บทที่ 5
อภิปรายผลการทดลอง

แบคทีเรีย B.mixed 5 สายพันธุ์ ประกอบด้วย *Bacillus subtilis* (P1), *Bacillus megaterium* (P3), *Bacillus firmus* (P4), *Bacillus lentus* (S22) และ *Bacillus marinus* (S25) เป็นแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินและน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้ง โดยการทดลองของเปรมสุดา สมาน (2539) แบคทีเรีย *Bacillus* spp. เป็นแบคทีเรียที่สามารถพบได้ตามแหล่งน้ำธรรมชาติทั้งในน้ำจืดและน้ำเค็มรวมทั้งดินตะกอน (Taylor and Richardson, 1979) มีการสร้างสปอร์ซึ่งมีสมบัติทนทานต่อภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ทนความร้อนสูง ความแห้งแล้ง และสารฆ่าเชื้อได้ดีกว่า vegetative cell สามารถมีชีวิตอยู่ได้นานนับสิบปี ทนทานต่อพีเอชที่สูงหรือต่ำมากๆ เจริญได้ในน้ำที่มีความเค็มสูง (ตารางที่ 2) *Bacillus subtilis* (P1), *Bacillus megaterium* (P3) และ *Bacillus firmus* (P4) สามารถเจริญได้ในน้ำที่มี NaCl 7% (Sneath, Mair, Sharpe and Holt, 1986) จากรายงานของ Austin (1988) พบว่าในน้ำทะเลมีแบคทีเรีย *Bacillus* sp. มากกว่า 20% ของจุลินทรีย์พวก heterotrophic flora แบคทีเรียดังกล่าวพบมากในส่วนดินตะกอนมากกว่าในน้ำ โดยทั่วไป *Bacillus* spp. มีการสร้างเอนไซม์ขับออกภายนอกเซลล์ (Extracellular enzyme) สามารถย่อยสลายสารต่างๆ เช่น โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมันได้ดี ดังนั้นทำหน้าที่ในการช่วยย่อยสลายสารอินทรีย์ในระบบนิเวศน์ได้ (Valiela, 1995) จากงานวิจัยของเปรมสุดา สมาน (2539) มีการนำแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* (P1), *Bacillus megaterium* (P3), *Bacillus firmus* (P4), *Bacillus lentus* (S22) และ *Bacillus marinus* (S25) ผสม 5 สายพันธุ์ ในอัตราส่วน 1:1:1:1:1 โดยปริมาตร ทดสอบการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสียเทียมที่ประกอบด้วยอาหารกุ้ง 0.5-3% พบว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถย่อยสลายสารอินทรีย์ในระดับ *in vitro* ได้ดี โดยลดปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำเสียเทียมที่เตรียมจากการเติมอาหารกุ้ง 0.5% 1% 2% และ 3% (W/V) ได้ 97% 88% 88% และ 84% ตามลำดับ ภายในเวลา 7 วัน ดังนั้นในงานวิจัยนี้ได้นำแบคทีเรียนี้มาเสริมในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียในระดับ *in vivo* เป็นการศึกษาต่อเนื่องจากระดับห้องปฏิบัติการเพื่อนำไปประยุกต์ใช้จริงในอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งต่อไป

การแยกแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* (P1), *Bacillus megaterium* (P3), *Bacillus firmus* (P4), *Bacillus lentus* (S22) และ *Bacillus marinus* (S25) บนอาหารแข็งทริปติกซอย พบว่าลักษณะโคโลนีและการเจริญของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกัน จึงง่ายต่อการติด

ตามการเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรียแต่ละชนิดได้ ในการเตรียมแบคทีเรียสำหรับการเติมในน้ำหรือในอาหารกุ้ง ควรเตรียมในปริมาณเพียงพอสำหรับการใช้ 2-3 วัน เพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดช่วงระยะเวลา Latent period ของแบคทีเรีย ที่อยู่ในระยะการก่อรูปสปอร์ซึ่งจะต้องใช้ปัจจัยหลายอย่างกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจากรูปสปอร์ไปเป็น vegetative cell

