บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

การแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างกุ้งกุลาดำบริเวณทางเดินอาหาร ละน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งที่เก็บจากจังหวัดเพชรบุรี จังหวัดฉะเชิงเทรา จังหวัดสมุทรปราการ และจังหวัดสมุทรสาคร สามารถแยกแบคทีเรียบริสุทธิ์ได้ทั้งหมด 377 สายพันธุ์ นับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในทางเดินอาหารกุ้งได้ $1.2x10^6$- $3.4x10^7$ cfu/g (ค่าเฉลี่ยจากบ่อเลี้ยงกุ้ง 4 จังหวัด) ในน้ำเลี้ยงกุ้งมีแบคทีเรียทั้งหมด $1.0x10^4$- $4.4x10^5$ cfu/ml (ค่าเฉลี่ยจากบ่อเลี้ยงกุ้ง 4 จังหวัด) แบคทีเรียที่แยกจากทางเดินอาหารกุ้งจัดอยู่ในสกุล *Bacillus* sp., *Vibrio* sp., *Aeromonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Klebsiella* sp. และ *Staphylococcus* sp. แบคทีเรียที่พบมากคือกลุ่มของ *Bacillus* sp. และ *Vibrio* sp. มีจำนวน $1.1x10^6$ และ $1.3x10^6$ cfu/g สอดคล้องกับงานวิจัยของ Yuthachit และคณะ (1990) ได้ศึกษาแบคทีเรียประจำถิ่นในทางเดินอาหารกุ้งกุลาดำในจังหวัดสงขลา พบว่ามีจำนวน $7.5x10^6$-$1.3x10^7$ cfu/g และในน้ำเลี้ยงกุ้งมีจำนวน $3.9x10^3$-$5.3x10^5$ cfu/ml แบคทีเรียที่แยกได้นำมาจัดอยู่ในสกุล *Vibrio* sp., *Aeromonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Klebsiella* sp., *Arizona* sp., *Enterobacter* sp., *Plesiomonas* sp., *Serratia* sp. และ *Yersinia* sp. แบคทีเรียกลุ่มที่พบมากคือ *Vibrio* sp. มีจำนวน 10^4-10^7 cfu/g รัตน์ชัย ลีโทขวลิต และวิวัฒน์ ชัยชนะศิริวิทยา (2531) ได้ศึกษาแบคทีเรียในทางเดินอาหารกุ้งพบว่าจัดอยู่ในสกุล *Vibrio* sp., *Aeromonas* sp. และ *Pseudomonas* sp. ต่อมา เศรษฐเกียรติ กระจ่างวงษ์ และคณะ (2533) ศึกษาแบคทีเรียจากทางเดินอาหารกุ้งกุลาดำพ่อแม่พันธุ์จากทะเลอันดามัน พบแบคทีเรียชนิดติดสีแกรมลบจัดอยู่ในสกุล *Vibrio* sp. ประมาณ 90.1% จะเห็นได้ว่าแบคทีเรียประจำถิ่นในทางเดินอาหารกุ้งที่แยกได้จากกุ้งต่างถิ่นกัน จะมีแบคทีเรียแตกต่างกันเป็นอิทธิพลเนื่องจากสิ่งแวดล้อมที่กุ้งอาศัยอยู่ แบคทีเรียที่พบในทางเดินอาหารจะพบได้ในน้ำเลี้ยงกุ้งด้วย (Yuthachit และคณะ, 1990) จากรายงานที่กล่าวมาจะพบแบคทีเรียในสกุล *Vibrio* sp., *Aeromonas* sp. และ *Pseudomonas* sp. จัดได้ว่าเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในทางเดินอาหารกุ้งกุลาดำ สาเหตุที่พบแบคทีเรียในกลุ่มพวกนี้ทุกครั้งเพราะมีรายงานว่า *Vibrio* sp., *Aeromonas* sp. และ *Pseudomonas* sp. เป็นแบคทีเรียที่พบได้ในน้ำทะเล (ลิลา เรืองแป้น และคณะ, 2528) แบคทีเรียกลุ่มที่มีความสำคัญคือ *Vibrio* sp. ในกุ้งปกติจะพบว่ามีจำนวนน้อยแต่จะพบเป็นจำนวนที่มากเมื่อกุ้งเกิดความเครียดจากการเลี้ยงแบบหนาแน่น มีการจัดการบ่อไม่ดี นอกจากนี้ยังเป็นกลุ่มที่ก่อให้เกิดโรคในกุ้งได้ โดยจะเป็น secondary cause ในการทำให้เกิดโรค และการเกิดโรคจะเกิดพร้อมกับความผิดปกติอื่นๆ เช่นมีความเครียดมากเกินไป เกิดบาดแผลที่ตัวกุ้ง แบคทีเรียกลุ่มนี้จะเข้าสู่ตัวกุ้งได้ง่าย (Sinderman และ Lighter, 1988) กุ้งเป็นโรคที่เกิด

