชาวาริชศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.

สไบทิพย์ อมรจารุชิต, พัชริดา เหมมัน, สิริ ทุกข์วินาศ และรังสิไชย ทับแก้ว. (2543). *การศึกษาความผันแปรของคุณภาพน้ำและดินตะกอนในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (Penaeus monodon) ในเขตพื้นที่น้ำจืด จังหวัดราชบุรี*. กรุงเทพฯ: กรมประมง.

สุภาพร สุกสีเหลือง. (2550). *การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ*. กรุงเทพฯ: ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพฯ.

American Water Works Association and Water Pollution Control Federation. (1980). *Standard Method for The Examination of Water and Wastewater* (15th ed.). Washington D.C.: American Public Health Association.

Anderson, D. P. (1992). Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: applications to aquaculture. *Annu. Rev. Fish Dis*., *2*, 281-307.

Association of Official American Chemists (AOAC; 2002). *Official Methods of Analysis.* Maryland: Association of Official American Chemists.

Austin, B., and Zhang, X. H. (2006). *Vibrio harveyi*: A significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Letters in Applied Microbiology*, *43*, 119-124.

Balcazar, J. L., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D., and Muzquiz, J. L. (2006). The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*, *114*, 173-186.

Balcazar, J. L., Rojas-Luna, T., and 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*. *Invertebrate Pathology*, *96*, 147–150.

Balcazar, J. L., and Rojas-Luna, T. (2009). Inhibitory activity of probiotic *Bacillus subtilis* UTM 126 against *vibrio* species confers protection against vibriosis in juvenile shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Current Microbiology*, *55*, 409-412.

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

Boyd, C. E. (1982). *Water quality management for pond fish culture.* Amsterdam: Elsevier Sci. Pulb.

Boyd, C. E. and Tucker, C. S. (1998). *Pond aquaculture water quality management*. Boston:. Kluwer Academic Publishers.

Burrell, P., Keller, J., and Blackhall, L. (1999).Characterisation of the bacterial consortium involved in nitrite oxidation in activated sludge. *Water Science and Technology*, *39*(6), 45-52.

Caprioli, A., Busani, L., Martel, J. L., and Helmuth, R. (2000). Monitoring of antibiotic resistance in bacteria of animal origin: Epidemiological and microbiological methodologies. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *14*, 295-301.

Chen, S. N., Huang, S. L., and Kou, G. H. (1992). Studies on the epizootics and pathogenicity of bacterial infections in cultured Giant Tiger prawns, *Penaeus monodon* in Taiwan. In W. Fulks, & K. L. Main (Eds.), *Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States* (pp. 195 - 205). The Oceanic Institute: HI.

Chen, J. C. and Lin, C. Y. (1991). Lethal effects of ammonia and nitrite on *Penaeus penicillatus* juveniles at two salinity levels. *Comparative Biochemistry and Physiology*, *100*, 477-482.

Chen, J. C., and Lin, C. Y. (1992). Oxygen consumption and ammonia-N excretion of *Penaeus chinensis* juveniles exposed to ambient ammonia at different salinities and temperature levels. *Comparative Biochemistry and Physiology*, *102*, 287-291.

Chen, J. C., Liu, P. C., and Lei, S. C. (1990). Toxicity of ammonia and nitrite to *Penaeus monodon* adolescents. *Aquaculture*, *89*,127-137.

Debach, P. and Rosen, D. (1991). *Biological control by natural enemies*. Cambridge: Cambridge University Press.

de la Pena, L. D., Tamaki, T., Momoyama, K., Nakai, T., and Muroga, K. (1993). Characteristics of the causative bacterium of vibriosis in the kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Aquaculture*, *115*, 1 - 12.

Dempsey, A. C., Kitting, C. L., and Rosson, R. A. (1989). Bacterial variability among individual penaeid shrimp digestive tracts. *Crustaceana*, *56*, 267 - 278.

Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, *32*(5), 1792-1797

FAO. (2002). *The state of world fisheries and aquaculture*. Rome: FAO.

FAO. (2004). *Introductions and movement of Penaeus vannamei and Penaeus stylirostris in Asia and the Pacific*. Bangkok: Food and agriculture organization of the united nations regional office for Asia and the Pacific.

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

Flegel, T. W. (2006). Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand: Review. *Aquaculture*, *258*, 1-33.

Frias-Espericueta, M. G., Harfush-Melendez, M., and Paez-Osuna, F. (2000). Effect of ammonia on mortality and feeding of postlarvae shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, *65*(1), 98-103.

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

Guindon, S., and Gascuel, O. (2008). *PhyML – Manual Version 3.0*. PhyML Development Team.

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

Gomez-Gil, B., Tron-Mayen, L., Roque, A., Turnbull, J.F., Inglis, V., and Guerra Flores, A.L., (1998). Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, *163*, 1-9.

Goodwin, S. (2005). Polyphasic characterization of bacteria isolated from shrimp larva. *Journal of Young Investigator*, *12*, 1-4.

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

Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendy biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acid Symposium Series*, *41*, 95-98.

Hargreaves, J. A. (1998). Nitrogen biogeochemistry of aquaculture pond. *Aquaculture*, *166*, 181-212.

Holmstrom, K., Graslund, S. Wahlstrom, A., Poungshompoo, S., Bengtsson, B-E. and Kautsky, N. (2003). Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental impacts and human health. *International Journal of Food Science & Technology*, *38*, 255 - 266.

Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., and Williams, S. T. (1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Baltimore: Williams & Wikins.

Irianto, A., and Austin, B. (2002). Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Disease*, *25*, 333 - 342.

Itami, T., Kubono, K., Asano, M., Tokushige, K., Takeno, N., Nishimura, H., Kondo, M., and Takahashi, Y. (1998). Enhancement of disease resistance of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, after oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. *Aquaculture*, *164*, 277–288.

Jackson, C., Preston, N., Thompson, P., and Burford, M. (2003). Nitrogen budget and effluent nitrogen components at an intensive shrimp farm. *Aquaculture*, *218*, 397-411.

Jueliang, P., Limsuwan, C., Chuchird, N., Purivirojkol, W., and Chanratchakool, P. (2011). Effect of *Bacillus* blend (*Bacillus* spp.) for control *Vibrio harveyi* and survival in *Litopenaeus vannamei* culture in laboratory condition. In *Proceedings of 49th Kasetsart University Annual Conference: Fisheries*, *February 1-4*, *2011* (pp. 27-34). Bangkok: Kasetsart University.

Kailasapathy, K. (2002). Microencapsulation of probiotic bacteria: Technology and potential applications. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, *3*, 39-48.

Kanmani, P., Kumar, R. S., Yuvaraj, N., Paari, K. A., Pattukumar, V., and Arul, V. (2011). Effect of cryopreservation and microencapsulation of lactic acid bacterium *Enterococcus faecium* MC13 for long-term storage. *Biochemical Engineering Juornal*, *58-59*, 140-147.

Kautsky, N., Ronnback, P., Tedengren, M., and Troell, M. (2000). Ecosystem perspectives on mangement of disease in shrimp pond farming. *Aquaculture*, *191*, 145-161.

Keysami, M. A., Saad, C. R., Sijam, K., Daud, H. M., and Alimon, A. R. (2007). Effect of *Bacillus subtilis* on growth development and survival of postlarvae *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquaculture Nutrition*, *13*, 131 - 136.

Kim, J. K., Park, K., Cho, K. S., Nam, S. W., Park, T. J., and Bajpai, R. (2005). Aerobic nitrification–denitrification by heterotrophic *Bacillus* strains. *Bioresource Technology*, *96*, 1897–1906.

Kim, O. S., Cho, Y. J., Lee, K., Yoon, S. H., Kim, M., Na, H., Park, S. C., Jeon, Y. S., Lee, J. H., Yi, H., Won, S., and Chun, J. (2012). Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *62*, 716-721.

