บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในประเทศไทยสินค้าส่งออกที่สำคัญชนิดหนึ่ง ได้แก่ กุ้งทะเล ซึ่งในช่วง 5-10 ปีที่ผ่านมาพบว่ากุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) เป็นสินค้าส่งออกอันดับหนึ่ง (Boonthai, Vuthiphandchai, & Nimrat, 2011) แต่ปัญหาที่เกิดขึ้นกับการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำคือ ประสบปัญหาโรคระบาดที่เกิดจากไวรัสและแบคทีเรีย (Austin & Zhang, 2006; Flegel, 2006) ดังนั้นในปัจจุบันกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) จึงเป็นกุ้งทะเลที่นิยมเพาะเลี้ยงเพื่อมาแทนที่กุ้งกุลาดำ เนื่องจากกุ้งขาวแวนนาไมเจริญเติบโตได้เร็ว ปรับตัวให้เข้ากับสภาพการเลี้ยงแบบหนาแน่นได้ดี และทนทานต่อการเกิดโรคได้ดีกว่ากุ้งกุลาดำ (Rosenberry, 1996; Wyban, 2007)

การเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในประเทศไทยนิยมเลี้ยงแบบระบบหนาแน่น (Rosenberry, 1996) ซึ่งทำให้ได้ผลผลิตของกุ้งขาวแวนนาไมในปริมาณมาก และสร้างรายได้ให้กับเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งได้เป็นอย่างดี แต่จุดด้อยของการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในระบบดังกล่าวคือไม่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำในบ่อเพาะเลี้ยง ดังนั้นอาจทำให้เกิดการสะสมของอาหารที่เหลือจากการกินของกุ้งขาวแวนนาไม รวมทั้งของเสียที่กุ้งขับถ่ายออกมา และเกิดการสะสมอยู่ภายในบ่อเลี้ยง (Jackson, Preston, Thompson, & Burford, 2003; Trott & Alongi, 2000; Ziemann, Walsh, Saphore, & Fulton-Bennet, 1992) ส่งผลกระทบต่อคุณภาพน้ำในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม ทำให้คุณภาพน้ำเสื่อมโทรมลงตามระยะเวลาของการเพาะเลี้ยง ทำให้กุ้งขาวแวนนาไมเจริญเติบโตได้ไม่ดี ระบบภูมิต้านทานโรคของกุ้งขาวแวนนาไมลดลง กุ้งขาวแวนนาไมจึงติดโรคและตายได้ง่ายขึ้น

ด้วยเหตุดังกล่าวเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมจึงนิยมแก้ปัญหาโดยการใช้ยาปฏิชีวนะ แต่อย่างไรก็ตามการใช้ยาปฏิชีวนะในการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมอย่างไม่เหมาะสม นอกจากก่อให้เกิดปัญหาสารตกค้างในกุ้งขาวแวนนาไมแล้ว ยังก่อให้เกิดปัญหาการดื้อต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียก่อโรคในตัวกุ้งขาวแวนนาไม และระบบสิ่งแวดล้อม โดยแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะอาจแพร่กระจายโดยตรงไปยังตัวกุ้งขาวแวนนาไม และทำให้ผู้ที่บริโภคกุ้งขาวแวนนาไมได้รับแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ อาจส่งผลให้เกิดอุบัติการณ์ของแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะในประชากรมนุษย์ รวมทั้งแบคทีเรียก่อโรคที่มียีนดื้อยาปฏิชีวนะ ยังสามารถถ่ายทอดยีนดื้อยาไปยังแบคทีเรียชนิดอื่นในระบบเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (Carprioli, Busani, Martel, & Helmuth,

2000; Gatesoupe, 1999; Gullian, Thompson, & Rodrigez, 2004; Itami et al., 1998; Kautsky, Ronnback, Tedengren, & Troell, 2000; Verchuere, Rombaut, Sorgeloos, & Verstraete, 2000) และอาจส่งผลให้เกิดการแพร่กระจายไปยังระบบนิเวศที่มีการปล่อยน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม นำมาซึ่งความเสียหายมากกว่าที่จะประมาณได้