จาก *Vibrio* sp. เรียกว่าโรค Vibriosis หรือ Vibrio Disease of Penaeid Shrimp (Johnson, 1978) *Vibrio* sp. ที่ทำให้เกิดโรคได้แก่ *Vibrio alginolyticus, V. anguillarum* (ชลอ ลิ้มสุวรรณ และคณะ, 2530 ; Johnson, 1978), *V. metschnikorii* และ *V. fluvialis* (Kaper และคณะ, 1983), *V. harveyi, V. vulnificus* (ลิลา เรืองแป้น และคณะ, 2528) *Vibrio* sp. ที่ก่อโรคนี้แยกได้จากอวัยวะต่างๆและในทางเดินอาหารของกุ้งที่เป็นโรค (ชลอ ลิ้มสุวรรณ และคณะ, 2530) แบคทีเรียอีกกลุ่มคือ *Aeromonas* sp. พบได้ในน้ำทะเลเป็นสาเหตุให้เกิดโรคในสัตว์เลือดอุ่นและสัตว์เลือดเย็น (Janda, 1991) และเป็นสาเหตุให้เกิดโรคติดเชื้อในปลาและกุ้งได้แก่ *Aeromonas hydrophila* (Mateos และ Paniagua, 1995) *A. cavia, A. Jandaei* และ *A. sobria* (Sugita และคณะ, 1995) ส่วนแบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomanas* sp. เป็นสาเหตุให้เกิดโรคในกุ้ง (กุลวรา แสงรุ่งเรือง, 2534) จะเห็นได้ว่าการเกิดโรคในกุ้งกุลาดำส่วนใหญ่เกิดจากแบคทีเรียแกรมลบซึ่งเป็นแบคทีเรียที่พบอยู่ในธรรมชาติของกุ้งอยู่แล้ว จากงานวิจัยนี้ได้ศึกษาแบคทีเรียประจำถิ่นในทางเดินอาหารกุ้งกุลาดำและในน้ำเลี้ยงกุ้งพบแบคทีเรียแกรมลบเป็นส่วนมากเหมือนกับงานวิจัยต่างๆที่ได้กล่าวมาแล้ว แต่งานวิจัยนี้พบแบคทีเรียแกรมบวก 2 สกุลคือ *Bacillus* sp. มีจำนวนใกล้เคียงกับ *Vibrio* sp. อีกกลุ่มคือ *Staphylococcus* sp. แต่พบเป็นส่วนน้อยซึ่งแบคทีเรียกลุ่มนี้จะเกิดจากการปนเปื้อนในระหว่างการขนส่งตัวอย่าง จากมือระหว่างการเก็บตัวอย่าง และการเก็บรักษา (วลัยพร ไชยภูมิ, 2530) จากรายงานการศึกษาแบคทีเรียประจำถิ่นในทางเดินอาหารกุ้งและในน้ำที่ไม่พบว่ามีรายงานการตรวจพบ *Bacillus* sp. เนื่องมาจาก *Bacillus* sp. เป็นแบคทีเรียที่มีสมบัติพิเศษคือสามารถสร้างสปอร์ได้ โดยที่สปอร์จะมีสมบัติพิเศษคือจะสามารถทนอยู่ได้ในสภาพแวดล้อมต่างๆได้ดี ดังนั้นเมื่อเก็บตัวอย่างมาไว้เป็นเวลานาน เซลล์ *Bacillus* sp. ที่มีอยู่ในตัวอย่างจะเปลี่ยนสภาพเป็นสปอร์ จะพบสปอร์ได้ทั่วไปอยู่ในดิน น้ำและตะกอนต่างๆ (Taylor และ Richardson, 1979) นอกจากนี้ยังสามารถพบสปอร์เกาะติดอยู่ในทางเดินอาหารของสัตว์พวก วัว แพะ แกะ (Gibson และ Gordon, 1974) การแยกสปอร์ออกมาจากตัวอย่างต่างๆ จะทำได้โดยการทำ heat shock ที่ 80 °ซ เป็นเวลา 10 นาที เพื่อกระตุ้นการงอกของสปอร์และเพื่อทำลายเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตชนิดอื่น การทำวิธีนี้ทำให้สามารถแยกแบคทีเรียสกุล *Bacillus* sp. ได้ (Jones และ Tomas, 