การทดลองเติมแบคทีเรีย *Bacillus* spp. แต่ละสายพันธุ์ P1, P3, P4, S22, S25 และแบบผสม 5 สายพันธุ์ B.mixed ในน้ำเลี้ยงกุ้ง เมื่อทดลองในกุ้งระยะ PL8 เป็นที่น่าสังเกตว่าแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ไม่ก่อให้เกิดโรคในกุ้งทดลอง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากแบคทีเรียที่ใช้เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในน้ำจากบ่อกุ้ง และจำนวนแบคทีเรียที่เติมลงในบ่อเลี้ยงกุ้งไม่สูงกว่าที่พบในน้ำจากบ่อกุ้งที่ศึกษาโดยเปรมสุดา สมาน (2539)

งานวิจัยเกี่ยวกับกุ้งกุลาดำวัยอ่อนส่วนใหญ่เน้นการทดลองเกี่ยวกับชนิดอาหาร อาทิเช่น การทดลองอนุบาลกุ้งกุลาดำโดยนิเวศน์ เรืองพานิชย์, เจนจิตต์ คงกำเนิด และประมวล อ่อนละมัย (2533) เลี้ยงกุ้ง PL4-PL15 โดยใช้อาหาร 2 ชนิด พบว่ากุ้งมีอัตรารอดเฉลี่ยสูงสุด 89.3% ในปี 2531 สรรเสริญ ช่อเจี๊ยง และคณะ ได้ทดลองเปรียบเทียบการอนุบาลกุ้งแชบ๊วยในเรื่องความถี่ของการให้อาหาร 3 มื้อ/วัน และ 4 มื้อ/วัน พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยมีอัตรารอดเฉลี่ย 42.06% และ 45.13% ตามลำดับ แต่ยังไม่มีรายงานการศึกษาโดยการเติมแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในน้ำระหว่างการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ จากผลการทดลองเลี้ยงกุ้ง PL8 โดยการเติมแบคทีเรีย B.mixed ในงานวิจัยนี้ทุกกลุ่มพบว่าภายใน 15 วันแรกกลุ่มกุ้งที่ได้รับการเลี้ยงโดยการเติม B.mixed ในน้ำมีอัตราการรอดของกุ้งสูงกว่ากลุ่มควบคุม แม้ว่าอัตราการรอดต่ำกว่าการทดลองอนุบาลกุ้งที่เคยมีการศึกษามาก่อน เหตุผลอาจเนื่องมาจากการเปลี่ยนน้ำครั้งละ 30% โดยปริมาตร ทุก 3 วัน อาจนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงจำนวนและชนิดของแบคทีเรีย ทำให้คุณภาพน้ำในการเลี้ยงกุ้งเปลี่ยนจากวัตถุประสงค์ที่ต้องการและแตกต่างจากรายงานของผู้ทำการศึกษาไว้ อย่างไรก็ตามจากการทดลองของธวัช ศรีวีระชัย, สุพล ตั้นสุวรรณ และชีรพงษ์ ไกรนรา (2534) ทดลองอนุบาลกุ้ง PL5-PL20 เพื่อศึกษาชนิดอาหารที่เหมาะสม 3 ชนิด มีการเปลี่ยนน้ำ (50% โดยปริมาตร) และดูดตะกอนทุกวัน ก็ยังพบว่ากุ้งมีอัตรารอด 54.33%, 62.44% และ 57.83%

เป็นที่ทราบกันดีว่าแบคทีเรียมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในของเสียรวมทั้งในน้ำเสีย (Baines and Pace, 1991) ทั้งนี้มีรายงานสนับสนุนจากการทดลองของเปรมสุดา สมาน (2539) พบว่าปริมาณสารอินทรีย์ถูกย่อยสลายโดยแบคทีเรีย P1, P3, P4, S22, S25 มีค่าตั้งต้น 10,000 มก./ล. ขึ้นไป อัตราการย่อยสลายเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะ 2-3 วันแรกและเมื่อ

ปริมาณสารอินทรีย์ลดลงจนมีค่าประมาณ 3,000 มก./ล. อัตราการย่อยสลายสารอินทรีย์ต่ำมาก ขณะเดียวกันปริมาณสารอินทรีย์ในกลุ่มเติมแบคทีเรียอาจสูงกว่ากลุ่มควบคุม ทั้งนี้เกิดจากแบคทีเรียที่เติมลงไปเป็นสาเหตุของการเพิ่มปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำ เช่นเดียวกับการทดลองดังรูปที่ 10, 17 และ 22 พบว่าค่าซีโอดีน้อยกว่า 4,000 มก./ล. B.mixed ไม่มีผลในการย่อยสลายสารอินทรีย์ ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่าการย่อยสลายสารอินทรีย์โดยแบคทีเรียจะต้องมีปริมาณสารตั้งต้นที่เพียงพอ ในภาวะที่มีสารตั้งต้นจำกัดอาจมีผลให้การเจริญของแบคทีเรียลดลง และลดประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอินทรีย์ของแบคทีเรีย (Pahm and Alexander, 1993) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Marxen และ Witzer (1991) พบว่าความเข้มข้นของสารตั้งต้นมีผลต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์ของจุลินทรีย์ในแหล่งน้ำธรรมชาติ ทำให้อัตราการย่อยสลายของจุลินทรีย์ในแหล่งน้ำลดลงได้

