บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสมที่ต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรีย และแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ใน Hepatopancreas ลำไส้ และน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยง รวมทั้งอัตราการรอดชีวิตของกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 60 และคุณสมบัติทางกายภาพของน้ำในบ่อดินจำลอง

1. แบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสมในอาหารกุ้งขาวแวนนาไม

จากการศึกษาปริมาณแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสมที่เติมลงในอาหารเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตามวิธีการของ Boonthai et al. (2011) และ Nimrat et al. (2008) พบว่าปริมาณแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสมที่เติมลงในอาหารเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม หลังเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน พบว่ามีปริมาณไม่แตกต่างจากช่วงเริ่มต้นการทดลองซึ่งผลที่ได้คล้ายกับการศึกษาของ Rengpipat et al. (2003) ซึ่งใช้แบคทีเรียโพรไบโอติก *Bacillus* BP11 ในรูปเซลล์สดเติมลงในอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำและทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และเก็บรักษาอาหารไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน พบว่าปริมาณของแบคทีเรียโพรไบโอติก *Bacillus* BP11 ในอาหารเลี้ยงกุ้งมีปริมาณไม่เปลี่ยนแปลงหลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน

2. ผลของแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งต่อปริมาณแบคทีเรียทางทะเล

จากผลการศึกษาพบว่าปริมาณแบคทีเรียทางทะเลใน Hepatopancreas ของกุ้งขาวแวนนาไมโพสลาวา 60 ของชุดควบคุมที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 120 วัน มีค่าเท่ากับ $7.00 \pm 0.96 \times 10^6$ CFU/g ซึ่งมี สูงกว่าในการศึกษาของ Gullian et al. (2004) ซึ่งพบว่าปริมาณแบคทีเรียทางทะเลใน Hepatopancreas ของกุ้งขาวแวนนาไมในระยะโตเต็มวัยจากประเทศเอกวาดอร์มีปริมาณเท่ากับ $4.20 \pm 0.85 \times 10^4$ CFU/g และสูงกว่าที่พบใน Hepatopancreas ของกุ้งกุลาดำระยะวัยรุ่นที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 120 วัน จากประเทศไทยซึ่งมีปริมาณแบคทีเรียทางทะเลเท่ากับ 2.2×10^5 CFU/g (Ruangpan, Tabkaew, & Sangrungruang, 1994)

ส่วนปริมาณแบคทีเรียทางทะเลในลำไส้ของกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 60 ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 120 วัน ของชุดควบคุมมีปริมาณเท่ากับ $3.53 \pm 0.43 \times 10^8$ CFU/g ซึ่งจากการศึกษาของ Ruangpan et al. (1994) ที่ตรวจพบว่าปริมาณแบคทีเรียทางทะเลในลำไส้ของกุ้งกุลาดำที่เพาะเลี้ยงในบ่อดินเป็นเวลา 120 วัน ในจังหวัดจันทบุรีประเทศไทยมีปริมาณเท่ากับ 5.1×10^5 - 2.7×10^8 CFU/g เช่นเดียวกัน รวมทั้งการศึกษาของ Chaiyapechara et al. (2012) พบว่าในลำไส้ของกุ้งกุลาดำจากฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้งในจังหวัดฉะเชิงเทรา ประเทศไทยมีปริมาณแบคทีเรียทางทะเลอยู่ในช่วง 4.90×10^5 - 3.20×10^7 CFU/g

สำหรับปริมาณแบคทีเรียทางทะเลในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 60 ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 120 วันมีปริมาณเท่ากับ $7.12 \pm 0.68 \times 10^4$ CFU/ml สอดคล้องกับการศึกษาของ Kannipiran, Ravindran, Chandrasekar, & Kalaiarasi (2009) ที่ทำการศึกษาปริมาณแบคทีเรียทางทะเลในน้ำบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 120 วัน ในรัฐทมิฬนาฑู (Tamil Nadu) ประเทศอินเดียพบว่ามีปริมาณเท่ากับ 2.53×10^5 CFU/ml และ Deveraja et al. (2002) รายงานว่าปริมาณแบคทีเรียทางทะเลในน้ำบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งในเมือง Kuala Selangor ประเทศมาเลเซียมีค่าเท่ากับ $2.40 \pm 0.64 \times 10^4$ CFU/ml เช่นเดียวกัน

จากการศึกษาผลของแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสมต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียทางทะเลพบว่าในการทดลองที่ 1 ที่ทำการศึกษาผลของแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสมต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียทางทะเลใน Hepatopancreas ลำไส้ และน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 120 วัน พบว่าแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสมไม่มีผลต่อปริมาณแบคทีเรียทางทะเล แต่ในการทดลองที่ 2 และ 3 พบว่าแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสมในช่วง 30 วัน ก่อนการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคของ *V. harveyi* โดยมีปริมาณเพิ่มขึ้นประมาณ 10 เท่า ดังนั้นสรุปได้ว่าแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสมในการศึกษาครั้งนี้อาจจะไม่มีผลหรือทำให้มีการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียทางทะเลเล็กน้อยโดยอาจขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ ที่มีความแตกต่างกันของชุดการทดลองในแต่ละครั้ง

ยกตัวอย่างเช่น อุณหภูมิของน้ำในบ่อเพาะเลี้ยงที่มีค่าแตกต่างกันซึ่งในการทดลองที่ 1 นั้นได้ทำการทดลองในช่วงหน้าหนาว อุณหภูมิของน้ำในบ่อเพาะเลี้ยงตลอดระยะเวลาการทดลองจึงค่อนข้างต่ำ โดยพบว่าอุณหภูมิของน้ำในบ่อเพาะเลี้ยง ณ เวลา 5.00 และ 14.00 น. ตลอดระยะเวลาการทดลองมีค่าอยู่ในช่วง 20.11 ± 0.05 - 25.40 ± 0.07 และ 22.11 ± 0.04 - 26.50 ± 0.02 องศาเซลเซียส ซึ่งแตกต่างจากการทดลองที่ 2 ที่พบว่าอุณหภูมิของน้ำในบ่อเพาะเลี้ยง ณ เวลา 5.00 และ 14.00 น. มีค่าอยู่ในช่วง 26.72 ± 0.03 - 28.68 ± 0.03 และ 27.70 ± 0.10 - 29.17 ± 0.06

องศาเซลเซียส โดยอุณหภูมิของน้ำในการทดลองที่ 2 มีค่าใกล้เคียงกับการทดลองที่ 3 ซึ่งพบว่าอุณหภูมิของน้ำในบ่อเพาะเลี้ยง ณ เวลา 5.00 และ 14.00 น. มีค่าอยู่ในช่วง 26.67 ± 0.06 - 28.77 ± 0.06 และ 27.50 ± 0.17 - 29.53 ± 0.06 องศาเซลเซียส ซึ่งอุณหภูมิของน้ำที่มีค่าต่ำในการทดลองที่ 1 อาจส่งผลให้การเจริญและเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียทางทะเลลดลง เนื่องจากอุณหภูมิเป็นปัจจัยหนึ่งทางสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย โดยอุณหภูมิที่สูงจะทำให้ปฏิกิริยาเคมีต่าง ๆ และเอนไซม์ในเซลล์เกิดในอัตราที่เร็วขึ้นทำให้แบคทีเรียเจริญและเพิ่มจำนวนได้มากขึ้น ในขณะที่อุณหภูมิต่ำจะทำให้ปฏิกิริยาต่าง ๆ และเอนไซม์หลายชนิดในเซลล์ลดกิจกรรมลง ส่งผลให้การเจริญและเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียลดลง (สุวณี สุภเวชย์ และมาลัย วรวิจิตร, 2540)

นอกจากนี้ความเค็มที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้งที่แตกต่างกันอาจเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ปริมาณแบคทีเรียทางทะเลมีค่าแตกต่างกันโดยในการทดลองที่ 1 น้ำที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้งมีความเค็มเท่ากับ 5 ส่วนในพันส่วน ส่วนการทดลองที่ 2 และ 3 นั้นน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งมีความเค็มเท่ากับ 20 ส่วนในพันส่วน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของธงชัย นิติรัฐสุวรรณ และอัฉราวดี อนุมานไพศาล (2544) ที่ทำการศึกษาปัจจัยและความสัมพันธ์ที่มีผลต่อปริมาณ *Vibrio* ในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำพบว่าความเค็มของน้ำในบ่อเพาะเลี้ยงที่เพิ่มขึ้นจะทำให้ปริมาณแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaccae ซึ่งเป็นแบคทีเรียทางทะเลกลุ่มหนึ่งมีปริมาณเพิ่มขึ้นด้วย นอกจากนี้อาจมีผลมาจากปัจจัยด้านอื่น ๆ เช่น อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง และรูปแบบในการเพาะเลี้ยง เป็นต้น (Prieur et al., 1990; Strom & Olafsan, 1990)

จากการศึกษาพบว่าปริมาณแบคทีเรียทางทะเลในน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในมีปริมาณน้อยกว่าปริมาณแบคทีเรียที่พบในระบบทางเดินอาหาร ซึ่งเป็นปรากฏการณ์ที่เป็นไปตามสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันนั่นคือโครงสร้างของทางเดินอาหารมีบริเวณยึดเกาะของจุลินทรีย์มากมาย ดังนั้นจุลินทรีย์ที่สามารถแย่งบริเวณยึดเกาะดังกล่าวได้ก็จะเจริญอยู่ในระบบทางเดินอาหารของกุ้งได้ (Olsson et al., 1992) ในขณะที่น้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมเป็นน้ำที่มีสารอาหารอนุภาคแขวนลอยและบริเวณยึดเกาะของจุลินทรีย์น้อยกว่าทางเดินอาหาร จึงทำให้จุลินทรีย์สามารถเจริญได้ในปริมาณที่น้อยกว่าในระบบทางเดินอาหาร (บัญญัติ สุขศรีงาม, 2534; Rengpipat et al., 1998)

3. ผลของแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งต่อปริมาณแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae

ส่วนปริมาณแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ใน Hepatopancreas ของกุ้งขาวแวนนาไมระยะวัยรุ่นที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 120 วันมีปริมาณเท่ากับ $7.84 \pm 0.97 \times 10^5$ CFU/g สอดคล้องกับการศึกษาของชัยวุฒิ สุดทองคง, ธิดาพร ฉวีภักดิ์ และลิลา เรืองแป้น (2550) ซึ่งพบว่าปริมาณแบคทีเรียวงศ์

Vibrionaceae ใน Hepatopancreas ของกุ้งขาวแวนนาไมที่เพาะเลี้ยงในบ่อดินเป็นเวลา 120 วัน ในจังหวัดสมุทรสาคร และจันทบุรีประเทศไทยมีปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* ทั้งหมดเท่ากับ 3.22 x 10^5 CFU/g แต่มีปริมาณสูงกว่าที่พบในการศึกษาของ Far et al. (2009) ซึ่งรายงานว่าปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* ในระบบทางเดินอาหารของกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 30 ที่เพาะเลี้ยง ณ มหาวิทยาลัยปุตรา (Putra) ประเทศมาเลเซีย เป็นเวลา 8 สัปดาห์ มีปริมาณเท่ากับ $2.8 \pm 0.28 \times 10^3$ - 1.1×10^3 CFU/g และ Gomez-Gil et al. (1998) ที่ศึกษาปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* ใน Hepatopancreas ของกุ้งขาวแวนนาไมระยะวัยรุ่นพบว่ามีค่าเท่ากับ 4.30×10^4 CFU/g