1974) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ใช้วิธี heat shock ที่ 80 °ซ เป็นเวลา 10 นาที ในการแยก *Bacillus* sp. จากทางเดินอาหารและน้ำเลี้ยงกุ้ง และสามารถนับจำนวนได้ใกล้เคียงกับจำนวนของ *Vibrio* sp. จึงจัดได้ว่า *Bacillus* sp. เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในทางเดินอาหารกุ้งและในน้ำ *Bacillus* sp. พบได้ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำและดินตะกอนในบ่อกุ้ง นอกจากนี้ยังมีความสำคัญเพราะสามารถสร้างเอนไซม์ที่มีประโยชน์ในการบำบัดน้ำเสียที่เกิดจากการตกค้างของสารอินทรีย์ในบ่อกุ้ง เอนไซม์ที่สำคัญได้แก่ อะไมเลส โปรตีเอส และไลเปส (เปรมสุดา สมาน, 2539) และสามารถสร้างสารต่อต้านจุลชีพ (Bacteriocin) ที่มีสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ก่อให้เกิดโทษได้ (Tag และคณะ, 1976)

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบของแบคทีเรียที่แยกมาได้ทั้งหมด 377 สายพันธุ์ แบ่งได้เป็นแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ นำส่วนน้ำใสมาทดสอบกับเชื้อทดสอบ ได้แก่ *B. cereus* เป็นตัวแทนของแบคทีเรียแกรมบวกรูปแท่ง *V. harveyi* เป็นตัวแทนของแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่ง *S. aureus* เป็นตัวแทนของแบคทีเรียแกรมบวกรูปกลม โดยใช้วิธีการซึมผ่านวุ้น (Well diffusion assay) (Schillinger และ Lucke, 1989) ดูผลโดยการวัดบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้นทำให้สามารถคัดเลือกแบคทีเรียได้ 1 สายพันธุ์ ที่มีความสามารถในการสร้างสารต่อต้านจุลชีพได้ เพื่อนำมาใช้เป็นโพรไบโอติกเสริมในอาหารกุ้ง แบคทีเรียที่คัดเลือกได้แยกมาจากทางเดินอาหารกุ้งกุลาดำเรียกว่า แบคทีเรีย S11 เมื่อนำมาตรวจสอบการย้อมติดสีแกรม รูปร่างลักษณะ และสมบัติต่างๆ สามารถจัดอยู่ในสกุล *Bacillus* sp. ดังนั้นจึงเรียกว่า *Bacillus* S11 ต่อมาได้นำ *Bacillus* S11 มาทดสอบการสร้างสารต่อต้านจุลชีพต่อเชื้อทดสอบที่ก่อโรคในคนและกุ้ง เชื้อทดสอบที่ก่อโรคในคนได้แก่ *B. cereus, B. subtilis, B. megaterium* และ *Lis. monocytogenes* เป็นตัวแทนของแบคทีเรียแกรมบวกรูปแท่ง *S. aureus* เป็นตัวแทนของแบคทีเรียแกรมบวกรูปกลม และ *E. coli* เป็นตัวแทนของแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่ง เชื้อที่ก่อโรคในกุ้งจะเป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่งได้แก่ *P. aeruginosa, A. hydrophila, V. alginolyticus, V. anguillarum, V. harveyi, V. parahaemolyticus* และ *V. cholera* โดยการนำส่วนน้ำใสที่ได้จาก *Bacillus* S11 มาทดสอบการยับยั้งโดยวิธีการซึมผ่านวุ้น วิธีนี้มีข้อดีคือ สะดวก เห็นผลได้ชัดเจน และใช้เวลาน้อย วิธีนี้ยังช่วยให้ทราบว่าเชื้อทดสอบเกิด Resistant mutant โดยดูจากบริเวณยับยั้งถ้าเชื้อทดสอบสามารถเจริญได้แสดงว่าโคโลนีเหล่านั้นเป็น Resistant mutant