Koneman, E. W., Procop, G. W., Schrechenberger, P. C., and Woods, G. L. (2006). *Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. Philadelphia: J. B. Lippincott.

Krieg, N. R., and Holt, J. G. (1984). *Bergey's manual of systematic bacteriology volume 1*. Baltimore: Williams & Wikins.

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

Lavilla-Pitago, C. R., Leano, E. M., and Paner, M. G. (1998). Mortalities of pond culture juvenile shrimp *Penaeus monodon* associated with dominance of luminescent vibrios in the rearing environment. *Aquaculture*, *164*, 337 - 349.

Lawson, T. B. (1995). *Fundamentals of Aquaculture engineering*. New York: Chapman & Hall.

Lin, E. and Chen, J. C. (2003). Acute toxicity of nitrite on *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles at different salinity levels. *Aquaculture*, *224*, 193-201.

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

Luzardo-Alvarez, A., Otero-Espinar, F. J., and Blanco-Mendez, J. (2010). Microencapsulation of diets and vaccines for cultures fishes, crustaceans and bivalve mollusks. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, *4*, 277-288.

Moss, S. M., LeaMaster, B. R., and Sweeney, J. N. (2000). Relative abundance and species composition of gram negative, aerobic bacteria associated with the gut of juvenile white shrimp *L. vannamei* reared in oligotrophic well water and eutrophic pond water. *Journal of the World Aquaculture Society*, *31*, 255 - 263.

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

Moriarty, D. J. W. (1999). Disease control in shrimp aquaculture with probiotic bacteria. In: *Proceedings of the 8th international symposium on microbial ecology*, *Atlantic Canada society for microbial ecology* (pp. 237 - 243). Canada: Halifax.

Moriarty, D. J. W., Decamp, O., and Lavens, P. (2005). Probiotics in aquaculture. *Aquaculture Asia Pacific Magazine*, September-October 2005, 14-16.

National Bureau of Agricultural Commodity and Food Standards Ministry of Agriculture and Cooperatives. (2009). *Good aquaculture practices for marine shrimp farm*. Bangkok: The Royal Gazette.

Nimrat S (2007) Characteristics and nutrient removal of six candidate probiotic bacteria in batch and simulated shrimp ponds. The 7th Young researchers meet midcareer researchers, The Thailand Research Fund, Ambassador City Jomtien Hotel, Pattaya, Chon Buri, Thailand, October 11-13.

Nimrat, S., Suksawat, S., Maleeweach, P., and Vuthiphandchai, V. (2008). Effect of different shrimp pond bottom soil treatments on the change of physical characteristics and pathogenic bacteria in pond bottom soil. *Aquaculture*, *285*, 123 - 129.

Nimrat, S., Boonthai, T., and Vuthiphandchai, V. (2011). Effects of probiotic forms, compositions of and mode of probiotic administration on rearing of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae and postlarvae. *Animal Feed Science and Technology*, *169*, 244 - 258.

Nimrat, S., Suksawat, S., Boonthai, T., and Vuthiphandchai, V. (2012). Potential *Bacillus* probiotics enhance bacterial numbers, water quality and growth during early development of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Veterinary Microbiology*, *159*, 443 - 450.

Nimrat, S., and Vuthiphandchai, V. (2011). *In vitro* evaluation of commercial probiotic products used for marine shrimp cultivation in Thailand. *African Journal of Biotechnology*, *10*(22), 4643-4650.

Ochoa Solano, J. L., and Olmos Soto, J. (2006). The functional property of *Bacillus* for shrimp feeds. *Food Microbiology*, *23*, 519 - 525.

Oxley, A. P. A., Shipton, W., Owens, L., and McKay, D. (2002). Bacterial flora from the gut of the wild and cultured banana prawn, *Penaeus merguiensis*. *Journal Application of Microbiology*, *93*, 214 - 223.