ส่วนปริมาณแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ในลำไส้ของกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 60 ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 120 วัน มีค่าเท่ากับ $6.60 \pm 1.45 \times 10^7$ CFU/g ซึ่งปริมาณที่พบสอดคล้องกับการศึกษาของ ชัยวุฒิ สุดทองคง และคณะ (2550) ที่รายงานปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* ในลำไส้ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 120 วันในจังหวัดสมุทรสาครและจังหวัดจันทบุรี ประเทศไทยมีปริมาณเท่ากับ 5.74×10^7 CFU/g นอกจากนี้ปริมาณที่พบยังมีค่าใกล้เคียงกับการศึกษาของปาจรีย์ จือเหลียง และคณะ (2555) ที่พบว่าปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* ในลำไส้ของกุ้งขาวแวนนาไมที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยธุรกิจสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประเทศไทย เป็นเวลา 60 วัน มีปริมาณเท่ากับ ($1.20 \pm 0.2 \times 10^6$ CFU/g) และอกนิษฐ์ ญาณโกมุท, วรวุฒิ วัลลา, วัชริยา ภูรีวิโรจน์กุล, นิติ ชูเชิด และชลอ ลิ้มสุวรรณ (2553) ซึ่งรายงานว่าในลำไส้ของกุ้งขาวระยะโพสลาวา 12 ที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยธุรกิจสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประเทศไทย เป็นเวลา 60 วันมีปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* เท่ากับ $7.75 \pm 5.80 \times 10^6$ CFU/g รวมทั้ง Gomez-Gil et al. (1998) พบว่าปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* ใน Intestine ของกุ้งขาวระยะวัยรุ่นจากประเทศเอกวาดอร์มีปริมาณเท่ากับ 2.10×10^6 CFU/g นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* ที่พบในลำไส้กุ้งขาวแวนนาไมมีปริมาณค่อนข้างใกล้เคียงกับที่พบในลำไส้ของกุ้งกุลาดำระยะวัยรุ่นที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 120 วัน (10^6 CFU/g) อีกด้วย (Boonthai et al., 2011; Ruangpan et al., 1994)

สำหรับปริมาณแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 60 ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 120 วัน มีค่าอยู่ระหว่าง $6.34 \pm 0.84 \times 10^4$ CFU/ml ซึ่งมีปริมาณใกล้เคียงกับการศึกษาของชัยวุฒิ สุดทองคง และคณะ (2550) ซึ่งรายงานว่าปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* ในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในจังหวัดสมุทรสาครและจังหวัดจันทบุรี ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 120 วัน มีปริมาณเท่ากับ $2.08 \pm 0.50 \times 10^3$ CFU/ml และการศึกษา Wang, Xu, and Xia (2005) ซึ่งรายงานว่าแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* ในน้ำบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา

101 วัน ในมณฑลเจ้อเจียง (Zhejiang) ประเทศจีน มีปริมาณเท่ากับ $2.09 \pm 0.63 \times 10^3$ CFU/ml ตามลำดับ

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสมมีผลต่อปริมาณ *Vibrio* ใน Hepatopancreas, ลำไส้ และน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาว โดยโพรไบโอติกมีผลต่อการควบคุมปริมาณ *Vibrio* ใน Hepatopancreas, ลำไส้ และน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาว ได้ดีกว่าชุดควบคุมซึ่งไม่มีการเติมโพรไบโอติกโดยชุดที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสม (T1) มีความสามารถในการควบคุมปริมาณ *Vibrio* ใน Hepatopancreas และลำไส้ของกุ้งขาวแวนนาไมได้ดีกว่าชุดที่เติมบคทีเรียโพรไบโอติกผสมร่วมกับยีสต์โพรไบโอติกผสม (T2) และชุดที่เติมยีสต์โพรไบโอติกผสม (T3) ส่วนในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมพบว่าโพรไบโอติกทั้ง 3 ชุดมีความสามารถในการควบคุมปริมาณ *Vibrio* ได้ไม่แตกต่างกัน

สาเหตุของความสามารถในการควบคุมปริมาณ *Vibrio* ของชุด T1 อาจเกิดจาก *Bacillus* มีความสามารถในการแข่งขันในการแย่งพื้นที่ในการยึดเกาะในทางเดินอาหาร การแย่งสารอาหารกับแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ตลอดจนสร้างสารปฏิชีวนะชนิดต่าง ๆ ที่สามารถยับยั้งการเจริญหรือทำลายแบคทีเรียที่ก่อโรค (Moriarty, 1998; 1999; Olsson et al., 1992; Verschuere et al., 2000) เช่น เบซิตราซิน (Bacitracin) กรามิซิน (Gramicidin) พอลิมิซิน (Polymyxin) และไทโรไตรซิดิน (Tyrotricidin) (Balcazar et al., 2006; Rengpipat et al., 1998) นอกจากนี้ผนังเซลล์ของ *Bacillus* ซึ่งมีเปปติโดไกลแคนเป็นองค์ประกอบที่มีคุณสมบัติเป็นตัวกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และส่งผลให้มีความสามารถของ host กำจัดแบคทีเรียก่อโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Ziaei-Nejad et al., 2006)

ยกตัวอย่างเช่นจากรายงานของ Rengpipat et al. (2000) ที่ได้ทำการศึกษาผลของ *Bacillus* S11 ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกต่อการเสริมภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ พบว่า *Bacillus* S11 มีผลกระตุ้นประสิทธิภาพการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมโดยวิธี Phagocytosis และเพิ่มปริมาณ Phenoloxidase ในเม็ดเลือดกุ้งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับ *Bacillus* S11 เสริมในอาหาร ส่งผลให้ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไมอยู่ในสภาวะพร้อมทำงาน (Active form) ดังนั้นเมื่อแบคทีเรียก่อโรคบุกรุกเข้าเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันจะทำงานและกำจัดแบคทีเรียก่อโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Ziaei-Nejad et al., 2006) ซึ่งมีความสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมา ตัวอย่างเช่น Boonthai et al. (2011) พบว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับ *Bacillus* เป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกจะมีปริมาณ *Vibrio* ในระบบทางเดินอาหารและน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงลดลง รวมทั้ง Li et al. (2007) รายงานว่าปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* ในทางเดินอาหารของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับ *Bacillus licheniformis* เป็นโพรไบโอติก มีปริมาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

ส่วนสาเหตุของยีสต์โพรไบโอติกที่มีความสามารถในการลด *Vibrio* เช่นกันอาจจะเนื่องมาจากยีสต์มีความสามารถในการยึดเกาะกับผนังลำไส้และเจริญได้ในลำไส้ (Andlid, Vazquez-Juarez, & Gustafsson, 1998; Buts, Keyser, & Raedemaeker, 1994; Tovar et al., 2002; Vazquez-Juarez, Andlid, & Gustafsson, 1997) ผนังเซลล์ของยีสต์ประมาณร้อยละ 90 ประกอบด้วยกลูแคน แมนโนโปรตีน และไคติน (Scholz et al., 1999) ซึ่งปกติแล้วกลูแคนจะมีฤทธิ์กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำ (Sakai, 1999) ไม่ว่าจะเป็นกุ้งขาวแวนนาไมและกุ้งกุลาดำ (Chang et al., 2003; Scholz et al., 1999) โดยกลูแคนจะทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นให้เซลล์ที่ทำหน้าที่ในการดักจับกินเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอม (Phagocytosis) ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น และเพิ่มการหลั่งสารหรือเอนไซม์ที่สำคัญในการทำลายเชื้อโรค (Chang, et al., 2003; Kumari & Schoo, 2006; Misra, Das, Mukherjee & Pattnaik, 2006; Palic, Andreasen, Herolt, Menzel & Roth, 2006) และมีรายงานว่าแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีอยู่บนผนังเซลล์ยีสต์มีคุณสมบัติจับกับโปรตีนอยู่ที่ผิวเซลล์ของแบคทีเรียก่อโรค จึงทำให้เชื้อก่อโรคเหล่านี้ไม่สามารถจับที่ผนังลำไส้ของกุ้งได้ จึงทำให้กุ้งมีอัตราการรอดและมีภูมิคุ้มกันที่สูงขึ้น (สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 2550)

รวมทั้งชุดการทดลองที่มีการเติมแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมร่วมกับยีสต์โพรไบโอติกผสมพบว่ามีความสามารถในการลด *Vibrio* ได้น้อยกว่าชุด T1 อาจเกิดจากการสันนิษฐานว่าเมื่อมี *Bacillus* และยีสต์อยู่ร่วมกันอาจจะเป็นการเจริญแบบสภาวะแข่งขันกัน และยีสต์อาจจะผลิตและหลั่งสารไมโครซิน (Microcins) ซึ่งเป็นสารควบคุมทางชีวภาพ และมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียออกมา (Baquero & Moreno, 1984; Golubev & Boekhout, 1992) ส่วน *Bacillus* นั้นสามารถผลิตสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ในการทำลายยีสต์ได้เช่นเดียวกัน (วิบูลย์ลักษณ์ พึ่งรัศมี, 2545) ซึ่งสารที่จุลินทรีย์ทั้งสองชนิดสร้างขึ้นอาจจะยับยั้งกันเอง ทำให้ความสามารถในการลดปริมาณ *Vibrio* spp. น้อยกว่าชุดที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกเพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ยังอาจเกิดจากแบคทีเรียโพรไบโอติกและยีสต์โพรไบโอติกที่เข้าไปในระบบทางเดินอาหารของกุ้งไม่สามารถยึดเกาะกับบริเวณยึดเกาะ (Receptor) บนเยื่อบุผิวของผนังลำไส้ได้หมดทุกเซลล์ เนื่องจากมีการเติมโพรไบโอติกมากกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ ถึง 2 เท่า โพรไบโอติกที่ไม่สามารถยึดเกาะกับลำไส้ได้ก็จะถูกกำจัดออกไป ทั้งนี้อาจเป็นเพราะบริเวณยึดเกาะในทางเดินอาหารของกุ้งมีจำนวนจำกัด ดังรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ชี้ให้เห็นว่าการเติมโพรไบโอติกในปริมาณสูงมากไม่มีผลทำให้ปริมาณแบคทีเรียในทางเดินอาหารเพิ่มขึ้นตามปริมาณโพรไบโอติก ยกตัวอย่างเช่น Rengpipat et al. (1998) ซึ่งใช้ *Bacillus* S11 ผสมอาหารเลี้ยงกุ้งให้มีความเข้มข้น 10^{10} CFU/g และนำไปเลี้ยงกุ้งกุลาดำเป็นเวลา 100 วัน พบว่าปริมาณ *Bacillus* S11 ที่ตรวจพบในระบบทางเดินอาหารมีประมาณ