อีกวิธีที่ใช้คือการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบในอาหารเหลวโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 nm โดยการคำนวณการแบ่งตัวเป็น 2 เท่าของเชื้อทดสอบ วิธีนี้มีข้อดีคือได้ผลทดสอบที่แน่นอนแต่จะต้องเสียเวลาในการติดตามการเจริญ เมื่อเปรียบเทียบการทดสอบโดยวิธีการซึมผ่านวุ้นกับวิธีที่ทดสอบโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงจะพบว่ามีเชื้อทดสอบบางชนิดที่ไม่ถูกยับยั้งโดยส่วนน้ำใสของ *Bacillus* S11 บนอาหารแข็งแต่จะถูกยับยั้งได้ในอาหารเหลว เนื่องจากในวิธีการซึมผ่านวุ้นจะมีข้อจำกัดจากสาเหตุดังนี้ เบอร์เซ็นต์วุ้นที่ใช้ในเจาะหลุม ปริมาณความชื้นในเนื้อวุ้น ความสามารถในการซึมผ่านของสารต่อต้านจุลชีพผ่านเนื้อวุ้น น้ำหนักโมเลกุลของสารต่อต้านจุลชีพ และอาจเกิดจากความไม่เที่ยงตรงในการเทวุ้น (Alfred และ Davidsion, 1990) ซึ่งวิธีที่ทดสอบในอาหารเหลวจะไม่มีข้อจำกัดในการทำมากเท่ากับวิธีการซึมผ่านวุ้น ผลการยับยั้งเชื้อทดสอบของ *Bacillus* S11 จะพบว่าส่วนน้ำใสที่ได้จะมีความหลากหลายในการยับยั้งเชื้อทดสอบมาก เพราะสามารถยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ แต่จะพบว่าสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้มากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ เพราะสารต่อต้านจุลชีพที่ได้นี้สร้างขึ้นจากแบคทีเรียแกรมบวกซึ่งจะมีสมบัติที่ว่าสารต่อต้านจุลชีพจะมีผลในการยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มใกล้เคียงกัน และจะยับยั้งเฉพาะเซลล์

แบคทีเรียที่มีบริเวณรับสารต่อต้านจุลชีพเท่านั้น (Tag และคณะ, 1976 ; Klaenhammer, 1988) แต่สารต่อต้านจุลชีพจะสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ เนื่องมาจากสารต่อต้านจุลชีพที่สร้างขึ้นจากแบคทีเรียต่างชนิดกันจะมีผลในการยับยั้งแตกต่างกันในแง่ของการทำลาย และกลไกการทำงาน (Tag และคณะ, 1976) ได้มีรายงานว่าสารต่อต้านจุลชีพที่สร้างจากแบคทีเรียแกรมบวกสามารถที่จะยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ โดยจะมีผลออกฤทธิ์ต่อบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) (Steven และคณะ, 1991) จากผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อทดสอบที่ก่อโรคในคนและกุ้งโดยใช้ส่วนน้ำใสของ *Bacillus* S11 จะเห็นได้ว่า *Bacillus* S11 จะมีความสามารถในการสร้างสารต่อต้านจุลชีพได้ดี ดังนั้นควรที่จะนำ *Bacillus* S11 ไปศึกษาและสกัดสารต่อต้านจุลชีพให้บริสุทธิ์ เพื่อศึกษาโครงสร้างของโมเลกุลและกลไกการออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อทดสอบต่อไป และในอนาคตสารต่อต้านจุลชีพที่สร้างขึ้นจาก *Bacillus* S11 สายพันธุ์นี้น่าจะนำไปใช้สกัดเป็นสารปฏิชีวนะเพื่อที่จะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้เพราะมีผลในการออกฤทธิ์ต่อเชื้อที่ก่อโรคในคนได้ค่อนข้างกว้าง