Pierce, R. H., Weeks, J. M., and Prappas, J. M. (1993). Nitrate toxicity to five species of marine fish. *Journal of the World Aquaculture Society*, *24*, 105-107.

Posada, D. (2008). jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution*, *25*(7), 1253-1256.

Rao, P. S. S., Karunasagar, I., Otta, S. K., and Karunasagar, I. (2000). Incidence of bacteria involved in nitrogen and sulphur cycles in tropical shrimp culture ponds. *Aquaculture International*, *8*, 463-472.

Rengpipat, S., Phianphak, W., Piyatiratitivorakul, S., and Menasveta, P. (1998). Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. *Aquaculture*, *169*, 301 - 313.

Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitivorakul, S., and Menasaveta, P. (2000). Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). *Aquaculture*, *191*, 271 – 288

Rosenberry, B. (1996). *World shrimp farming, an annual report*. San Diego: Shrimp News International.

Sahu, M. K, Swarnakumar, N. S., Sivakumar, K., Thangaradjou, T., and Kannan, L. (2008). Probiotics in aquaculture: importance and future perspectives. *Indian Journal of Microbiology*, *48*, 299 - 308.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, Tom. (1989). *Molecular cloning : a laboratory manual (Second Edition) Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, New York

Sharma, O. P., and Bhukhar, S. K. S. (2000). Effect of Aquazyn-TM-1000, a probiotic on the water quality and growth of *Cyprinus carpio* var. communis (L.). *Indian Journal of Fisheries*, *47*, 209 - 213.

Skjermo, J., and Vadstein, O. (1999). Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae. *Aquaculture*, *177*, 333 - 343.

Smith, D. M., Burford, M. A., Tabrett, S. J., Irvin, S. J. and Ward, L. (2002). The effect of feeding frequency on water quality and growth of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture*, *207*, 125 - 136.

Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., and Holt, J. G. (1986). *Bergey's manual of systematic bacteriology volume 2*. Baltimore: Williams & Wilkins.

Somboon, M., Limsuwan, C., Chuchird, N., and Chanratchakool, P. (2009). Effect of three different groups of *Bacillus* on *Vibrio* spp., water quality and survival rate in larval rearing of Pacific white shrimp (*Litopenaeusvannamei*). In *Proceedings of 47th Kasetsart University Annual Conference: Fisheries, March 17-20, 2009* (pp. 178-187). Bangkok: Kasetsart University.

Song, Y. L., Cheng, W., and Wang, C. H. (1993). Isolation and characterization of *Vibrio damsela* infectious for cultured shrimp in Taiwan. *Journal of Invertebrate Pathology*, *61*, 24 - 31.

Stickland, J. D. H., and Parson, T. R. (1972). *A Practical Handbook of Seawater Analysis* (2nd ed.). Ottawa: Fisheries Research Board of Canada Bulletin.

Talavera, G. and Castresana, J. (2007). Improvement of Phylogenies after Removing Divergent and Ambiguously Aligned Blocks from Protein Sequence Alignments. *Society of Systematic Biologists*, *56*(4), 564-577.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, *28*(10), 2731-2739.

Towner, K. J. (1995). The genetics of resistance. In Greenwood, D. (Ed.), *Antimicrobial Chemotherapy* (pp. 159-167). Oxford: Oxford University Press.

Trott, L. A., and Alongi, D. M. (2000). The impact of shrimp pond effluent on water quality and phytoplankton biomass in a tropical mangrove estuary. *Marine Pollution Bulletin*, *40*, 947-951.

Tsai, S. J., and Chen, J. C. (2002). Acute toxicity of nitrate on *Penausmonodon* juveniles at different salinity levels. *Aquaculture*, *213*, 163-170.

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.

Utiswannakul, P., Sangchai, S., and Rengpipat, S. (2011). Enhanced growth of black tiger shrimp *Penaeus monodon* by dietary supplementation with *Bacillus* (BP11) as a probiotic. *Journal of Aquaculture Research & Development*, http:// dx.doi.org/10.4172/2155-9546.S1-006.