จากการทดลองเลี้ยงกุ้ง PL15 เป็นระยะเวลา 56 วัน โดยเติม B.mixed ซึ่งประกอบด้วย P1, P3, P4, S22, S25 ในอัตราส่วน 1:1:1:1:1 โดยปริมาตร มีปริมาณ แบคทีเรีย 2 ระดับ คือ ชนิดละ $1.5x10^{2}$ cfu/ml และ $1.5x10^{4}$ cfu/ml ลงในน้ำ พบว่าอัตรารอดของกุ้งกุลาดำในทุกกลุ่มทดลองมีค่าต่ำ ทั้งนี้อาจเกิดจากไม่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำตลอดการทดลอง ทำให้เกิดมลภาวะ ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกุ้ง (แอมโมเนีย 0.25 มก./ล. ไนไตรท์ 0.47 มก./ล. และไนเตรต 0.72 มก./ล.) เนื่องจากคุณภาพน้ำเป็นปัจจัยที่สำคัญต่ออัตรารอดและมีผลต่อการเจริญเติบโตของกุ้ง (Chui, 1988) จากการศึกษาของ สิริ ทุกข์วินาศ (2527) ปริมาณแอมโมเนีย 48.209 มก./ล. สามารถทำให้ลูกกุ้งกุลาดำระยะ PL10 ตาย 50% ใน 24 ชม. (ค่าปลอดภัยเท่ากับ 0.0396 มก./ล.) และปริมาณไนเตรต 543.57 มก./ล. สามารถทำให้ลูกกุ้งกุลาดำระยะ PL10 ตาย 50% ใน 24 ชม (ค่าความปลอดภัยเท่ากับ 0.3599 มก./ล.) แต่อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองพบว่าในกลุ่มกุ้งที่เลี้ยงโดยการเติม B.mixed ลงในน้ำด้วยปริมาณแต่ละชนิด 10^{4} cfu/ml กุ้งมีน้ำหนักเฉลี่ยมากกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มเติม B.mixed ชนิดละ 10^{2} cfu/ml

การทดลองเลี้ยงกุ้งขนาด 1 เดือน เติมแบคทีเรีย B.mixed ในน้ำปริมาณแต่ละชนิด 10^{4} cfu/ml และในอาหารอัตราส่วนแบคทีเรียต่ออาหารกุ้ง 1:3 ตลอดการเลี้ยงไม่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำ แต่มีระบบกรองน้ำ พบว่าการเติมแบคทีเรียไม่มีผลต่ออัตรารอดของกุ้ง แต่ทำให้กุ้งมีการเจริญเติบโตได้ดีกว่า เนื่องจากมีค่าน้ำหนักเฉลี่ยที่สูงกว่า กลุ่มกุ้งที่เติมแบคทีเรียในน้ำเจริญเติบโตดีกว่ากลุ่มที่เติมแบคทีเรียในอาหาร ที่เป็นเช่นนี้อาจเพราะแบคทีเรียที่ผสมในอาหารอยู่ในรูปสปอร์จึงทำให้มีระยะ latent period ของสปอร์ก่อนจะเข้าสู่ vegetative cell เมตาโบลิสมของ B. mixed ในสภาพสปอร์ในน้ำอาจเกิดได้ช้ากว่า B.mixed สภาพ vegetative cell ที่เติมลงในน้ำโดย

