ผลของแบคทีเรียกลุ่มบาซิลัส (*Bacillus spp.*) ในการควบคุม *Vibrio harveyi* และอัตรารอดในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) ในห้องปฏิบัติการ

Effect of *Bacillus* Blend (*Bacillus* spp.) for Control *Vibrio harveyi* and Survival in *Litopenaeus vannamei* Culture in Laboratory Condition

ปาจรีย์ จือเหลียง[1] ชลอ ลิ้มสุวรรณ[1] นิติ ชูเชิด[1] วัชริยา ภูรีวิโรจน์กุล[2] และ พรเลิศ จันทร์รัชชกูล[3]

Pajaree Jueliang[1] Chalor Limsuwan[1] Niti Chuchird[1] Watchariya Purivirojkul[2] and Pornlerd Chanratchakool[3]

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของแบคทีเรียกลุ่มบาซิลัส (*Bacillus* spp.)ในการควบคุมแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* และอัตรารอดในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) ในห้องปฏิบัติการ โดยแยกแบคทีเรียจากผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกได้ 5 ชนิดได้แก่ *Brevibacillus parabrevis, Bacillus velezensis, B. amyloliquifaciens, B. subtilis, B. megaterium* และนำมาทดสอบความสามารถในการ ต่อต้านแบคทีเรีย *V. harveyi* โดยการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่า *Bacillus* แต่ละชนิดทั้ง 5 ชนิดและ *Bacillus* รวมทุกชนิดสามารถยับยั้งเชื้อ *V. harveyi* ได้ดีภายใน 48 ชั่วโมงและผลของแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* spp. ต่ออัตรารอดและการเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไมขนาดน้ำหนัก 7-8 กรัม โดยแบ่ง การทดลองออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มควบคุม (เลี้ยงด้วยอาหารปกติ) และ กลุ่ม ทดลอง ซึ่งให้อาหารสำเร็จรูปที่ผสมผลิตภัณฑ์ โพรไบโอติกในอัตราส่วนโพรไบโอติก 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมเลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน พบว่าอัตรารอดตายของกุ้งในกลุ่มทดลอง 75.00 ± 1.92 % และสูงกว่ากลุ่มควบคุม 63.33 ± 2.72 % อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แต่น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งในกลุ่มทดลอง 21.55 ± 1.98 กรัม ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) จากกลุ่มควบคุมที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 23.70 ± 1.57 กรัม

ABSTRACT

Effect of *Bacillus* blend (*Bacillus* spp.) for control *Vibrio harveyi* and survival rate in *Litopenaeus vannamei* culture in laboratory condition was carried out by re-isolated the *Bacillus* from the product. Five strains of *Bacillus* spp. were isolated and identified as follows; *Brevibacillus parabrevis, Bacillus velezensis, B. amyloliquifaciens, B. subtilis, B. megaterium*. Individual strain and product was used to test against pathogenic bacteria (*V. harveyi*) on agar plate, using agar plate diffusion method. The results show that each stain of *Bacillus* as well as a product could inhibit *V. harveyi* within 48 hours. The effect of probiotic on survival and growth of juvenile *L. vannamei* (7-8 g) in laboratory conditions were also tested. Shrimp were divided into two groups. Control group was fed with the control feed (no probiotic) and the treatment group fed with feed mixed with pro biotic at rate of 5 g/kg of feed. At the end of 60-day culture period, the survival rate of shrimp in treatment group was 75.00 ± 1.92 % and significantly higher ($p<0.05$) than control group which was 63.33 ± 2.72 %. However, average weight of treatment group was 21.55 ± 1.98 g and was not significantly different ($p>0.05$) from control group of the 23.70 ± 1.57 g.