Vandenberghe, J., Li, Y., Verdonck, L., Li, J., Sorgeloos, P., Xu, H. S., and Swings, J. (1998). Vibrios associated with *Penaeus chinensis* (Crustacea: Decapoda) larvae in Chinese shrimp hatcheries. *Aquaculture, 169*, 121 - 132.

Vargas-Albores, F., Hernandez, L. J., Gollas, G. T., Montano, P. K., Jimenez, V. F. and Yepiz, P.G. (1998). Activation of shrimp cellular defense functions by microbial products. In T. W. Flegel (Ed.), *Advances in shrimp biotechnology* (pp. 161-166). Bangkok: National Center for Genetic Engineering and Biotechnology.

Vaseeharan, B., and Ramasamy, P. (2003). Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Letters in Applied Microbiology, 36*, 83–87.

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.

Wakida-Kusunoki, A. T., Angel, L. E. A. D., Alejandro, P. C., and Brahms, C. Q. (2011). Presence of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) in the Southern Gulf of Mexico, *Aquaculture Invasions Records*, *6*, 139 - 142.

Wang, Y. B., Xu, Z. R., & Xia, M. S. (2005). The effectiveness of commercial probiotics in northern white shrimp *Penaeus vannamei* ponds. *Fisheries Science*, *71*, 1036-1041.

Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. and Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, *173*, 697-703.

Weston, D. P. (1996). *Environmental considerations in the use of antibacterial drugs in aquaculture*. In: Baird, D., Beveridge, M. V. M., Kelly, L. A., and Muir, J. F. (Eds.), Aquaculture and Water Resource Management. Oxford: Blackwell, pp. 140–165.

Wyban, J. (2007). Thailand's shrimp revolution. *AQUA Culture Asia Pacific Magazine*,16-18.

Yang, J., Wu, Y., and Zhu, X. (1992). Pathogenic biology studies on the black gill and brown spot of shell disease syndrome of penaeid shrimp infected by bacteria. *Donghai Marine Science*, *10*, 27 - 36.

Yasuda, K., and Kitao, T. (1980). Bacterial flora in the digestive tract of prawns, *Penaeus japonicas* bate. *Aquaculture*, *19*, 229 - 234.

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

Ziemann, D. A., Walsh, W. A., Saphore, E. G., and Fulton-Bennet, K. (1992). A survey of water quality characteristics of effluent from Hawaiian aquaculture facilities. *Journal of Aquaculture Society*, *23*, 180-191.

ผลผลิต (Output)

1. ผลงานตีพิมพ์ในรายงานสืบเนื่องจากงานประชุมวิชาการ วารสารวิชาการทั้งในระดับชาติและนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่ม เลขที่ และหน้า)

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, วีรสิทธิ์ ขาวผ่อง, จำลอง แสงส่ง และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. (2561). ผลของแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมในรูปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งและรูปแบบไมโครแคปซูลต่ออัตราส่วนของ *Bacillus* ต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดใน Hepatopancreas-Intestine ของกุ้งขาวแวนนาไมและในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยง. การประชุมวิชาการระดับชาติ วิทยาศาสตร์วิจัย ครั้งที่ 10 มหาวิทยาลัยมหาสารคาม วันที่ 24-25 พฤษภาคม พ.ศ. 2561. หน้า BI 36-44.

2. การจดสิทธิบัตร

-

3. ผลงานเชิงพาณิชย์ (มีการนำเสนอไปผลิต/ขาย/ก่อให้เกิดรายได้ หรือมีการนำไปประยุกต์ใช้โดยภาคธุรกิจ หรือบุคคลทั่วไป)

-

4. ผลงานเชิงสาธารณะ (เน้นประโยชน์ต่อสังคม ชุมชน ท้องถิ่น)

-