ตรง

ค่าแอมโมเนีย ไนไตรต์ ไนเตรต และออร์โธฟอสเฟต จากการเลี้ยงกุ้งพบว่ามีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น ทั้งนี้เกิดจากการสะสมของเศษอาหาร และของเสียจากตัวกุ้งมีเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ไนโตรเจนส่วนใหญ่เกิดจากการให้อาหารสำเร็จรูปและของเสียที่กุ้งขับถ่ายออกมา เมื่อเกิดการย่อยสลายโดยแบคทีเรียทำให้เกิดกาซแอมโมเนีย (Boyd, 1979 ; Blackburn, Lund and Krom,1988) ค่าแอมโมเนียในระหว่างการเลี้ยงกุ้งจะเริ่มมีค่าสูงขึ้นในระยะแรก หลังจากนั้นจะลดลงและมีการเปลี่ยนแปลงเป็นไนไตรท์และไนเตรตโดยไนตริไฟอิงแบคทีเรีย (Nitrifying bacteria) (Chui,1988) การทดลองที่ 1 ดังแสดงในรูปที่ 11 มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำ 30% โดยปริมาตร อาจมีผลกระทบต่อกระบวนการ ไนตริฟิเคชัน (Nitrification) โดยสังเกตุได้จากคุณภาพน้ำ (แอมโมเนีย ไนไตรท์ ไนเตรต และออร์โธฟอสเฟต) ในกลุ่มที่เติมแบคทีเรียมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุม ที่เป็นเช่นนี้อาจเกิดจากแบคทีเรียที่เติมลงไปมีกระบวนการเมตาโบลิสมในน้ำปลดปล่อยแอมโมเนีย ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงต่อไปเป็นไนไตรท์และไนเตรต แต่การออกซิเดชันในระบบไม่สมดุลย์จึงมีค่าสูงกว่าในกลุ่มควบคุม เช่นเดียวกับค่าออร์โธฟอสเฟตเกิดจากการย่อยสารอินทรีย์ฟอสเฟตในน้ำเปลี่ยนเป็นออร์โธฟอสเฟตทำให้มีค่าสูงขึ้น ส่วนในการทดลองที่ 3 และ 4 (รูปที่ 18-19 และ 23-24) ไม่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำ แบคทีเรียที่เติมลงไปเกิดกระบวนการเมตาโบลิสมร่วมกับไนตริไฟอิงแบคทีเรีย (Nitrifying bacteria) นั่นคือระบบไม่ถูกรบกวนจากการเปลี่ยนถ่ายน้ำ ภาวะสมดุลเกิดได้เร็วไม่มีกาซแอมโมเนียและไนไตรท์สะสมในน้ำปริมาณสูงปริมาณออร์โธฟอสเฟตในเซลล์แบคทีเรียและภายนอกเข้าสู่ภาวะที่คงที่เช่นกัน ค่าออกซิเจนละลายน้ำและพีเอชมีค่าเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกุ้ง การเติมแบคทีเรียไม่มีผลให้ออกซิเจนในน้ำลดลง จึงไม่เป็นอุปสรรคต่อการเจริญเติบโตของกุ้ง

ปริมาณ B.mixed ในบ่อเลี้ยงกุ้งที่เติมเพียงครั้งเดียวในวันแรกของการทดลองพบว่า B. mixed ลดลงตามระยะเวลา (รูปที่ 15) เหตุผลที่เป็นไปได้ก็คืออาหารที่เป็นซับสเตรทสำหรับแบคทีเรียมีไม่เพียงพอ ในที่นี้อาหารสำหรับ B.mixed ได้แก่ อาหารกุ้งที่เหลือ ของเสียจากตัวกุ้ง การเติม B.mixed ลงไปเป็นระยะ ๆ สามารถรักษาปริมาณให้อยู่ในระดับหนึ่งโดยจำนวนแบคทีเรียไม่เปลี่ยนแปลงมากตลอดการทดลอง จึงเป็นที่น่าสนใจว่าในทางปฏิบัติควรมีการเติม B.mixed ในภาวะที่มีสารอินทรีย์สูงหลังเลี้ยงกุ้งไปได้ระยะหนึ่งแล้วเพื่อให้ได้อาหารกุ้งที่เหลือในสภาพละลายได้ในน้ำและมีขี้กุ้งสะสมเป็นอาหารให้แบคทีเรีย ทำให้มีการเจริญและแบ่งเซลล์ได้จำนวนมาก และไม่ต้องเติมแบคทีเรียเป็นระยะ ๆ อีก

จากรูปที่ 25 แสดงให้เห็นว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่ตรวจพบในน้ำเลี้ยงกุ้งมีค่าใกล้