Keywords : Spore-forming bacteria, *Vibrio harveyi, Litopenaeus vannamei*

Email address ; genji_bun@hotmail.com

[1]ศูนย์วิจัยธุรกิจเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพ 10900

[1]Aquaculture Business Research center, Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Bangkhen Campus, Bangkok 10900

[2]ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพ 10900

[2]Department of Zoology, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkhen Campus, Bangkok 10900

[3]Novozymes Biological Asia Pacific

คำนำ

การเพาะเลี้ยงกุ้งของประเทศไทย ในปัจจุบันนี้ ส่วนใหญ่ เป็นการเลี้ยง กุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) แบบพัฒนาที่เกษตรกรจะปล่อยลูกกุ้งลงเลี้ยงในอัตราความหนาแน่นสูง มีการให้อาหารสำเร็จรูปที่มีโปรตีนสูงจึงทำให้มีของเสียสะสมในบ่อเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตามระยะเวลาการเลี้ยง ส่งผลทำให้คุณภาพน้ำเสื่อมโทรมและกุ้งบางส่วนจะอ่อนแอและป่วยเป็นโรคทำให้ผลผลิตต่ำกว่าเป้าหมาย โรคที่สำคัญซึ่งมักเกิดขึ้นจากสภาพแวดล้อมในบ่อไม่เหมาะสมส่วนใหญ่เกิดจากโรคติดเชื้อแบคทีเรียโดยเฉพาะกลุ่มเรียวิบริโอ (*Vibrio* spp.) (Nash *et al*.,1992; Lightner, 1996) เมื่อกุ้งมีการติดเชื้อแบคทีเรียดังกล่าว ส่วนใหญ่จะ ไม่สามารถจะรักษาได้ด้วยการใช้ยาปฏิชีวนะ เนื่องจากกุ้งจะมีอาการป่วยเรื้อรังจนถึงระยะที่กุ้งไม่กินอาหาร การรักษาจึงไม่ได้ผล อีกทั้งการใช้ยาปฏิชีวนะการรักษา โรคอย่างไม่ถูกต้องจะทำให้แบคทีเรีย ก่อโรคเกิดการดื้อยา และการให้สารปฏิชีวนะ ในการรักษาโรคเป็นเวลานานทำให้ผู้บริโภคมีการสะสมสารปฏิชีวนะเหล่านี้ในร่างกาย (วลัยพร, 2544) นอกจากนี้จะทำให้ผลผลิตกุ้งที่มีสารตกค้างไม่เป็นที่ต้องการของผู้ซื้อ จากสาเหตุดังกล่าวข้างต้นจึงมี พัฒนาแนวทาง การเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม เพื่อหลีกเลี่ยงการใช้สารปฏิชีวนะและสารเคมีใน ระหว่าง การเลี้ยง เช่น การนำเอาจุลินทรีย์ หรือแบคทีเรีย มาใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้งเพื่อควบคุมคุณภาพสิ่งแวดล้อมในบ่อกุ้ง และใช้จุลินทรีย์เป็นโพรไบโอติก (probiotic) (มณจันทร์, 2540) โดยแบคทีเรียที่เลือกมานั้นต้องไม่เป็นจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคในกุ้ง (non pathogenic) หรือมีโอกาสก่อให้เกิดโรค แต่มีความสามารถยับยั้งการเจริญของสิ่งมีชีวิตที่ก่อให้เกิดโรคได้ โดยการแย่งอาหารและที่อยู่ หรือยับยั้งโดยการหลั่งสารประเภทเอนไซม์ออกมา ภายนอกเซลล์ และควรที่จะมีความสามารถในการเปลี่ยนสารพิษให้เป็นสารที่มีพิษน้อยลงหรือไม่มีพิษ (วลัยพร , 2544) การนำแบคทีเรียในกลุ่มที่สร้างสปอร์มาใช้เป็นโพรไบโอติกนั้นมีข้อได้เปรียบมากกว่า การใช้ แบคทีเรีย กลุ่มอื่นเนื่องจากเก็บรักษาได้นานขึ้นและสะดวกในการใช้ ซึ่งโดยทั่วไปการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียโพรไบโอติกมักใช้วิธีการทดสอบในหลอดทดลอง (*in vitro*) และทำการทดสอบขั้นต่อไปในตัวสัตว์ทดลองจริง (*in vivo* test) ที่สามารถยืนยันว่าแบคทีเรียโพรไบโอติกสามารถเพิ่มจำนวนได้ เมื่อผ่านจากปากเข้าสู่ภายในระบบทางเดินอาหารของร่างกาย ซึ่งแบคทีเรีย จะต้องรอดชีวิตและสามารถยึดเกาะกับเยื่อบุผิวภายในอวัยวะต่าง ๆ ตามบริเวณหรือจุดที่จำเพาะเจาะจงได้ (Verschuere *et al*., 2000)