10^8 CFU/g ในขณะที่น้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำมีปริมาณ *Bacillus* S11 สูงถึง 10^{10} CFU/ml และการศึกษาของ Utiswannakul, Sangchai, and Rengpipat (2010) ที่ทำการศึกษาถึงผลของโพรไบโอติกต่อการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ โดยใช้ *Bacillus* BP11 ผสมในอาหารเลี้ยงกุ้งที่ความเข้มข้น 10^{10} CFU/g และนำไปเลี้ยงกุ้งกุลาดำเป็นเวลา 80 วัน ผลการทดลองพบว่าจากแบคทีเรียทั้งหมดที่ตรวจพบในลำไส้ของกุ้งกุลาดำของชุดที่เติมโพรไบโอติกและชุดควบคุมซึ่งมีค่าอยู่ประมาณ 10^6 - 10^7 CFU/g พบว่าในชุดที่เติมโพรไบโอติกมีปริมาณ *Bacillus* ในลำไส้ของกุ้งกุลาดำประมาณ 10^5 - 10^6 CFU/g ส่วนในชุดควบคุมสามารถตรวจพบ *Bacillus* ในลำไส้ของกุ้งกุลาดำประมาณ 10^1 - 10^2 CFU/g

สำหรับกลไกในการลดปริมาณแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงอาจเนื่องมาจากความสามารถของแบคทีเรียโพรไบโอติกในการหลั่งเอนไซม์ที่สามารถย่อยเมือกบริเวณรอบเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบได้ ทำให้สารปฏิชีวนะที่โพรไบโอติกสร้างขึ้นเข้าสู่เซลล์และทำลายเซลล์ของแบคทีเรียก่อโรคได้ (Chythanya, Karunasagar, & Karunasagar, 2002) ซึ่งพบว่า *Bacillus* สามารถสร้างสารปฏิชีวนะต่าง ๆ ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคกลุ่ม *Vibrio* ได้ (Balcazar et al., 2006; Moriarty, 1998: Verchures et al., 2000) ส่วนกลไกในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกลุ่ม *Vibrio* ในน้ำที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงของยีสต์โพรไบโอติกนั้นอาจเนื่องมาจากยีสต์อาจจะผลิตสารพิษ (Killer Toxin) ซึ่งจากการศึกษาพบว่ายีสต์หลายสายพันธุ์สามารถผลิตสารนี้ได้ เช่น *Candida*, *Cryptococcus, Debaryomyces* และ *Saccharomyces* เป็นต้น ซึ่งสารพิษนี้มีฤทธิ์ควบคุมทางชีวภาพและสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้เช่นกัน (Meneghin, Reis, & Ceccato-Antonini, 2010)

4. ผลของแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งต่ออัตราการรอดชีวิตของกุ้งขาวแวนนาไม

จากการศึกษาประสิทธิภาพของโพรไบโอติกต่ออัตราการรอดชีวิตของกุ้งขาวแวนนาไม พบว่าอัตราการรอดชีวิตของกุ้งขาวแวนนาไมของชุดที่ได้รับโพรไบโอติก (T1, T2 และชุด T3) มีค่าสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) สอดคล้องกับการศึกษาต่าง ๆ ที่ผ่านมาซึ่งพบว่าการใช้โพรไบโอติกสามารถช่วยส่งเสริมอัตราการรอดชีวิตของกุ้งขาวแวนนาไมชนิดอื่น ๆ ได้ ยกตัวอย่างเช่นการศึกษาของ Far et al. (2009) ที่ได้ทำการศึกษาผลของ *Bacillus subtilis* ต่ออัตราการเจริญเติบโตและอัตราการรอดชีวิตของกุ้งขาวแวนนาไม พบว่ากุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสม *B. subtilis* มีอัตราการรอดชีวิตและผลผลิตสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) Scholz et al. (1999) ทำการศึกษาโดยใช้ยีสต์ผสมในอาหารสำหรับเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม โดยแบ่งอาหารเป็น 5 ชุดทดลอง ได้แก่ 1. อาหารที่ผสม *Saccharomyces cerevisiae* 1% 2. อาหาร

ที่ผสม β-glucan ที่สกัดจาก *Saccharomyces cerevisiae* 0.1% 3. อาหารที่ผสม *Phaffia rhodozyma* 1% 4. อาหารที่ผสมยีสต์ (HPPR1) 1% และ 5. ชุดควบคุม หลังจากนำไปเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมเป็นเวลา 50 วันพบว่ากุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมกับ *S. cerevisiae* 1%, *Phaffia rhodozyma* และยีสต์ (HPPR1) 1% มีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

นอกจากนี้ Zhou et al. (2009) ได้ทำการศึกษาโดยใช้ *B. coaglulans* SC8168 เติมลงในน้ำบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม โดยแบ่งเป็น 4 ชุดการทดลองได้แก่ ชุดที่ 1 เติม 1.0 x 10^5 CFU/ml, ชุดที่ 2 เติม 5.0 x 10^5 CFU/ml, ชุดที่ 3 เติม 1.0 x 10^6 CFU/ml และชุดที่ 4 ชุดควบคุม ผลการทดลองพบว่ากุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับโพรไบโอติก (*B. coaglulans* SC8168) ทั้ง 3 ชุดนี้มีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมโพรไบโอติกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) แต่มีค่าไม่แตกต่างกัน (p>0.05) ระหว่างชุดที่เติมโพรไบโอติกทั้ง 3 ชุด

จากตัวอย่างที่ได้กล่าวมาแล้วพบว่าแบคทีเรียโพรไบโอติกและยีสต์โพรไบโอติกสามารถส่งเสริมอัตราการรอดชีวิตของกุ้งขาวแวนนาไมได้ทั้งนี้เนื่องจากองค์ประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรียโพรไบโอติกซึ่งเป็นเปปติโดไกลแคนมีคุณสมบัติในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำโดยจากการศึกษาของ Rengpipat et al. (2000) ที่ทำการศึกษาผลของแบคทีเรียโพรไบโอติก *Bacillus* S11 ต่อการเสริมภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ พบว่า *Bacillus* S11 สามารถกระตุ้นประสิทธิภาพการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมโดยวิธี Phagocytosis รวมทั้งเพิ่มปริมาณ Phenoloxidase ในเม็ดเลือดกุ้งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งในชุดควบคุม ซึ่งส่งผลให้ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไมอยู่ในสภาวะพร้อมทำงานจึงสามารถกำจัดแบคทีเรียก่อโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Ziaei-Nejad et al., 2006) สอดคล้องกับการศึกษาของ Itami et al. (1998) ที่ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของเปปติโดไกลแคนจาก *Bifidobacterium thermophilum* โดยผสมในอาหารสำหรับเลี้ยงกุ้ง *Penaeus japonicas* ผลการทดลองพบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารผสมเปปติโดไกล-แคนมีประสิทธิภาพของการกลืนทำลายสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดสูงกว่าชุดควบคุมที่ไม่ได้รับเปปติโดไกลแคนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

ส่วนการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของยีสต์นั้นเกิดจากกลูแคนที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ยีสต์ที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำซึ่งมีสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาหลาย ๆ การศึกษา เช่น พรเลิศ จันทร์รัชชกูล, นพดล ศุกระกาญจน์ และพัฒน์พงศ์ คงยั่งยืน (2541) ทำการศึกษาโดยใช้ β–glucan ผสมในอาหารสำหรับเลี้ยงกุ้งในอัตราส่วน 5 และ 10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม หลังจากให้กุ้งกินเป็นเวลา 3 วัน พบว่ากุ้งที่กินอาหารที่ผสม β–glucan อัตราส่วน 10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม กุ้งจะมีความสามารถในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมโดยการกลืนและความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับ

ชุดควบคุม Cheng et al. (2003) พบว่ากุ้งกุลาดำที่กินอาหารผสม β-1, 3-glucan จากผนังเซลล์ของยีสต์ *Schizophyllum commune* ในอัตราส่วน 10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 20 วันจะช่วยเพิ่มภูมิคุ้มกันและเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของกุ้งที่ติดไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ถึง 75%

จากเหตุผลที่กล่าวมานี้จึงช่วยให้กุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสมมีความต้านทานต่อแบคทีเรียและไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคเพิ่มมากขึ้น (Chang, Chen, Su, & Liao, 2000; Itami, Takahashi, Tsuchihira, Igusa, & Kondo, 1994; Liao, Su, Chang, Her, & Kojima., 1996; Sung, Kou, & Song, 1994)

5. ผลของแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งต่อคุณภาพน้ำทางด้านกายภาพ

จากการศึกษาผลของแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสมต่อคุณสมบัติทางกายภาพของน้ำในบ่อเพาะเลี้ยงพบว่าโพรไบโอติกไม่มีผลต่อค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ อุณหภูมิและความเค็มของน้ำในบ่อเพาะเลี้ยง แต่สามารถช่วยลดความขุ่นของน้ำในบ่อเพาะเลี้ยงได้

ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งขาวพบว่าในชุดทดลองที่ได้รับโพรไบโอติกและชุดควบคุมมีค่าใกล้เคียงกัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในธรรมชาติของระบบการเพาะเลี้ยงกุ้งมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด (ในที่นี้ทำการศึกษาแบคทีเรียทางทะเล) พบว่าปริมาณแบคทีเรียทางทะเลมีปริมาณที่ใกล้เคียงกัน ตัวอย่างเช่นในการศึกษาของ Devaraja et al. (2002) ที่ทำการศึกษาปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมดในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งที่เติมผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกทางการค้า พบว่าปริมาณแบคทีเรียในบ่อควบคุมมีปริมาณใกล้เคียงกับบ่อที่เติมผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกทางการค้า จึงทำให้มีกระบวนการหายใจและการย่อยสลายใกล้เคียงกันส่งผลให้ค่าความเป็นค่าความเป็นกรด-ด่างใกล้เคียงกัน

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่าง ณ 5:00 น. ของทั้ง 4 ชุดการทดลองตลอดระยะการทดลองมีค่าอยู่ในช่วง 7.80 ± 0.18 - 8.20 ± 0.12 และเวลา 14:00 น. มีค่าอยู่ในช่วง 7.97 ± 0.03 - 8.35 ± 0.13 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการรายงานของ Thakur and Lin (2003) ที่รายงานว่าค่าความเป็นกรด-ด่าง ของน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งกุลาดำที่ทำการศึกษา ณ สถาบันเทคโนโลยีแห่งเอเชีย (Asian Institute of Technology; AIT) ประเทศไทยในเวลา 6:00 น. มีค่าอยู่ระหว่าง 7.0 - 8.9 และในช่วงเวลา 16:00 น. มีค่าเท่ากับ 7.3-9.4 เช่นกัน และจากผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งขาวทั้งสองช่วงเวลามีค่าอยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงกุ้งคือมีค่าอยู่ระหว่าง 7 -9 (Boyd & Fast, 1992) รวมทั้งมีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วงที่สามารถยอมรับได้ในการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศจีนคือ 7.8 - 8.6 (Yang & Huang, 2003) หากน้ำที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง

กุ้งมีความเป็นกรด-ด่างค่อนข้างต่ำ (6.4 - 7.4) จะส่งผลต่อแบคทีเรียกลุ่มไนโตรแบคเตอร์ (Nitrobacter bacteria) ซึ่งทำหน้าที่เปลี่ยนแปลงไนไทรต์ เนื่องจากในสภาวะที่ความเป็นกรด-ด่างต่ำ ไนไทรต์จะเปลี่ยนเป็นกรดไนตรัส ซึ่งมีความเป็นพิษต่อไนโตรแบคเตอร์ ทำให้ปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันถูกหยุดลง (Hargreaves, 1998) ส่วนค่าความเป็นกรด-ด่างที่ค่อนข้างสูง (8.4 - 9) จะมีผลทำให้แอมโมเนีย (NH_3) แตกตัวในรูปที่มีความเป็นพิษมากขึ้น (สไบทิพย์ อมรจารุชิต และคณะ, 2543)

ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งขาวแวนไมที่พบในแต่ละช่วงเวลามีความแตกต่างกัน ยกตัวอย่างเช่น ในเวลา 5:00 น. ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำจะมีค่าต่ำกว่าในเวลา 14:00 น. ซึ่งอาจเนื่องมาจากในช่วงเวลากลางคืนสิ่งมีชีวิตประเภทแพลงก์ตอนพืชและจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในน้ำมีการหายใจปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกมาส่งผลให้ค่าความเป็นกรด-ด่างมีค่าต่ำกว่าที่พบ ณ เวลา 14.00 น. (สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, 2551ก; Cowan, Lorenzen, & Funge-Smith, 1999)

ปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำของชุดควบคุมและชุดที่เติมโพรไบโอติกทั้ง 3 ชุดการทดลองมีค่าลดลงตามระยะเวลาการทดลอง โดยในช่วงเริ่มต้นการทดลองมีค่าเท่ากับ 6.24 ± 0.35 - 6.48 ± 0.15 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อสิ้นสุดการทดลองมีค่าอยู่ในช่วง 5.12 ± 0.33 - 5.72 ± 0.29 มิลลิกรัมต่อลิตร สอดคล้องกับการศึกษาของ Wang et al. (2005) ซึ่งพบว่าปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในมณฑลเจ้อเจียง (Zhejiang) ประเทศจีนมีค่าลดลงตลอดระยะเวลาการทดลอง 101 วัน

จากผลการศึกษาพบว่าปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำ ณ 5:00 น. ของทั้ง 4 ชุดการทดลองมีค่าอยู่ในช่วง 5.12 ± 0.33 - 6.43 ± 0.16 มิลลิกรัมต่อลิตร และในเวลา 14:00 น. มีค่าอยู่ในช่วง 5.53 ± 0.25 - 6.48 ± 0.15 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีความแตกต่างกันโดยปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำในเวลา 14:00 น. จะมีค่าสูงกว่าในเวลา 5:00 น. ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากกระบวนการสังเคราะห์แสงและกระบวนการหายใจของแพลงก์ตอนพืชที่เกิดขึ้นในแต่ละวัน โดยพบว่าปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำมีค่าสูงในช่วงเวลาบ่ายเนื่องจากแพลงก์ตอนพืชการสังเคราะห์แสงและปล่อยออกซิเจนออกมา แต่ในตอนกลางคืนแพลงก์ตอนพืชไม่สามารถสังเคราะห์แสง จึงไม่เกิดการผลิตออกซิเจน แต่ยังคงมีการใช้ออกซิเจนในการหายใจของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ในน้ำ จึงทำให้ออกซิเจนมีปริมาณลดลงในตอนกลางคืน (สไบทิพย์ อมรจารุชิต และคณะ, 2543; Li, Xiong, Chen, Zeng, & Li, 2008; Rao, Otta, Karunasagar, & Karunasagar, 2000)

อย่างไรก็ตามปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำ ณ เวลา 5:00 และ 14:00 น. ของทั้ง 4 ชุดการทดลองที่พบในการศึกษาครั้งนี้ยังมีค่าอยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงกุ้งคือมีค่ามากกว่า 3.5 มิลลิกรัมต่อลิตรขึ้นไป (Boyd & Fast, 1992)

ความขุ่นของน้ำในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมของชุดควบคุมและชุดที่เติมโพรไบโอติกทั้ง 3 ชุด เมื่อสิ้นสุดการทดลองมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) สำหรับสาเหตุที่ทำให้เกิดความขุ่นของน้ำในบ่อเพาะเลี้ยงนั้นอาจเกิดจากปัจจัยต่าง ๆ เช่น ตัวของกุ้งเองเนื่องจากกุ้งเป็นสัตว์ที่หากินอาหารตามพื้นบ่อจึงอาจทำให้เกิดการฟุ้งกระจายของดินบริเวณพื้นบ่อ (Rito, Neill, Lawrence, & Samocha, 1996) และความขุ่นของน้ำยังอาจเกิดจาก สารอินทรีย์สารอนินทรีย์ สิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก เช่นแพลงก์ตอน แบคทีเรีย หรืออนุภาคของดิน ทราย ตลอดจนแร่ธาตุต่าง ๆ (ไมตรี ดวงสวัสดิ์ และจารุวรรณ สมศิริ, 2528) นอกจากนี้อาหารที่นำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้ง สิ่งขับถ่ายที่ออกมาจากตัวกุ้ง และจากการสังเกตระหว่างทำการทดลองยังพบว่ามีการเจริญของสาหร่ายเกิดขึ้นที่บริเวณขอบบ่อซึ่งสิ่งเหล่านี้อาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดความขุ่นในน้ำบ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง

ความขุ่นของน้ำในบ่อเพาะเลี้ยงจะมีผลต่อสัตว์น้ำ เนื่องจากความขุ่นจะทำให้น้ำในบ่อเพาะเลี้ยงสามารถรับออกซิเจนได้น้อยลง นอกจากนี้สารแขวนลอยชนิดต่าง ๆ อาจเข้าไปอุดตันในช่องเหงือกของสัตว์น้ำทำให้สัตว์น้ำหายใจติดขัดและรับออกซิเจนได้น้อยลง ส่งผลให้สัตว์น้ำมีการเจริญเติบโตช้ากว่าปกติรวมทั้งมีความต้านทานต่อโรคต่าง ๆ ลดลง (มั่นสิน ตัณฑุลเวศม์ และไพรรณ พรประภา, 2539)

อุณหภูมิของน้ำในบ่อเพาะเลี้ยงตลอดระยะเวลาการทดลองมีค่าอยู่ในช่วง 20 - 26 องศาเซลเซียส เนื่องจากเป็นช่วงหน้าหนาว ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Wang and He (2009) ที่พบว่าอุณหภูมิของน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมที่อยู่ทางชายฝั่งทางด้านตะวันตกของทะเลจีนตะวันออกมีค่าระหว่าง 23.2 - 28.4 องศาเซลเซียส ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) ระหว่างชุดที่ได้รับโพรไบโอติกทั้ง 3 ชุดกับชุดควบคุม โดยทั่วไปอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกุ้งอยู่ในช่วง 25 - 30 องศาเซลเซียส (Boyd & Fast, 1992) แต่อุณหภูมิของน้ำที่วัดได้ในการทดลองบางช่วงมีค่าต่ำกว่าระดับที่เหมาะสมต่อการเจริญ แต่อย่างไรก็ตามพบว่ากุ้งขาวแวนนาไมยังสามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิช่วงดังกล่าว จากการศึกษาของ วิภูษิต มัณฑะจิตร และคณะ (2534) พบว่าหากอุณหภูมิของน้ำในบ่อเพาะเลี้ยงมีค่าสูงกว่า 18 องศาเซลเซียส กุ้งยังสามารถเจริญเติบโตได้และมีกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์เป็นปกติ แต่หากอุณหภูมิต่ำกว่า 18 องศาเซลเซียส กุ้งจะไม่ว่ายน้ำและหยุดการกินอาหาร และถ้าอุณหภูมิลดต่ำลงกว่า 14

องศาเซลเซียส จะทำให้กุ้งตาย นอกจากนี้ยังพบว่าหากอุณหภูมิของน้ำในบ่อเพาะเลี้ยงสูงเกินความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตจะส่งผลให้กุ้งเกิดอาการตัวงอ เนื่องจากการเกร็งตัวของกล้ามเนื้อ กุ้งเกิดอาการเครียด และมีการเจริญเติบโตลดลง

ความเค็มของน้ำในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมทั้ง 4 ชุดการทดลองมีค่าเท่ากับ 5 ส่วนในพันส่วนตลอดระยะเวลาการทดลอง กุ้งขาวแวนนาไมเป็นกุ้งทะเลที่สามารถเจริญได้ในน้ำที่มีความเค็มช่วงกว้างตั้งแต่ 0.5 - 45 ส่วนในพันส่วน (กมลศิริ พันธนียะ, 2554) ปัจจุบันพบว่าการเลี้ยงกุ้งที่มีความเค็มระหว่าง 5 - 7 ส่วนในพันส่วนจะง่ายกว่าการเลี้ยงด้วยน้ำทะเลที่มีความเค็มเท่ากับ 30 - 35 ส่วนในพันส่วน เนื่องจากการเลี้ยงด้วยความเค็มต่ำจะช่วยให้ปัญหาจากโรคลดน้อยลง โดยเฉพาะปัญหาที่เกิดจากโรคแบคทีเรียเรืองแสง (ชลอ ลิ้มสุวรรณ, 2543)

การทดลองที่ 2 การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสมในรูปแบบการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งต่อความต้านทานแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* ของกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 60 ในบ่อเพาะเลี้ยงจำลอง

จากการศึกษาผลของแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสมต่อความต้านทานแบคทีเรียก่อโรคโดยทดสอบกับกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 60 ที่เพาะเลี้ยงด้วยโพรไบโอติกเป็นเวลา 30 วัน จากการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ผลการทดลองพบว่า *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ที่ความเข้มข้น 10^5 และ 10^7 CFU/ml ไม่สามารถก่อให้เกิดโรคในกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 60 ได้โดยกุ้งขาวแวนนาไมในชุดควบคุมและชุดที่เติมโพรไบโอติกทั้ง 3 ชุดการทดลองมีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 100% อาจสันนิษฐานได้ว่ากุ้งขาวที่นำมาใช้ในการทดลองครั้งนี้มีขนาดใหญ่ ซึ่งมีความแข็งแรง รวมทั้งการกำจัดสิ่งแปลกปลอมของระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไมระยะนี้น่าจะทำงานได้ดี ทำให้ *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ที่อยู่ใน Hepatopancreas และลำไส้ของกุ้งขาวแวนนาไมมีปริมาณไม่เพียงพอที่สามารถจะก่อให้เกิดโรคในกุ้งขาวแวนนาไมระยะนี้ได้ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่พบว่าหลังจากเติม *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ลงในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมให้มีความเข้มข้น 10^5 CFU/ml เป็นเวลา 2 ชั่วโมง สามารถตรวจพบ *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ใน Hepatopancreas และลำไส้ อยู่ในช่วง 10^3 - 10^4 CFU/g แต่หลังจากเติมเป็นเวลา 7 วัน พบว่าไม่สามารถตรวจพบ *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ใน Hepatopancreas และลำไส้ของกุ้งขาวแวนนาไมได้ ดังนั้นการเติม *V. harveyi* สายพันธุ์ ที่ความเข้มข้น 10^5 CFU/ml จึงน่าจะมีความเข้มข้นที่ต่ำเกินไป จึงได้ทำการเติม *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ลงในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในความเข้มข้นที่สูงขึ้น คือ 10^7 CFU/ml พบว่าในช่วงเริ่มต้นการทดลองสามารถตรวจพบ *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ใน Hepatopancreas และลำไส้ของกุ้งขาว