อีกทั้งกลุ่มสหภาพยุโรปซึ่งเป็นตลาดที่รับซื้อกุ้งขาวแวนนาไมจากประเทศไทยที่ใหญ่ที่สุดแห่งหนึ่ง ห้ามนำเข้ากุ้งขาวแวนนาไมที่ปนเปื้อนยาปฏิชีวนะ ส่งผลให้ผลิตภัณฑ์กุ้งขาวแวนนาไมจากหลายประเทศไม่สามารถส่งออกได้ จากข้อกำหนดที่เข้มงวดดังกล่าว ทำให้เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในประเทศไทยตระหนักถึงผลกระทบที่อาจเกิดขึ้นกับการส่งออกกุ้งขาวแวนนาไมของประเทศไทย จากสาเหตุข้างต้นทำให้เกษตรกรที่เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมหันมาสนใจการใช้โพรไบโอติก ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิต ซึ่งมีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโต กระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม และต่อต้านแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งขาวแวนนาไมได้ (Balcazar et al., 2006)

ปัจจุบันโพรไบโอติกทางการค้าส่วนใหญ่ที่เกษตรกรนำมาใช้เลี้ยงสัตว์น้ำโดยเฉพาะกุ้งทะเลได้แก่ *Lactobacillus*, *Nitrosomonas*, *Cellulomonas*, *Nitrobacter*, *Pseodomonas*, *Rhodopseudomonas*, *Nitrosomonas* และ *Acinetobacter* (Balcazar et al., 2006; Farzanfar, 2006; Gatesouope, 1999; Vercheuere et al., 2000) โดยแบคทีเรียโพรไบโอติกที่เกษตรกรนิยมใช้มากที่สุดคือ *Bacillus* spp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียสามารถสร้างสปอร์ ทำให้มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมได้ดีกว่าแบคทีเรียกลุ่มอื่น รวมทั้งสร้างเอนไซม์ชนิดที่หลั่งออกมาจากเซลล์ (Extracellular enzyme) เพื่อย่อยสลายสารอาหารที่มีโมเลกุลใหญ่ให้เป็นโมเลกุลเล็ก ทำให้กุ้งทะเลดูดสามารถซึมอาหารได้มากขึ้น ส่งผลให้อัตราการเจริญเติบโต การรอดชีวิต และภูมิคุ้มกันของกุ้งทะเลเพิ่มมากขึ้น (Balcazar et al., 2006; Boonthai et al., 2011; Moriarty, Decamp, & Lavens, 2005; Nimrat & Vuthiphandchai, 2011) อีกทั้งยังสามารถผลิตสารยับยั้งเชื้อก่อโรค เช่น แบคเทอริโอซิน (Bacteriocins) กรดอินทรีย์และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ เป็นต้น (Sahu, Sawarnkumar, Sivakumar, Thanggaradjou, & Kannan, 2008) รวมทั้งสามารถปรับปรุงคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำโดยเฉพาะอย่างยิ่งการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่เป็นสารประกอบไนโตรเจน (Boonthai et al., 2011; Nimrat, Boonthai, & Vuthiphandchai, 2011; Nimrat, Suksawat, Boonthai, & Vuthiphandchai, 2012)

นอกจากการใช้แบคทีเรียโพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลยังมีการนำจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่งคือยีสต์มาใช้เป็นโพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล (Yang, Wu, Jian, & Zhang, 2010)

เนื่องจากยีสต์มีคุณสมบัติเป็นเสมือนสารปรุงแต่งรสชาติตามธรรมชาติให้กับอาหารสัตว์ส่งผลให้สัตว์กินอาหารได้มากขึ้นทั้งยังเป็นแหล่งของวิตามินบีรวมและมีปริมาณโปรตีนในเซลล์สูง ผนังเซลล์ของยีสต์ประกอบด้วยเบต้ากลูแคน (β-glucan) สามารถกระตุ้นการทำงานของระบบย่อยอาหาร และระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งทะเล ส่งผลให้กุ้งขาวแวนนาไมมีภูมิต้านทานต่อโรค และมีอัตราการรอดชีวิตสูงขึ้น (Gullian et al., 2004)

ผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกสำหรับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำโดยเฉพาะกุ้งทะเลในประเทศไทยมักเป็นผลิตภัณฑ์ในรูปแบบน้ำ ซึ่งมักมีข้อจำกัดของอายุในการเก็บรักษาที่ค่อนข้างสั้น และรูปแบบผง ซึ่งมีราคาสูง รวมทั้งมีปริมาณ และองค์ประกอบของโพรไบโอติกไม่ตรงตามฉลากที่ระบุไว้ในผลิตภัณฑ์ ดังนั้น จึงทำให้การใช้โพรไบโอติกไม่มีประสิทธิภาพเท่าที่ควร (Nimrat & Vuthiphandchai, 2011) ซึ่งในการศึกษาก่อนหน้านี้ของสุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และคณะ พบว่าโพรไบโอติกในรูปแบบ Living cell นั้นมีอายุการเก็บรักษาค่อนข้างสั้น จึงมีการพัฒนาโพรไบโอติกในรูปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze-dried) โดยมีองค์ประกอบของโพรไบโอติก แตกต่างกัน คือ 1) แบคทีเรียโพรไบโอติกผสมซึ่งเป็น *Bacillus* 5 สายพันธุ์ 2) แบคทีเรียโพรไบโอติกซึ่งเป็น *Bacillus* 5 สายพันธุ์ร่วมกับยีสต์โพรไบโอติก 2 สายพันธุ์ และ 3) ยีสต์โพรไบโอติก 2 สายพันธุ์ นอกจากนี้ยังพบว่าโพรไบโอติกในรูปแบบดังกล่าวสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไม ปรับปรุงคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมได้ (Nimrat, Suksawat, Maleeweach, & Vuthiphandchai, 2008; Nimrat et al., 2011; 2012)

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงเป็นการศึกษาถึงผลของชนิดโพรไบติก 3 กลุ่ม ได้แก่ แบคทีเรียโพรไบโอติกผสมซึ่งเป็น *Bacillus* 5 สายพันธุ์ แบคทีเรียโพรไบโอติกผสมซึ่งเป็น *Bacillus* 5 สายพันธุ์ร่วมกับยีสต์โพรไบโอติกผสม 2 สายพันธุ์ และยีสต์โพรไบโอติกผสม 2 สายพันธุ์ ต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด (Total Heterotrophic Bacteria) *Bacillus* และยีสต์ ในทางเดินอาหารของกุ้งขาวแวนนาไม และน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยง การเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไม และการปรับปรุงคุณภาพน้ำทางเคมีในบ่อเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม

วัตถุประสงค์ของการทำวิจัย

1. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของโพรไบโอติกผสมที่อยู่ในรูปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze-dried) ที่มีองค์ประกอบของโพรไบโอติกแตกต่างกัน (*Bacillus* โพรไบโอติก 5 สายพันธุ์ *Bacillus*โพรไบโอติก 5 สายพันธุ์ร่วมกับยีสต์โพรไบโอติก 2 สายพันธุ์ และยีสต์โพรไบโอติก 2 สายพันธุ์) ต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด *Bacillus* และยีสต์

ในทางเดินอาหารของกุ้งขาวแวนนาไม และน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม รวมทั้งการเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไม และการปรับปรุงคุณภาพน้ำทางเคมีในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมจำลอง

2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของโพรไบโอติกผสมที่อยู่ในรูปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งที่มีองค์ประกอบของโพรไบโอติกแตกต่างกัน (*Bacillus* โพรไบโอติก 5 สายพันธุ์ *Bacillus* โพรไบโอติก 5 สายพันธุ์ร่วมกับยีสต์โพรไบโอติก 2 สายพันธุ์ และยีสต์โพรไบโอติก 2 สายพันธุ์) ต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด *Bacillus* และยีสต์ ในทางเดินอาหารของกุ้งขาวแวนนาไมของกุ้งขาวแวนนาไม 2 ขนาด คือ ระยะโพสต์ลาวา 60 และโพสต์ลาวา 30 และน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม รวมทั้งตรวจสอบ การเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไมที่ต้านทานโรคที่เกิดจาก *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ทั้ง 2 ขนาด และการปรับปรุงคุณภาพน้ำทางเคมีในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมจำลอง

3. เพื่อพัฒนาโพรไบโอติกในรูปแบบเซลล์แช่แข็ง ที่มีประสิทธิภาพในการต้านทานโรคจาก *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 สำหรับนำมาประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในประเทศไทย

สมมติฐานของการวิจัย

แบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสมที่อยู่ในรูปเซลล์แช่แข็งสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไม โดยสามารถรอดชีวิตและเจริญได้ในทางเดินอาหารของกุ้งขาวแวนนาไม และน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม แต่ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในทางเดินอาหารของกุ้งขาวแวนนาไม รวมทั้งสามารถการปรับปรุงคุณภาพน้ำทางเคมีในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมจำลอง และมีคุณสมบัติในการต้านทานโรคจาก *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ในกุ้งขาวแวนนาไมได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงคุณสมบัติของแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกในรูปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งต่อการเปลี่ยนแปลงแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด และ *Bacillus* ในทางเดินอาหาร และน้ำในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม การเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไมและการปรับปรุงคุณภาพน้ำทางเคมีในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมจำลอง รวมทั้งความสามารถในการต้านทานโรคที่เกิดจาก *V. harveyi* สายพันธุ์ 002

2. สามารถพัฒนาโพรไบโอติกในรูปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งที่มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไม และการต้านทานโรคที่เกิดจาก *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 รวมทั้งควบคุมคุณภาพน้ำทางเคมีในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมให้เหมาะสมกับการเพาะเลี้ยงในประเทศไทย

3. สามารถพัฒนาผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพเพื่อทำให้การเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในประเทศไทยมีความยั่งยืน เพื่อนำมาทดแทนการใช้สารเคมี และยังเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม รวมทั้งเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในประเทศไทยสามารถนำองค์ความรู้ที่ได้รับไปประยุกต์ใช้ในการเลี้ยงจริงได้

ขอบเขตของการวิจัย

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการประเมินประสิทธิภาพของโพรไบโอติกต่อการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 3 การทดลอง ดังต่อไปนี้ การทดลองที่ 1 ทำการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในบ่อดินจำลองด้วยอาหารที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสมในรูปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งที่มีองค์ประกอบของโพรไบโอติกแตกต่างกัน (*Bacillus* โพรไบโอติก 5 สายพันธุ์ *Bacillus* โพรไบโอติก 5 สายพันธุ์ร่วมกับยีสต์โพรไบโอติก 2 สายพันธุ์ และยีสต์โพรไบโอติก 2 สายพันธุ์) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม และทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด *Bacillus* และยีสต์ ในทางเดินอาหารของกุ้งขาวแวนนาไม และน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม รวมทั้งการเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไม และการปรับปรุงคุณภาพน้ำทางเคมีในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมจำลองเป็นระยะเวลา 120 วัน

การทดลองที่ 2 และ 3 จะทำการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสต์ลาวา 60 และ30 และให้อาหารที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสมในรูปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งที่มีองค์ประกอบของโพรไบโอติกแตกต่างกัน (แบคทีเรียโพรไบโอติกผสม ยีสต์โพรไบโอติกผสม และแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมรวมกับยีสต์โพรไบโอติกผสม) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม เป็นเวลา 30 วัน จากนั้นทดสอบความต้านทานโรคที่เกิดจาก *V. harveyi* สายพันธุ์ 002ในกุ้งขาวแวนนาไม ซึ่งเหนี่ยวนำให้เกิดโรคโดยการเติม *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 เป็นเวลา 28 วัน และ 10 วัน และทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด *Bacillus* และยีสต์ ในทางเดินอาหารของกุ้งขาวแวนนาไม และน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยง รวมทั้งการเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไม และการปรับปรุงคุณภาพน้ำทางเคมีในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมทั้งในช่วงก่อนและหลังทดสอบความต้านทานโรคที่เกิดจาก *V. harveyi* สายพันธุ์ 002