สำหรับการศึกษาครั้งนี้เพื่อต้องการ ทราบคุณสมบัติของแบคทีเรียสกุล *Bacillus* สายพันธุ์ต่างๆ ต่อการยับยั้งเชื้อ *V. harveyi* และผลต่ออัตราการรอดตาย การเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไมระหว่างกลุ่มที่ใช้แบคทีเรีย *Bacillus* spp. และกลุ่มที่ไม่ใช้แบคทีเรีย *Bacillus* spp. ระหว่างการเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1.การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียโพรไบโอติก

1.1. ตรวจสอบชนิดของแบคทีเรียที่สามารถสร้างสปอร์ได้ ในผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกโดยนำผลิตภัณฑ์ Pond Safe ที่ได้รับจากบริษัท Novozymes Biological, Inc. มาทำการแยกชนิดของแบคทีเรีย โดยชั่งผลิตภัณฑ์ปริมาณ 1 กรัม ละลายในหลอดแก้วที่มีน้ำเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร จะได้สารละลายแบคทีเรียที่เจือจางลง 10 เท่า แล้วนำมา เจือจาง ต่อไปโดยจ ะดูดสารละลายแบคทีเรียที่ เจือจาง 10 เท่า มา 1 มิลลิลิตร เติมลงในหลอดที่มีน้ำเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ทำซ้ำต่อไปเรื่อยจนครบ 10 หลอด จากนั้นดูดสารละลายแบคทีเรียใน

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

1.2. แยกโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกันของเชื้อแบคทีเรียจากข้อ.1 มาศึกษาลักษณะและรูปร่างเซลล์ของแบคทีเรียแต่ละชนิดโดยวิธีการย้อมแกรม ศึกษาลักษณะและรูปร่างของแบคทีเรียและการสร้างสปอร์ ที่24 และ 48 ชั่วโมง แล้วทำการบันทึกผล และการจำแนกชนิดแบคทีเรียโดยใช้ชุด API 50 CBH

1.3.นำแบคทีเรียในแต่ละสกุลที่แยกชนิดได้และผลิตภัณฑ์ Pond Safe มาทดสอบคุณสมบัติโดยการ Cross streak ตามวิธีการของ Purivirojkul and Areechon (2007) จากนั้นเลือกแบคทีเรียที่เกิด inhibition effect มาทดสอบความสามารถในการสร้างสารต้านทานแบคทีเรีย *V. harveyi* โดยการทำ agar wells plate เพื่อเปรียบเทียบขนาด clear zone ของแบคทีเรีย

2.การ ทดสอบผลของแบคทีเรียต่ออัตรารอดและการเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไมในห้องปฏิบัติการ

2.1 วางแผนการทดลองแบบ CRD (complete randomized design) แบ่งชุดการทดลองออกเป็น 2 กลุ่มคือ

ชุดการทดลองที่ 1 เลี้ยงด้วยอาหารปกติ (กลุ่มควบคุม)

ชุดการทดลองที่ 2 ให้อาหารสำเร็จรูปที่ผสมผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก

2.2 เลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมภายในห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยธุรกิจเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในถังไฟเบอร์กลาส ขนาดความจุ 500 ลิตรจำนวน 8 ถัง โดยในแต่ละชุดการทดลองจะมี 4 ถัง ฆ่าเชื้อในถังก่อนเลี้ยงด้วยคลอรีนผงที่ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตรแช่ทิ้งไว้นาน 1 วัน หลังจากนั้นล้างทำความสะอาดและตากถังให้แห้ง 1-2 วัน น้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมมี ความเค็ม 25 ส่วนในพันส่วน ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนที่ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร โดย เติมน้ำลงในถัง ไฟเบอร์กลาส ในปริมาตร 400 ลิตร ให้ออกซิเจนในถังเลี้ยงนาน 1 ชั่วโมง และปิดเครื่องให้อากาศทิ้งไว้ข้ามคืนเพื่อให้คลอรีนฆ่าเชื้ออย่างมีประสิทธิภาพ หลังจากนั้นเปิดเครื่องให้อากาศตลอดเวลาเพื่อกำจัดคลอรีนออก น้ำที่จะนำมาใช้จะผ่านการตรวจสอบว่าไม่มีคลอรีนเหลืออยู่และ ระหว่าง การเลี้ยงจะใช้ ตัวทำความร้อนในการ ควบคุมอุณหภูมิ ให้อยู่ที่ 30±1 องศาเซลเซียส ตลอดระยะเวลาการเลี้ยง

<u>การเตรียมอาหารและการให้อาหาร</u>

ทั้ง 2 ชุดการทดลองจะเริ่มให้อาหารที่ 3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัวและให้อาหารที่ 4 มื้อต่อวันโดย

ชุดการทดลองที่ 1 เลี้ยงด้วยอาหารปกติ (กลุ่มควบคุม) จะให้อาหารกุ้งสำเร็จรูปที่เคลือบด้วยน้ำมันปลาหมึกอย่างเดียว

ชุดการทดลองที่ 2 ให้อาหารสำเร็จรูปที่ผสม ผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก ในอัตราส่วน 5 กรัม : อาหารกุ้งสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม โดยใช้น้ำมันปลาหมึกเป็นตัวเคลือบอาหารและผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก

2.3 นำกุ้งขาวแวนนาไมจากฟาร์มเอกชนในจังหวัดจันทบุรีที่ใช้ในการทดลองมาพักในถังพัก 7 วันก่อนเริ่มเลี้ยงจริง เมื่อครบกำหนดนำกุ้งมาชั่งน้ำหนักและวัดความยาวเลือกใช้กุ้งที่มีน้ำหนัก 7-8 กรัม ในการทดลองแต่ละถังจะปล่อยกุ้ง 30 ตัวต่อถัง เลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมทั้ง 2 ชุดเป็นระยะเวลา 60 วัน โดยทำการชั่งน้ำหนัก ทุก 10 วันและเปลี่ยนถ่ายน้ำโดยการดูดตะกอนทิ้งก่อนที่จะเปลี่ยนถ่ายน้ำ 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อครบ 60 วัน จะชั่งน้ำหนักและนับอัตรารอดอีกครั้ง

2.4 ศึกษาปริมาณของแบคทีเรียรวมและปริมาณของ *Vibrio* spp. ในลำไส้กุ้งขาวแวนนาไมหลังจากเลี้ยงกุ้งเป็นระยะเวลา 60 วัน เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองตามวิธีการของ Purivirojkul *et al*. (2006)

2.5 การศึกษาคุณสมบัติของน้ำบางประการโดยเก็บตัวอย่างน้ำทุก 10 วัน เพื่อตรวจวิเคราะห์ค่าความเป็นกรดด่าง (พีเอช) ความเป็นด่าง แอมโมเนีย และไนไตรท์ โดยมีการวิเคราะห์ดังนี้ ปริมาณแอมโมเนียรวม ไนไตรท์ โดยใช้วิธีของ APHA *et al*. (1995) ความเป็นด่าง (total alkalinity) ใช้วิธี titration (APHA *et al*., 1995) ส่วนพีเอชวัดโดยใช้เครื่องวัดพีเอช HANNA HI 9026

3.การวิเคราะห์สถิติ

วิเคราะห์ความแตกต่างของอัตรารอดและอัตราการเจริญเติบโตระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มทดลอง โดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test และ T-Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ (อนันต์ชัย, 2542)