แวนนาไมได้ประมาณ 10^4 และ 10^5 CFU/g ตามลำดับ และหลังจากเติมเป็นเวลา 7 วัน พบว่าปริมาณ *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ใน Hepatopancreas และลำไส้ของกุ้งขาวแวนนาไมเหลืออยู่ประมาณ 10^3 - 10^4 CFU/g แต่ก็ไม่สามารถก่อให้เกิดโรคเรืองแสงในกุ้งขาวแวนนาไมทั้งในชุดควบคุมและชุดที่เติมโพรไบโอติกได้เช่นเดียวกัน

นอกจากนี้ *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ที่นำมาใช้ในการทดลองครั้งนี้อาจเป็นสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงในการก่อโรคต่ำ จึงต้องใช้ความเข้มข้นที่สูงกว่า 10^7 CFU/ml จึงจะสามารถก่อให้เกิดโรคในกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 60 ได้

อย่างไรก็ตามในช่วงการศึกษา 30 วันก่อนการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคพบว่าแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งไม่มีผลต่อปริมาณแบคทีเรียทางทะเล และสามารถลดปริมาณแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ใน Hepatopancreas ลำไส้ และน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 60 ที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วันได้ โดยทั้ง 3 ชุดสามารถลด *Vibrio* ได้ไม่แตกต่างกัน รวมทั้งสามารถช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของกุ้งขาวแวนนาไม และไม่มีผลต่อคุณสมบัติทางกายภาพของน้ำในบ่อเพาะเลี้ยง ได้แก่ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ ค่าความขุ่น ค่าความเค็ม และอุณหภูมิของน้ำ นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสมสามารถลดปริมาณ *V. harveyi* ใน Hepatopancreas ลำไส้ และน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมหลังเติมเพื่อทดสอบความต้านทานได้

สำหรับปริมาณแบคทีเรียที่พบในการศึกษาครั้งนี้พบว่าแบคทีเรียทางทะเลใน Hepatopancreas มีปริมาณไม่แตกต่างกับกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 60 ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 120 วัน ส่วนแบคทีเรียทางทะเลในลำไส้มีปริมาณน้อยกว่า 10 เท่า และในน้ำพบว่ามีปริมาณสูงกว่า 10 เท่า ส่วนปริมาณแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ใน Hepatopancreas ลำไส้ และน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงพบว่ามีปริมาณไม่แตกต่างกับกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 60 ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 120 วัน และพบว่าปริมาณแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ที่เจริญบนอาหาร VHA มีปริมาณค่อนข้างใกล้เคียงกับที่พบบนอาหาร TCBS agar โดยมีปริมาณสูงกว่าเล็กน้อย

เมื่อทำการทดสอบความต้านทานโดยการเติม *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ที่ความเข้มข้น 10^5 และ 10^7 CFU/ml พบว่าไม่มีผลต่อปริมาณแบคทีเรียทางทะเลและแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ใน Hepatopancreas และลำไส้ของกุ้งขาวแวนนาไม แต่มีผลต่อปริมาณแบคทีเรียทางทะเลและแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงทั้งนี้เนื่องจากปริมาณแบคทีเรียทางทะเลและแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมก่อนทำการเหนี่ยวนำด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 มีปริมาณใกล้เคียงกับปริมาณ *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ที่เติมลงไป

(10^5 CFU/ml) จึงทำให้ปริมาณแบคทีเรียทางทะเลและแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ในน้ำมีปริมาณเพิ่มขึ้น และเมื่อทำการเติมซ้ำอีกครั้งที่ความความเข้มข้น 10^7 CFU/ml พบว่าปริมาณแบคทีเรียทางทะเลและแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ในน้ำมีปริมาณเพิ่มขึ้นจากเดิม 100 เท่า

จากการศึกษาชนิดและสัดส่วนของแบคทีเรียทางทะเลใน Hepatopancreas ลำไส้ และน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมพบว่าสามารถจำแนกชนิดของแบคทีเรียได้ทั้งหมด 9 ชนิด โดยใน Hepatopancreas และลำไส้ตรวจพบแบคทีเรียจำนวน 8 ชนิด ได้แก่ *B. brevis*, *M. luteus*, *Photobacterium leiognathi*, *Shewanella algae*, *Sphingomonas spiritivorum*, *Sphingomonas multivorum*, *V. fluvialis* และ *V. vulnificus* ส่วนในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งตรวจพบ 9 ชนิด โดยตรวจพบ *Sphingomonas paucimobilis* เพิ่มขึ้นมาอีก 1 ชนิด แบคทีเรียชนิดเด่นที่พบใน Hepatopancreas ลำไส้ และน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยง ในช่วงเริ่มต้นการทดลอง คือ *Shewanella algae*, *Sphingomonas multivorum*, *Sphingomonas spiritivorum* และแบคทีเรียที่พบสัดส่วนน้อยกว่า 10% ได้แก่ *V. fluvialis*, *M. luteus*, *V. vulnificus*, *Photobacterium leiognathi*, *Sphingomonas paucimobilis* และ *B. brevis* ตามลำดับ ส่วน *Sphingomonas paucimobilis* สามารถตรวจพบได้ในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงในวันแรกของการทดลองเท่านั้น และยังพบว่าสัดส่วนของแบคทีเรียแต่ละชนิดที่พบใน Hepatopancreas ลำไส้ และน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมมีสัดส่วนใกล้เคียงกัน

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วันพบว่าไม่สามารถตรวจพบ *V. fluvialis*, *V. vulnificus* และ *Photobacterium leiognathi* ใน Hepatopancreas และลำไส้ของชุดที่เติมโพรไบโอติกทั้ง 3 ชุดการทดลอง ส่วนน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงสามารถตรวจพบได้ในสัดส่วนที่น้อยกว่าชุดควบคุม เมื่อทำการทดสอบความต้านทานแบคทีเรียก่อโรคจาก *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 พบว่าไม่มีผลต่อสัดส่วนของแบคทีเรียทางทะเลแต่ละชนิดที่พบใน Hepatopancreas และลำไส้ของกุ้งขาวแวนนาไมแต่จะมีผลต่อสัดส่วนของแบคทีเรียทางทะเลในน้ำโดยเฉพาะในวันแรกของการเติมเท่านั้น

ชนิดของแบคทีเรียทางทะเลที่พบในการทดลองครั้งนี้คล้ายกับที่พบในการศึกษาของ Ruangpan et al. (1994) ที่ทำการศึกษาชนิดของแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำที่เพาะเลี้ยงในจังหวัดจันทบุรี พบว่าชนิดของแบคทีเรียทางทะเลที่แยกได้จาก Hepatopancreas และลำไส้ของกุ้งกุลาดำในช่วงระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 30 วัน ได้แก่ *Vibrio* spp., *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp., *Moraxella* spp., *Actinobacter* spp., *Cytophaga* spp., และ *Falvobacterium* โดย *Pseudomonas* spp. เป็นแบคทีเรียชนิดเด่นใน Hepatopancreas (72.6%) และลำไส้ (76.4%) รองลงมาคือ *Vibrio* spp. พบใน Hepatopancreas 10.4% และในลำไส้เท่ากับ 0.8% และ *Aeromonas* spp. พบใน Hepatopancreas 0.5% ส่วนแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ที่เหลือตรวจพบใน Hepatopancreas เท่ากับ 16.5% และในลำไส้เท่ากับ 22.8% Shakibazadeh et al. (2009) ทำการศึกษาชนิดของ

แบคทีเรียประจำถิ่นที่พบในส่วนต่าง ๆ ของกุ้งกุลาดำซึ่งทำการเพาะเลี้ยงที่ภาควิชาวาริชศาสตร์ มหาวิทยาลัยปุตรา (Putra) ประเทศมาเลเซีย พบว่าแบคทีเรียแกรมลบชนิดเด่นที่พบในระบบทางเดินอาหารและน้ำบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ คือ *Vibrio*, *Shewanella* และ *Burkholderia* ส่วนแบคทีเรียแกรมบวกชนิดเด่นได้แก่ *Clavibacter*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium* และ *Brevibacterium* นอกจากนี้ Oxley, Shipton, Owens, and McKay (2002) ยังพบว่า *Pseudoalteromonas*, *Vibrio*, *Aeromonas, Photobacterium* และ *Plesiomonas* เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในทางเดินอาหารของกุ้งแชบ๊วย (*Penaeus merguiensis*) ซึ่งจับมาจากแม่น้ำรอสส์ เมือง Townsvlle ประเทศออสเตรเลีย รวมทั้ง Zuberi, Qadri, and Siddiqui (1985) พบว่า *Vibrio, Micrococcus, Pseudomonas, Staphylococcus, Bacillus* และ *Flavobacterium* เป็นแบคทีเรียที่พบได้ในลำไส้กุ้งแชบ๊วยที่เพาะเลี้ยงบริเวณชายฝั่งของเมืองการาจี ประเทศปากีสถานเช่นเดียวกัน

แบคทีเรียทางทะเลที่พบในการทดลองครั้งนี้สามารถแยกได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ แบคทีเรียกลุ่มที่ไม่ก่อโรค ได้แก่ *B. brevis*, *M. luteus*, *Photobacterium leiognathi*, *Sphingomonas spiritivorum* และ *Sphingomonas multivorum* และแบคทีเรียกลุ่มก่อโรค ได้แก่ *Shewanella algae*, *V. fluvialis* และ *V. vulnificus* โดย *Shewanella algae* สามารก่อให้เกิดโรคในมนุษย์ เกี่ยวกับการติดเชื้อที่หู ผิวหนัง เนื้อเยื่ออ่อน และบาดแผล เป็นต้น (Holt, Gahrn-Hansen, & Bruun, 2004) สำหรับ *V. fluvialis* สามารถก่อให้เกิดโรคกระเพาะและลำไส้อักเสบในคน ส่วน *V. vulnificus* สามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อที่กระแสเลือดในคนและปลา รวมทั้งทำให้เกิดโรคเสี้ยนดำในกุ้ง (สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, 2551ข)