เคียงกับที่ เปรมสุดา สมาน (2539) ได้เคยศึกษาไว้ ($1.8x10^6$ cfu/ml) และมีการตรวจพบ *Vibrio* sp. ในปริมาณซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่เคยมีการศึกษามาก่อน ($0.65x10^2$-$1.22x10^4$) (กุลวรา แสงรุ่งเรือง, 2534) ในระหว่างการเลี้ยง บางครั้งมีปริมาณ *Vibrio* sp. สูงกว่า 10^3 cfu/ml ซึ่งเป็นปริมาณที่จะทำให้กุ้งที่เลี้ยงเป็นระยะเวลานาน ๆ ในสภาพน้ำเสีย แสดงอาการโรค Vibriosis ได้ เนื่องจากมีสภาพความเครียด และระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งต่ำลง (ลิลา เรืองแป้น, 2534) แต่ในการทดลองนี้ไม่พบ Vibriosis ในกุ้ง อาจเนื่องจากสภาพน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งมีการบำบัดตลอดเวลาโดยการกรอง จากการติดตาม B.mixed ที่เติมในน้ำและในอาหารเพื่อเลี้ยงกุ้งเปรียบเทียบกับกุ้งกลุ่มควบคุม โดยการติดตาม B.mixed จากตัวอย่างน้ำ ลำไส้ และขี้กุ้ง เป็นที่น่าสังเกตุว่า ตรวจพบ *Vibrio* spp. ในขี้กุ้ง มากกว่าในลำไส้เมื่อคิดต่อน้ำหนักกรัมเท่ากัน แสดงว่า *Vibrio* spp. สามารถเจริญได้ในระบบทางเดินอาหารเนื่องจากมีสมบัติการเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในลำไส้กุ้ง (ลิลา เรืองแป้น, ยาใจ เจริญวิทยะกุล และ เยาวนิตย์ ดนัยดล, 2528) การติดตาม B.mixed ในตัวอย่างน้ำใช้วิธี Aerobic plate count พบว่าในน้ำเลี้ยงกุ้งของกลุ่มเติม B.mixed ในน้ำและเติมในอาหารมีปริมาณ B.mixed ใกล้เคียงกัน แต่ในลำไส้และขี้กุ้งการติดตามโดยวิธี Aerobic plate count ไม่สามารถตรวจพบ B.mixed แต่เมื่อทำ Heat shock จึงสามารถตรวจพบ B.mixed ได้ ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากกุ้งที่ได้รับ B.mixed โดยผสมกับอาหาร B.mixed อาจอยู่ในรูปสปอร์ผสมกับอาหาร เนื่องจากสภาพในตัวกุ้งอาจไม่เหมาะสมที่จะทำให้สปอร์เปลี่ยนสภาพไปเป็น vegetative cell ต่อมาถูกทำลายด้วยน้ำย่อยจากลำไส้ในตัวกุ้ง จึงทำให้ไม่มี B.mixed ทั้งในสภาพ vegetative cell และ spore ในขี้กุ้ง ผลก็คือไม่สามารถตรวจพบ B.mixed ด้วยวิธีการตรวจหาทั้งสองวิธีดังกล่าว ดังรูปที่ 26 ค. ส่วนกลุ่มที่เติม B.mixed ในน้ำ B.mixed มีโอกาสผ่านเข้าสู่ลำไส้กุ้งโดยการกินน้อยมาก หรือเมื่อผ่านเข้าไปแล้วไม่สามารถเจริญได้ในตัวกุ้ง และอาจถูกทำลายโดยน้ำย่อยของกุ้ง ทำให้ไม่มี B.mixed ทั้งในลำไส้และในขี้กุ้ง

ในการทดลองนี้ได้แสดงภาพรวมของการใช้แบคทีเรียที่สามารถลดปริมาณสารอินทรีย์เพื่อการบำบัดสภาพน้ำให้เหมาะสมกับการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ สิ่งที่น่าสังเกตุก็คือความสามารถของแบคทีเรียในการทดลองระดับ *in vivo* ให้ผลแตกต่างจากการทดลองระดับ *in vitro* ปัจจัยหลายอย่างที่ต้องคำนึงคือ การคัดเลือกแบคทีเรีย การเตรียมแบคทีเรียให้ได้ระยะเวลาเหมาะสมเพื่อเลี้ยง dormant stage ในที่นี้ได้แก่ระยะการเกิดสปอร์ ปริมาณของแบคทีเรียที่ใช้ และช่วงเวลาที่จะให้แบคทีเรีย