ผลและวิจารณ์

1. ผลการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียโพรไบโอติก

1.1 จากการตรวจสอบชนิดของแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกโดยชุด API 50 CHB และการย้อมแกรม พบว่ามีแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ *Brevibacillus parabrevis*, *Bacillus velezensis*, *B. amyloliquifaciens*, *B. subtilis*, *B. megaterium* และพบ 4 ชนิดที่สามารถสร้างสปอร์ได้ ได้แก่ *B. velezensis*, *B. amyloliquifaciens*, *B. subtilis*, *B. megaterium* ส่วน *Brevibacillus parabrevis* ไม่มีการสร้างสปอร์

1.2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียโพรไบโอติกตามวิธีการ Purivirojkul and Areechon (2007) พบว่าหลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แบคทีเรียทั้ง 5 ชนิดและการรวมกันของแบคทีเรีย(*Brevibacillus parabrevis*, *Bacillus velezensis*, *B. amyloliquifaciens*, *B. subtilis*, *B. megaterium*) สามารถยับยั้งเชื้อ *V. harveyi* (ภาพที่ 1) ได้ และจากการเกิด inhibition effect แสดงให้เห็นว่าการร่วมกันของ *Bacillus* spp. (combination of *Bacillus* spp.) สามารถยับยั้งเชื้อ *V. harveyi* ได้สูงกว่า *Brevibacillus parabrevis* และ *Bacillus megaterium* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบจากขนาดของ clear zone (ตารางที่ 1) *Bacillus* spp. เป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ออกมาภายนอกเซลล์ได้เป็นจำนวนมากซึ่งสารดังกล่าวน่าจะเป็นสารในกลุ่ม antimicrobial (Moriarty, 1998) และในการศึกษาครั้งนี้พบว่า *Bacillus* sp. ทุกชนิดที่สามารถแยกชนิดได้นั้นสามารถสร้างสาร antimicrobial ได้สูงสุดใน 48 ชั่วโมงซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Purivirojkul and Areechon (2007) ที่รายงานถึงการสร้างสาร antimicrobial ของ *Bacillus* spp. ซึ่งแยกชนิดได้จากลำไส้กุ้งกุลาดำที่สามารถยับยั้งเชื้อ *V. harveyi* ได้สูงสุดใน 48 ชั่วโมง เมื่อเทียบจากขนาดของ clear zone

Figure 1. Inhibition activities of *Bacillus* spp. on *Vibrio harveyi in vitro* at 48 hours.

1 = inhibition effect of combination of *Bacillus* spp. against *V. harveyi*

2 = inhibition effect of *Brevibacillus parabrevis* against *V. harveyi*

3 = clear zone of the combination of *Bacillus* spp.

Table 1 Size of clear zone of the combination of *Bacillus* spp., *Brevibacillus parabrevis, Bacillus velezensis*, *Bacillus amyloliquifaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* , 2 days showing inhibition effect against *Vibrio harveyi*

	Size of clear zone (mm), 2 days
Combination of *Bacillus* spp.	13.00 ± 1.84[a]
Brevibacillus parabrevis	9.65 ± 0.49[b]
Bacillus velezensis	11.15 ± 0.21[ab]
Bacillus amyloliquifaciens	12.80 ± 0.71[a]
Bacillus subtilis	13.00 ± 0.00[a]
Bacillus megaterium	10.35 ± 0.49[b]

Means values within the same row sharing the same superscript are not significantly different at $P < 0.05$

2. ผลของการใช้แบคทีเรียกลุ่มสร้างสปอร์ต่ออัตรารอดและการเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไมในห้องปฏิบัติการ

ผลของการศึกษา อัตรารอดตายและการเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไมระหว่างกลุ่มที่ใช้แบคทีเรียกลุ่มสร้างสปอร์ และกลุ่มที่ไม่ให้แบคทีเรียกลุ่มสร้างสปอร์ระหว่างการเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ พบว่าหลังจากเลี้ยงกุ้งจนครบ 60 วัน ในกลุ่มควบคุมที่ไม่ให้แบคทีเรียกลุ่มสร้างสปอร์ผสมอาหารระหว่างเลี้ยงมีน้ำหนักเฉลี่ย23.70 ± 1.57 กรัม และกุ้งในกลุ่มทดลองที่ให้แบคทีเรียกลุ่มสร้างสปอร์ผสมอาหารมีน้ำหนักเฉลี่ย21.55 ± 1.98 กรัม และไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) แต่เมื่อพิจารณาถึงอัตรารอดตายพบว่ากุ้งในกลุ่มทดลองมีอัตรารอดตายสูงกว่าในกลุ่มควบคุมและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (ตารางที่ 3) และเมื่อนำอัตรารอดตายมาคำนวณค่า Total production พบว่าในกลุ่มทดลองมีค่าสูงกว่าในกลุ่มควบคุมซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ

Moriarty (1999) ที่รายงานถึงผลของการใช้ *Bacillus* spp. เป็นโพรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งเพื่อควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อ *Vibrio* spp. จำนวน 6 บ่อในฟาร์มเลี้ยงกุ้ง ประเทศฟิลิปปินส์ พบว่าอัตรารอดตายทั้ง 2 รอบการเลี้ยงที่ทำการศึกษานั้นกลุ่มทดลองมีเปอร์เซ็นต์อัตรารอดตายสูงกว่ากลุ่มควบคุม (73-100%, 67-91% ตามลำดับ) และในกลุ่มทดลองมีค่า Total production สูงกว่าในกลุ่มทดลอง (5-8.6 และ 5-6.8 ตันต่อเฮกแตร์ตามลำดับ) อัตรารอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมในกลุ่มทดลองสูงกว่าในกลุ่มควบคุมนั้นอาจสืบเนื่องมาจากแบคทีเรียโดยส่วนใหญ่ในกลุ่ม *Bacillus* spp. มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค(*Vibrio* spp.) (Moriarty, 1999; Purivirojkul *et al*., 2006; Purivirojkul and Areechon, 2007; Decamp *et al*., 2008) ที่ก่อปัญหาในสัตว์น้ำโดยเฉพาะในกุ้งและยังมีคุณสมบัติในการยึดเกาะกับเยื่อบุผิวภายในระบบทางเดินอาหารเมื่อผ่านจากปากเข้าสู่ภายในร่างกาย

Table 3 Survival rate and total production of control and treatment groups after culture 60 days (n = 30)

Tank	Control (%)	Treatment (%)
1	60	76.62
2	63.33	73.33
3	66.67	76.33
4	63.33	73.33
Mean ± SD	63.33 ± 2.72[a]	75.00 ± 1.92[b]
Total production (g)	1500 ± 109.79	1615.33 ± 137.85

Mean values with different superscripts are significantly different (P<0.05)

ผลการทดสอบปริมาณแบคทีเรียรวมในลำไส้กุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา60 วัน ของกลุ่มทดลองเท่ากับ 16.11 ± 2.03 x10^5 CFU/g ส่วนกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการให้โพรไบโอติกผสมอาหารตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเท่ากับ 18.80 ± 1.40 x10^5 CFU/g และไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (p>0.05) ในกลุ่มทดลองไม่พบเชื้อ *Vibrio* spp. ในลำไส้กุ้งขาวแวนนาไม แต่พบเชื้อ *Vibrio* spp. ในกลุ่มควบคุมมีปริมาณที่ 1.2 ± 0.2 x10^5 CFU/g และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) (ตารางที่ 4) ซึ่งมีแนวโน้มใกล้เคียงกับการศึกษาของ Purivirojkul *et al*. (2006) ที่รายงานถึงการลดลงของปริมาณเชื้อ *Vibrio* spp.ในลำไส้เมื่อใช้ *Bacillus pumilus* NW01, *Bacillus sphaericus* NW02, *Bacillus subtilis* NW03 และการร่วมกันของแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำโดยการให้ผสมอาหารเป็นเวลา 4 สัปดาห์ นอกจากนี้ยังพบว่าคุณภาพน้ำในกลุ่มทดลองนั้นโดยเฉพาะค่าแอมโมเนียและไนไตรท์นั้นมีค่าต่ำกว่าในกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 5) เนื่องจากการให้อาหารผสมแบคทีเรียโพรไบโอติกแล้วเคลือบโดยใช้น้ำมันปลาหมึก มีแบคทีเรียโพรไบโอติกบางส่วนหลุดจากเม็ดอาหารลงในน้ำเลี้ยง และแบคทีเรียโพรไบโอติกบางส่วนที่ไม่ยึดเกาะภายในลำไส้กุ้งออกมากับการขับถ่ายของเสียมาอยู่ในน้ำ ซึ่งอาจพบแบคทีเรียชนิดเดียวกันนี้ได้จากในน้ำ และสิ่งขับถ่าย นอกจากนี้ยังมีหลายการศึกษาที่รายงานถึงแบคทีเรียในสกุล*Bacillus* และแบคทีเรียที่ใช้เป็นโพรไบโอติกนั้นสามารถควบคุมและปรับปรุงคุณภาพน้ำระหว่างการเลี้ยงกุ้งไม่ให้อยู่ในระดับที่มากเกินไป(มนฑกานต์ และคณะ, 2547; Lakshmanan and Soundarapandian, 2008; Rajinikanth *et al.,* 2010)