สำหรับชนิดและสัดส่วนของแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ใน Hepatopancreas ลำไส้ และน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมที่เจริญบนอาหาร TCBS agar พบว่าในช่วงเริ่มต้นการทดลองสามารถจำแนกชนิดของแบคทีเรียได้ 6 ชนิด ได้แก่ *Photobacterium leiognathi*, *V. fluvialis*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. mimicus* และ *V. parahaemolyticus* โดยแบคทีเรียชนิดเด่นที่พบใน Hepatopancreas ลำไส้ และน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม คือ *V. fluvialis*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. mimicus* และ *Photobacterium leiognathi* ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วันพบว่าสัดส่วนของชนิดแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ในแต่ละชุดการทดลองมีสัดส่วนของแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae แต่ละชนิดใกล้เคียงกับช่วงเริ่มต้นทดลองแสดงว่าโพรไบโอติกไม่มีผลต่อสัดส่วนของแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae แต่อย่างไรก็ตามสัดส่วนของแบคทีเรียในชุดที่เติมโพรไบโอติกทั้ง 3 ชุด คำนวณมาจากปริมาณแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ใน Hepatopancreas ลำไส้ และน้ำที่มีค่าน้อยกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อทำการทดสอบความต้านทานแบคทีเรียก่อโรคพบว่าการเติม *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 มีผลต่อสัดส่วน

ของแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceaeใน Hepatopancreas และลำไส้ของกุ้งขาวแวนนาไมไม่มากนักแต่จะมีผลต่อสัดส่วนของแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ในน้ำโดยทำให้แบคทีเรียชนิดอื่น ๆ หายไปในวันแรกของการเติม

ชนิดของแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ที่พบในการทดลองครั้งนี้คล้ายกับที่พบในการศึกษาของชัยวุฒิ สุดทองคง และคณะ (2550) ที่ทำการศึกษาชนิดของแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ในกุ้งขาวแวนนาไมที่เพาะเลี้ยงในบ่อดินจากจังหวัดสมุทรสาครและจังหวัดจันทบุรี พบว่าสามารถจำแนกชนิดของแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae จาก Hepatopancreas ลำไส้ และน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมได้ 7 ชนิด คือ *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. mimicus* และ *V. harveyi* รวมทั้งการศึกษาของ Ruangpan et al. (1994) ซึ่งทำการศึกษาชนิดของแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ในกุ้งกุลาดำเพาะเลี้ยงในจังหวัดจันทบุรี พบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae จากระบบทางเดินอาหารของกุ้งได้ 7 ชนิด คือ *V. alginolyticus*, *V. cholerae* (non O1), *V. damsel*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* และ *Vibrio* spp.

แบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ที่จำแนกได้ในการทดลองครั้งนี้พบว่าเป็นแบคทีเรียชนิดที่สามารถก่อให้เกิดโรคทั้งในมนุษย์และสัตว์น้ำ โดยส่วนใหญ่ที่พบเป็นชนิดที่ก่อให้เกิดโรคในมนุษย์ ได้แก่ *V. fluvialis* ก่อให้เกิดโรคกระเพาะและลำไส้อักเสบในมนุษย์ *V. alginolyticus* ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อที่บาดแผล หูและตาในผู้ที่มีประวัติสัมผัสกับน้ำทะเล *V. parahaemolyticus* ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ (สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, แก้วกานต์ ศักดิ์อนุชัยชาญ, นเรศ เชื้อสุวรรณ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2005) และมีรายงานว่า *V. parahaemolyticus* และ *V. alginolyticus* ยังเป็นแบคทีเรียชนิดเด่นที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในกระแสเลือดของสัตว์น้ำ (Thune, Hawke, & Siebeling, 1991) *V. mimicus* ก่อให้เกิดโรคในมนุษย์ (Braude, Davis, & Joahua, 1986) และพบว่ายังเป็นแบคทีเรียชนิดเด่นที่ตรวจพบในกุ้งน้ำจืด (Crewfish) ที่เป็นโรค (Thune et al., 1991) ส่วน *V. vulnificus* สามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อที่กระแสเลือดและการติดเชื้อที่บาดแผลจากการสัมผัสกับน้ำทะเล รวมทั้งยังสามารถก่อให้เกิดโรคจากการบริโภคอาหารทะเลที่มีการปนเปื้อนเชื้อชนิดนี้เข้าไป (Farmer & Hickman-Brenner, 1992; Powell, 1999) นอกจากนี้แบคทีเรียชนิดนี้ยังก่อให้เกิดโรคเสี้ยนดำในกุ้งกุลาดำอีกด้วย (สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และคณะ, 2005)

ส่วนการวิเคราะห์ชนิดและสัดส่วนของ *V. harveyi* และแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ชนิดอื่น ๆที่ไม่ใช่ *V. harveyi* ใน Hepatopancreas ลำไส้ และน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงอาหาร VHA พบว่าแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ที่เจริญบนอาหารชนิดนี้ ได้แก่ *Photobacterium leiognathi*, *V. fluvialis*, *V. alginolyticus* และ *V. parahaemolyticus* ซึ่งเป็นชนิดเดียวกับที่พบอาหาร TCBS

agar แต่ *Vibrio* บางชนิดที่ตรวจพบบนอาหาร TCBS agar ไม่สามารถตรวจพบบนอาหาร VHA ได้ เช่น *V. vulnificus* สอดคล้องกับการศึกษาของ Harris et al. (1996) ที่รายงานว่า *V. vulnificus* ไม่สามารถเจริญบนอาหาร VHA ได้ ส่วน *V. mimicus* พบว่าไม่สามารถตรวจพบการเจริญบนอาหาร VHA เช่นกันแต่ยังไม่มีรายงานว่า *Vibrio* ชนิดนี้สามารถเจริญบนอาหาร VHA ได้หรือไม่โดย แบคทีเรียชนิดเด่นที่พบใน Hepatopancreas ลำไส้ และน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยง คือ *V. fluvialis*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* และ *Photobacterium leiognathi* ตามลำดับ

เมื่อทำการทดสอบความต้านทานแบคทีเรียก่อโรคพบว่าการเติม *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ที่ความเข้มข้น 10^5 และ 10^7 CFU/ml มีผลต่อสัดส่วนของแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ชนิดอื่น ๆ ที่ไม่ใช่ *V. harveyi* ใน Hepatopancreas และลำไส้เพียงเล็กน้อย แต่จะมีผลต่อสัดส่วนของแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ชนิดอื่น ๆ ที่ไม่ใช่ *V. harveyi* ในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยง โดยจะทำให้แบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ชนิดอื่น ๆ หายไปในวันที่ทำการเติม

การทดลองที่ 3 การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งต่อความต้านทานแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* ของกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 30 ในบ่อเพาะเลี้ยงจำลอง

ต่อมาได้ทำการศึกษาผลของแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งต่อความต้านทานแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 30 ผลการศึกษาพบว่าแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสมสามารถช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของกุ้งขาวแวนนาไม โดยในชุดที่ได้รับโพรไบโอติกทั้ง 3 ชุด (T1, T2 และชุด T3) มีอัตราการรอดชีวิต (57.84 ± 4.49%, 55.88 ± 2.94% และ 53.92 ± 3.40% ตามลำดับ) สูงกว่าชุดควบคุม (38.24 ± 3.40%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) สอดคล้องกับรายงานการศึกษาที่ผ่านมาเกี่ยวกับการใช้แบคทีเรียโพรไบโอติกและยีสต์โพรไบโอติกในการเพิ่มความต้านทานแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคในกุ้ง ยกตัวอย่างเช่น การศึกษาของ Balcazar and Rojas-Luna (2007) ซึ่งทำการศึกษาโดยใช้โพรไบโอติก 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *V. alginolyticus* UTM 102, *B. subtilis* UTM 126, *Roseobacter gallaeciensis* SLV03 และ *Pseudomonas aestumarina* SLV22 ผสมในอาหารเลี้ยงกุ้ง (10^5 CFU/g) และให้กุ้งขาวแวนนาไมกินเป็นเวลา 28 วัน จากนั้นเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. parahaemolyticus* PS-017 ความเข้มข้น 10^6 CFU/ml เป็นเวลา 14 วัน ผลการทดลองพบว่ากุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับโพรไบโอติกทั้ง 4 ชุด มีอัตราการตายสะสม (17-22%) น้อยกว่าชุดควบคุม (33%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) Tseng et al. (2009) ใช้แบคทีเรียโพรไบโอติก *Bacillus* sp. E20 ผสมอาหารเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในอัตราส่วน 10^6, 10^7 และ 10^8

CFU/kg และนำไปเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมเป็นเวลา 98 วัน จากนั้นทำการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคโดยการฉีด *V. alginolyticus* เข้าในตัวกุ้งที่ความเข้มข้น 10^5 CFU/shrimp พบว่ากุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับโพรไบโอติกทั้ง 3 ชุดมีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

นอกจากนี้ Nimrat, Tanutpongpalin, Sritunyalucksana, Boonthai, & Vuthiphandchai (2013) ทำการศึกษาโดยใช้แบคทีเรียโพรไบโอติกชนิด *B. subtilis* F6 และ *Enterococcus* sp. S2 ผสมกับอาหารให้กุ้งกุลาดำกินในอัตราส่วน 3 ml/kg เป็นเวลา 84 วัน จากนั้นเหนี่ยวนำให้เกิดโรคโดย *V. harveyi* ความเข้มข้น 10^5 CFU/ml เป็นเวลา 10 วัน พบว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับโพรไบโอติกมีอัตราการตายสะสม (46.67 ± 1.44%) น้อยกว่าชุดควบคุม (61.67 ± 6.29%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) รวมทั้ง Rengpipat et al. (1998) ใช้แบคทีเรียโพรไบโอติก *Bacillus* S11 ผสมกับอาหารเลี้ยงกุ้งโดยแบ่งออกเป็น 3 รูปแบบ ได้แก่ เซลล์ที่มีชีวิต (Fresh cell) เซลล์ที่มีชีวิตในสารละลาย Normal saline (Fresh cells in normal saline) และเซลล์ระเหิดแห้ง (Lyophilized cells) และนำไปเลี้ยงกุ้งกุลาดำเป็นเวลา 100 วัน จากนั้นทำการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ D331 ความเข้มข้น 10^5 CFU/ml เป็นเวลา 10 วัน พบว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับโพรไบโอติกมีอัตราการรอดชีวิต 100% ในขณะที่ชุดควบคุมมีอัตราการรอดชีวิตเพียง 26% เท่านั้น

ส่วนการศึกษาเกี่ยวกับการใช้ยีสต์โพรไบโอติกในการเพิ่มความต้านทานแบคทีเรียก่อโรคนั้น ยกตัวอย่างเช่น การศึกษาของฉัทชนัน ศิริไพศาล, นนทวิทย์ อารีย์ชน, เรืองวิชญ์ ยุ้นพันธ์ และนิติ ชูเชิด (2549) ซึ่งใช้ β-glucan ผสมอาหารที่ใช้เลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในอัตราส่วน 1, 3 และ 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 14 วัน พบว่ากุ้งขาวที่ได้รับ β-glucan ทั้ง 3 อัตราส่วนมีอัตราการตายน้อยกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) หลังจากฉีด *V. harveyi* เข้าทางกล้ามเนื้อลำตัวในความเข้มข้นที่ทำให้กุ้งตาย 50% พรเลิศ จันทร์รัชชกูล, นภดล ศุกระกาญจน์, และพัฒน์พงศ์ คงยั่งยืน (2541) ที่ทำการศึกษาผลของ β-1,3 glucan ต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้นกันของกุ้งกุลาดำ โดยใช้ β-1,3 glucan ผสมในอาหารเลี้ยงกุ้งในอัตราส่วน 5 และ 10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม โดยให้กุ้งกินเป็นเวลา 3 วัน พบว่ากุ้งที่ได้รับ β-1,3 glucan ในอัตราส่วน 10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ระบบภูมิคุ้มกันจะมีความสามารถในการกำจัด *V. harveyi* ได้ดีกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) Burgent, Burnett, and Burnett (2004) พบว่ากุ้งขาวแวนนาไมที่กินอาหารผสมยีสต์ 1% เป็นเวลา 4 สัปดาห์มีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) หลังจากฉีด *Vibrio* sp. สายพันธุ์ 90-69B3 ความเข้มข้นประมาณ 2 x 10^5 CFU/g ของน้ำหนักตัว

สำหรับการทดสอบความต้านทานต่อแบคทีเรียก่อโรคของกุ้งขาวแวนนาไมในครั้งนี้ พบว่า *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 สามารถก่อให้เกิดโรคในกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 30 ได้ แต่

ในการทดลองที่ 2 ที่ผ่านมาพบว่า *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ไม่สามารถก่อให้เกิดโรคในกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 60 ได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในตัวกุ้งที่แตกต่างกันซึ่งในกุ้งขนาดใหญ่การทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมจะมีประสิทธิภาพมากกว่าในกุ้งขนาดเล็กสอดคล้องกับการศึกษาของอกนิษฐ์ ญาณโกมุทและคณะ (2553) ที่ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแบคทีเรียสกุล *Vibrio* ในลำไส้ของกุ้งขาวแวนนาไมที่มีขนาดแตกต่างกัน 3 ขนาด ได้แก่ ขนาดเล็ก ขนาดกลาง และขนาดใหญ่ โดยทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน พบว่าในกุ้งขาวแวนนาไมขนาดเล็กมีปริมาณแบคทีเรียสกุล *Vibrio* ในลำไส้มากที่สุด ($9.92 \pm 3.06 \times 10^6$ CFU/g) รองลงมาคือกุ้งขาวแวนนาไมขนาดกลาง ($6.17 \pm 0.50 \times 10^6$ CFU/g) และกุ้งขาวขนาดใหญ่ ($1.67 \pm 1.29 \times 10^6$ CFU/g) ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แสดงให้เห็นว่าในกุ้งขาวแวนนาไมขนาดเล็กจะมีปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* ในลำไส้น้อยกว่าในกุ้งขาวแวนนาไมขนาดใหญ่อาจเนื่องจากกุ้งขาวขนาดใหญ่มีระบบภูมิคุ้มกันที่ดีกว่า ร่างกายจึงสามารถกำจัดเชื้อโรคต่าง ๆ ได้ดีกว่ากุ้งขนาดเล็ก รวมทั้งมีการรายงานว่าในสัตว์น้ำระยะวัยอ่อน (Larvae stages) มักจะประสบปัญหาเกี่ยวกับระบบลำไส้ เช่น การติดเชื้อในระบบลำไส้ โดยมีสาเหตุเนื่องมาจากทางเดินอาหารของสัตว์น้ำวัยอ่อนยังพัฒนาไม่เต็มที่ (Timmermans, 1987) และระบบภูมิคุ้มกันก็ยังพัฒนาไม่สมบูรณ์เต็มที่เช่นเดียวกัน (Vadstein, 1997)

อย่างไรก็ตามการศึกษาในช่วง 30 วันก่อนการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคพบว่าผลการทดลองที่ได้ในกุ้งระยะโพสลาวา 30 คล้ายกับที่ทำการศึกษาในกุ้งระยะโพสลาวา 60 คือแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งไม่มีผลต่อปริมาณแบคทีเรียทางทะเล และสามารถลดปริมาณแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ใน Hepatopancreas-Intestine และน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมได้ โดยทั้ง 3 ชุดสามารถลด *Vibrio* ได้ไม่แตกต่างกัน รวมทั้งสามารถช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของกุ้งขาวแวนนาไม และไม่มีผลต่อค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ ค่าความขุ่น ค่าความเค็ม และอุณหภูมิของน้ำในบ่อเพาะเลี้ยง นอกจากนี้ยังสามารถลดปริมาณ *V. harveyi* ใน Hepatopancreas-Intestine และน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมหลังเติมเพื่อทดสอบความต้านทานได้

ปริมาณแบคทีเรียทางทะเลที่พบใน Hepatopancreas-Intestine ของกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 30 ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน มีปริมาณเท่ากับ $5.90 \pm 0.96 \times 10^6$ CFU/g ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับที่พบใน Hepatopancreas ของกุ้งระยะโพสลาวา 60 ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 และ 120 วัน สอดคล้องกับการศึกษาของ Vicira et al. (2010) ซึ่งพบว่าปริมาณแบคทีเรียทางทะเลในระบบทางเดินอาหารของกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 20 ที่ทำการเพาะเลี้ยงในประเทศบราซิลมีปริมาณเท่ากับ 1.0×10^6 CFU/g และปริมาณแบคทีเรียทางทะเลในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาว

แวนนาไมมีปริมาณเท่ากับ $7.03 \pm 1.10 \times 10^4$ CFU/ml สอดคล้องกับการรายงานของ Kannipiran et al. (2009) ซึ่งพบว่าแบคทีเรียทางทะเลในน้ำบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่เพาะเลี้ยง 30 วันในรัฐ Tamil Nadu ประเทศอินเดีย มีปริมาณเท่ากับ 4.0×10^4 CFU/ml

ส่วนปริมาณแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ที่พบใน Hepatopancreas-Intestine ของกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 30 ที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน มีปริมาณเท่ากับ $4.70 \pm 1.08 \times 10^5$ ซึ่งใกล้เคียงกับที่พบใน Hepatopancreas ของกุ้งระยะโพสลาวา 60 ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 และ 120 วันเช่นเดียวกันแบคทีเรียทางทะเล สอดคล้องกับการศึกษาของ Li et al. (2007) ซึ่งพบว่าปริมาณแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ในระบบทางเดินอาหารของกุ้งขาวแวนนาไมที่เมืองเซี่ยเหมิน (Xiamen) ประเทศจีนมีปริมาณเท่ากับ 2.60×10^5 CFU/g รวมทั้งการศึกษาของ Vieira et al. (2010) จากประเทศบลาซิลซึ่งตรวจพบแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ในระบบทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำเท่ากับ 2.00×10^5 CFU/g และปริมาณแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงมีปริมาณเท่ากับ $1.02 \pm 0.53 \times 10^4$ CFU/ml ซึ่งใกล้เคียงกับที่พบในน้ำบ่อกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 60 ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 และ 120 วัน สอดคล้องกับการศึกษาของ Far et al. (2009) ซึ่งพบว่าน้ำบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมที่มหาวิทยาลัยปุตรา (Putra) ประเทศมาเลเซียมีแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae เท่ากับ $3.1 \pm 0.25 \times 10^4$ CFU/ml

สำหรับปริมาณแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ชนิดอื่น ๆ ที่ไม่ใช่ *V. harveyi* ใน Hepatopancreas-Intestine และน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมที่เจริญบนอาหาร VHA มีปริมาณใกล้เคียงกับที่พบบนอาหาร TCBS agar โดยมีปริมาณสูงกว่าเล็กน้อย

เมื่อทดสอบความต้านทานแบคทีเรียก่อโรคจาก *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ความเข้มข้น 10^6 CFU/ml พบว่าไม่มีผลต่อปริมาณแบคทีเรียทางทะเลและแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ใน Hepatopancreas-Intestine ของกุ้งขาวแวนนาไมในชุดควบคุม แต่มีผลต่อปริมาณแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ในชุดที่เติมโพรไบโอติกทั้ง 3 ชุด รวมทั้งมีผลต่อปริมาณแบคทีเรียทางทะเลและแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ในน้ำ ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ใน Hepatopancreas-Intestine ของกุ้งขาวแวนนาไมในชุดที่เติมโพรไบโอติกทั้ง 3 ชุด และแบคทีเรียทางทะเลกับแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ในน้ำของทั้ง 4 ชุดการทดลองมีปริมาณน้อยกว่าปริมาณ *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ที่เติมลงในน้ำ (ประมาณ 10^6 CFU/ml) จึงทำให้ปริมาณแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมของทั้ง 4 ชุดการทดลอง มีปริมาณเพิ่มมากขึ้น

จากการศึกษาชนิดและสัดส่วนของแบคทีเรียทางทะเลใน Hepatopancreas-Intestine และน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 30 พบว่าชนิดของแบคทีเรียมีความแตกต่างจากที่พบในกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 60 โดยการการทดลองครั้งนี้สามารถจำแนกชนิดของ

แบคทีเรียทางทะเลได้ทั้งหมด 10 ชนิด ได้แก่ *B. brevis*, *B. firmus*, *B. pumilus*, *Kytococcus sedentarius*, *Methylobacterium* spp., *Sphingomonas paucimobilis*, *Sphingobacterium multivorum*, *Staphylococcus auricularis*, *V. cincinnatiensis* และ *V. parahaemolyticus* โดยแบคทีเรียชนิดเด่นที่ใน 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 หลังจากทำการทดลองเป็นเวลา 30 วันพบว่าไม่สามารถตรวจพบ *V. parahaemolyticus* และ *V. cincinnatiensis* ในชุดที่ได้รับโพรไบโอติกทั้ง 3 ชุดการทดลอง แต่ยังคงตรวจพบในชุดควบคุม ทั้งนี้เนื่องจากแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสมที่เติมมีความสามารถในการลดปริมาณแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ให้มีปริมาณน้อยกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

เมื่อทำการทดสอบความต้านทานแบคทีเรียก่อโรคของกุ้งขาวแวนนาไมโดยเติม *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ความเข้มข้น 10^6 CFU/ml พบว่ามีผลต่อสัดส่วนของแบคทีเรียทางทะเลใน Hepatopancreas-Intestinec ของกุ้งขาวแวนนาไมในเพียงเล็กน้อย ส่วนในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงพบว่าการเติม *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 มีผลต่อสัดส่วนของแบคทีเรียทางทะเลชนิดอื่น ๆ โดยเฉพาะในช่วงแรกของการเติม อย่างไรก็ตามพบว่าสัดส่วนของ *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 ใน Hepatopancreas-Intestinec และน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงของชุดที่เติมโพรไบโอติกทั้ง 3 มีค่าน้อยกว่าชุดควบคุมตลอดระยะเวลาการทดลองทั้งนี้อาจเกิดจากกลไกในการควบคุมแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ของแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสมดังที่ได้อธิบายมาแล้วก่อนหน้านี้