Table 4 The number of total bacteria and *Vibrio* spp. in *L. vannamei* intestine after 60 days of feeding with pro biotic and without pro biotic

Feeds	Total Bacteria ($x10^5$ CFU/g)	*Vibrio* spp.($x10^5$ CFU/g)
Feed with probiotic	16.11 ± 2.03^a	0 ± 0.0^a
Feed without probiotic	18.80 ± 1.40^a	1.2 ± 0.2^b

Mean values with different superscripts are significantly different (P<0.05)

Table 5 Water quality parameters during experiment period

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

Mean values with different superscripts are significantly different (P<0.05)

สรุปผลการทดลอง

จากผลการศึกษาครั้งนี้พบว่า *Bacillus* ทั้ง 5 ชนิด *Brevibacillus parabrevis, Bacillus velezensis, B. amyloliquifaciens, B. subtilis, B. megaterium* สามารถยับยั้งเชื้อ *Vibrio harveyi* ได้และช่วยให้อัตรารอดตายในกุ้งขาวแวนนาไมสูงขึ้นเมื่อใช้ผสมอาหารในการเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ นอกจากนี้ยังช่วยในการควบคุมและปรับปรุงคุณภาพน้ำระหว่างการเลี้ยงกุ้งด้วยเช่นกัน

คำนิยม

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากบริษัท Novozymes Biological, Asia Pacific

เอกสารอ้างอิง

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

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

มนฑกานต์ สมบรูณ์, ชลอ ลิ้มสุวรรณ, นิติ ชูเชิด และ พรเลิศ จันทร์รัชชกูล. 2547. ผลของการใช้จุลินทรีย์กลุ่ม *Bacillus* ที่แตกต่างกัน 3 กลุ่มต่อแบคทีเรียวิบริโอ (*Vibrio* spp.) คุณภาพน้ำและอัตรารอดตายในการอนุบาลลูกกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*). **เรื่องเต็มการประชุมวิชาการ ครั้งที่ 47 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เล่มที่ 4 สาขาประมง**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

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

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

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

Lakshmanan, R. and P. Soundarapandian. 2008. Effect of Commercial Probiotics on Large Scale Culture of Black Tiger Shrimp Penaeus monodon (Fabricius). **Research Journal of Microbiology**, 3(3):198-203.

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

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

Moriarty, D.J. 1999. Disease Control in Shrimp Aquaculture with Probiotic Bacteria. *In* C.R. Bell, M. Brylinsky and P. Johnson-Green, eds. **Microbial Interactions in Aquaculture.** Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology, Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada.

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

Purivirojkul, W., Areechon, N., Srisapoome, P. and M. Maketon. 2006. Competition on Using Nutrient for Growth between *Bacillus* spp. and *Vibrio harveyi.* **Kasetsart J. (Nat. Sci.)** 40 : 499 – 506.

Purivirojkul, W., and N. Areechon, 2007. Application of *Bacillus* spp. Isolated from the Intestine of Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius) from Natural Habitat for Control Pathogenic Bacteria in Aquaculture. **Kasetsart J. (Nat. Sci.)** 41: 125-132.

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

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