แบคทีเรียทางทะเลที่พบในการทดลองครั้งนี้พบว่าแบคทีเรียกลุ่มเด่นที่พบไม่ใช่แบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae สอดคล้องกับการศึกษาของ Vandenberghe et al. (1999) ซึ่งรายงานว่าแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ไม่ใช่แบคทีเรียกลุ่มเด่นในกุ้งขาวแวนนาไม ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของ Moss, LeaMaster, and Sweeney (2000) ที่พบว่า *Vibrio*, *Aeromonas* และ *Pseudomonas* เป็นแบคทีเรียชนิดเด่นในระบบทางเดินอาหารของกุ้งขาวแวนนาไม จากหลาย ๆ รายงานการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Photobacterium*, *Pseudoalteromonas, Pseudomonas* และ *Vibrio* เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นที่พบได้ในระบบทางเดินอาหารของกุ้ง (Dempsey, Kitting, & Rosson, 1989; Oxley et al., 2002; Yasuda & Kitao, 1980) ส่วน *Staphylococcus* และ *Micrococcus* เป็นแบคทีเรียที่สามารถพบได้ทั่วไปในสิ่งมีชีวิต (Goodwin, 2005)

ชนิดของแบคทีเรียที่ทางทะเลที่พบในการทดลองครั้งนี้พบว่า *B. brevis*, *B. firmus*, *B. pumilus*, *Methylobacterium* spp., *Sphingomonas spiritivorum*, *Sphingomonas multivorum* และ *Staphylococcus auricularis* เป็นแบคทีเรียชนิดที่ไม่ก่อโรค ส่วน *Kytococcus sedentarius*, *V. parahaemolyticus* และ *V. cincinnatiensis* เป็นแบคทีเรียก่อโรค โดย *Kytococcus sedentarius* ทำให้เกิดโรค Pitted keratolysis ในมนุษย์ (Longshaw, Wright, Farrell, & Holland, 2002) *V. parahaemolyticus* สามารถก่อให้เกิดโรคในมนุษย์และสัตว์ดังที่ได้กล่าวมาแล้วในการทดลองที่ 2 สำหรับ *V. cincinnatiensis* สามารถก่อให้เกิดโรคในมนุษย์ (Braude et al., 1986)

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

เมื่อทำการทดสอบเป็นเวลา 30 วันพบว่าการเติมโพรไบโอติกไม่มีผลต่อสัดส่วนของแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae เมื่อทำการทดสอบความต้านทานแบคทีเรียก่อโรคพบว่าการเติม *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 มีผลต่อสัดส่วนของแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ใน Hepatopancreas-Intestine และน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมทั้ง 4 ชุดการทดลอง โดย *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 เป็นแบคทีเรียชนิดเด่นใน Hepatopancreas-Intestine และน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมตลอดระยะเวลาการทดสอบ

ชนิดของแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ที่พบในการทดลองครั้งนี้คล้ายกับที่พบในการศึกษาของ Gomez-Gil (1998) ซึ่งคัดแยกแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae จาก Hepatopancreas น้ำเลือด และทางเดินอาหารของกุ้งขาวแวนนาไมที่มีสุขภาพดีพบว่าสามารถจำแนกแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ *Photobacterium phosphoreum*, *V alginolyticus*, *V. damsel*, *V. mimicus*, *V. ordalii*, *V. parahaemolyticus*, *V. pelagius*, *V. splendidus*, *V. tubiashii*, *V. vulnificus* และ *Vibrio* sp. ซึ่งพบว่ามีความแตกต่างจากกุ้งที่เป็นโรคซึ่งจะพบแบคทีเรียชนิดเด่นเพียง 1 หรือ 2 ชนิด (Song, Cheng, & Wang, 1993; de la Pena, Tamaki, Momoyama, Nakai, & Muroga, 1993; Yang, Wu, & Zhu, 1992) ยกตัวอย่างเช่นในกุ้งกุลาดำที่ป่วยและใกล้ตายในประเทศไต้หวันพบว่าแบคทีเรียที่แยกได้จาก Hepatopacres เป็นแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ถึง 86.4% โดย *Vibrio* ชนิดเด่นมี 2 ชนิด คือ *V. damsel* 22.4% และ *V. harveyi* 26.9% (Chen, Huang, & Kou, 1992)

แบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ที่พบการทดลองครั้งนี้พบว่าเป็นแบคทีเรียที่สามารถก่อโรคในมนุษย์และสัตว์น้ำได้ โดย *V. fluvialis* สามารถก่อให้เกิดโรคในมนุษย์ ส่วน *V. alginolyticus* และ *V. parahaemolyticus* สามารถก่อให้เกิดโรคในมนุษย์และสัตว์ดังที่ได้กล่าวมาแล้วในการทดลองที่ 2 ส่วน *V. cincinnatiensis* สามารถก่อให้เกิดโรคในมนุษย์ (สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, 2551ข) ส่วน *V. damsela* มีรายงานว่าสามารถทำให้เกิดการติดเชื้อที่บาดแผลในมนุษย์ (Clarridge & Zighelboim-Daum, 1985) นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับการก่อโรคของ *V. damsel* ในสัตว์น้ำชนิดต่าง ๆ เช่น ทำให้เกิดการติดเชื้อที่บาดแผลในปลาโลมาปากขวด (*Tursiops truncates*; Fujioka, Greco, Cates, & Schroeder, 1998) เต่ามะเฟือง (*Dermochelys coriacea*; Obendorf, Carson, & McManus, 1987) ปลาสลิดหิน (*Chromis punctipinnis*; Love et al., 1981) ปลากะพงแดง (*Sparus aurata*; Vera, Navas, & Fouz, 1991) ปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*; Renault, Haffiner, Malfondet, & Weppe, 1994) ปลาฉลาม (*Carcharhinus plumbeus*; Colwell & Grimes, 1984) และปลาลิ้นหมา (*Scophthalmus maximus*; Fouz, Larsen, Neilsen, Barja, & Toranzo, 1992) เป็นต้น

สำหรับสัดส่วนและชนิดของแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ชนิดอื่น ๆ ที่ไม่ใช่ *V. harveyi* ใน Hepatopancreas-Intestine และน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมที่เจริญบนอาหาร VHA พบว่าสามารถจำแนกได้ 4 ชนิด ได้แก่ *V. alginolyticus*, *V. fluvialis*, *V. parahaemolyticus*, และ *V. cincinnatiensis* สอดคล้องกับการศึกษาของ Harris et al. (1996) ซึ่งพบว่า *Vibrio* ทั้ง 4 ชนิดนี้สามารถเจริญบนอาหาร VHA ได้ โดยแบคทีเรียชนิดเด่นใน Hapatopancreas-Intestine และน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมตลอดระยะเวลา 30 วัน คือ *V. fluvialis*, *V. parahaemolyticus*, *V. cincinnatiensis* และ *V. alginolyticus* หลังจากทำการทดสอบความต้านทานแบคทีเรียก่อโรคโดยการเติม *V. harveyi* สายพันธุ์ 002 พบว่าแบคทีเรียชนิดเด่นใน Hapatopancreas-Intestine และน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมตลอดระยะเวลาการทดสอบความต้านทานคือ *V. harveyi* สายพันธุ์ 002

การใช้โพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมได้รับความสนใจเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากสามารถช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโต อัตราการรอดชีวิต และความต้านทานต่อการเกิดโรคของกุ้งขาวแวนนาไม รวมทั้งช่วยลดการใช้สารเคมี และยาปฏิชีวนะในการเพาะเลี้ยง ทำให้ผลผลิตที่ได้มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม อย่างไรก็ตามการใช้โพรไบโอติกให้ประสบความสำเร็จได้นั้น ผู้ใช้ต้องมีความรู้ความเข้าใจถึงคุณสมบัติของจุลินทรีย์ รวมทั้งวิธีการใช้และเก็บรักษาที่ถูกวิธีเพื่อให้การนำผลิตภัณฑ์เหล่านี้ไปใช้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดและมีความยั่งยืนในอนาคต

สรุปผลการทดลอง

1. จากการศึกษาพบว่าแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสมสามารถรอดชีวิตและคงทนอยู่ในอาหารกุ้งได้ภายในระยะเวลา 30 วัน ภายใต้การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยมีปริมาณไม่แตกต่างกับวันเริ่มต้นการทดลอง

2. แบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าสามารถช่วยเพิ่มอัตราการรอดของกุ้งขาวแวนนาไม และลดปริมาณแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaccae ในระบบทางเดินอาหาร และน้ำที่ใช้ในเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมได้ โดยชุด T1 มีความสามารถในการลดปริมาณแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ใน Hepatopancreas และลำไส้ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ ชุด T2 และ T3 ส่วนในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงพบว่าโพรไบโอติกทั้ง 3 ชุดการทดลองสามารถปริมาณ *Vibrio* ได้ไม่แตกต่างกัน และไม่มีผลต่อปริมาณแบคทีเรียทางทะเลในระบบทางเดินอาหาร และน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยง รวมทั้งค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ ค่าความขุ่น ค่าความเค็ม และอุณหภูมิของน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมโพรไบโอติก

3. จากการศึกษาผลของแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสมต่อความต้านทานแบคทีเรียก่อโรคของกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 60 พบว่า *V. harveyi* ที่นำมาใช้ในการทดสอบไม่สามารถก่อให้เกิดการตายของกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 60 ในชุดควบคุมและชุดที่เติมโพรไบโอติกที่ระดับความเข้มข้น 10^5 และ 10^7 CFU/ml ได้ แต่อย่างไรก็ตามพบว่าแบคทีเรียโพรไบโอติกและยีสต์โพรไบโอติกสามารถช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิต และลดปริมาณแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ในระบบทางเดินอาหารและน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในช่วงระยะเวลา 30 วันก่อนการทดสอบความต้านทานได้ แต่ไม่มีผลต่อปริมาณแบคทีเรียทางทะเล และค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ ค่าความขุ่น ค่าความเค็ม และอุณหภูมิของน้ำในบ่อเพาะเลี้ยง

4. จากการศึกษาผลของโพรไบโอติกต่อความต้านทานแบคทีเรียก่อโรคของกุ้งขาวแวนนาไมระยะ โพสลาวา 60 พบว่า *V. harveyi* ไม่สามารถก่อให้เกิดการตายของกุ้งขาวแวนนาไมได้ ต่อมาจึงใช้กุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 30 พบว่า *V. harveyi* สามารถก่อให้เกิดโรคในกุ้งขาวแวนนาไมระยะนี้ได้ และแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสมสามารถช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของกุ้งขาวแวนนาไม และลดปริมาณแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae ในระบบทางเดินอาหารและน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมได้ แต่ไม่มีผลต่อปริมาณแบคทีเรียทางทะเล และปริมาณค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ ค่าความขุ่น ค่าความเค็ม และอุณหภูมิของน้ำในบ่อเพาะเลี้ยง

5. แบคทีเรียโพรไบโอติกผสมและยีสต์โพรไบโอติกผสมในรูปการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งจากการศึกษาครั้งนี้สามารถรอดชีวิตและคงทนอยู่ในอาหารกุ้งรวมทั้งช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตและลดปริมาณแบคทีเรียวงศ์ Vibrionaceae แต่ไม่มีผลต่อปริมาณแบคทีเรียทางทะเลและคุณสมบัติทางกายภาพของน้ำในบ่อเพาะเลี้ยงและสุดท้ายสามารถช่วยเพิ่มความต้านทานแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* ในกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาวา 30 ได้

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University