และเป็นผลดีต่ออุตสาหกรรมกุ้งเพราะสามารถออกฤทธิ์ต่อเชื้อที่ก่อโรคในกุ้งได้เป็นอย่างดี จึงจัดได้ว่า *Bacillus* S11 มีสมบัติเป็นโพรไบโอติกที่ดีที่จะนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำได้ สอดคล้องกับรายงานของ Sugita และคณะ (1996) ได้ตรวจพบว่าในทางเดินอาหารของปลามี *Bacillus* sp. เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นและพบว่า *Bacillus* sp. ที่แยกได้ทั้งหมด 65 สายพันธุ์มีเพียง 1 สายพันธุ์คือ *Bacillus* NM 14 ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อที่ก่อโรคในปลาคือ *Vibrio vulnificus* และ *Pasteurella piscicida* จากสมบัตินี้จึงมีการนำ *Bacillus* NM 14 ไปใช้เป็นโพรไบโอติกเสริมในปลาเพื่อลดการเกิดโรคติดเชื้อในปลา

นำ *Bacillus* S11 มาศึกษาการเจริญโดยติดตามวัดการเจริญที่ OD 660 nm และหาภาวะที่ เหมาะสมที่ *Bacillus* S11 สร้างสารต่อต้านจุลชีพได้ดีที่สุด เมื่อติดตามการเจริญและนำส่วนน้ำใสที่เก็บได้ทุก 3 ชม. มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบและวัดพีเอชที่เกิดขึ้นระหว่างการสร้างสารต่อต้านจุลชีพ แสดงผลในรูปที่ 8 พบว่า *Bacillus* S11 จะสร้างสารต่อต้านจุลชีพได้สูงสุดชั่วโมงที่ 18 เมื่อดูจากการเจริญพบว่า *Bacillus* S11 จะเริ่มสร้างสารต่อต้านจุลชีพเมื่อเซลล์อยู่ในระยะ lete log phase และสร้างสารต่อต้านจุลชีพได้สูงสุดในระยะ stetionary phase สอดคล้องกับการทดลองของ Naclerio และคณะ (1993) ได้ศึกษาการสร้างสารต่อต้านจุลชีพของ *B. cereus* พบว่าจะสร้างสารได้เมื่อการเจริญเข้าสู่ระยะ late log phase และสร้างสารต่อต้านจุลชีพได้สูงสุดในระยะ stationary phase เมื่อทราบเวลาที่ *Bacillus* S11 สร้างสารได้สูงสุดต่อมานำมาทดสอบหาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการสร้างสารต่อต้านจุลชีพ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS lactobacilli broth, Brain heart infusion broth, Nutrient broth และ Tryptic soy broth พบว่า *Bacillus* S11 จะสร้างสารได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อทุกชนิด แต่จะสร้างได้น้อยใน Nutrient broth

เมื่อดูจากส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อจะเห็นได้ว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทุกชนิดจะมีน้ำตาลซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเป็นส่วนประกอบยกเว้นใน Nutrient broth ที่มีส่วนประกอบเป็นแหล่งไนโตรเจนเท่านั้นแต่ไม่มีแหล่งคาร์บอน สอดคล้องกับการทดลองของ Naclerio และคณะ (1993) ได้ศึกษาการสร้างสารต่อต้านจุลชีพของ *B. cereus* พบว่าจะสร้างสารได้ดีเมื่อในอาหารเลี้ยงเชื้อมีน้ำตาลเป็นส่วนประกอบ และจะสร้างได้น้อยเมื่อในอาหารไม่มีส่วนประกอบของน้ำตาล ดังนั้นการสร้างสารต่อต้านจุลชีพของ *Bacillus* S11 จะต้องมีแหล่งคาร์บอนอยู่ในปริมาณที่เพียงพอต่อการสร้างสารต่อต้านจุลชีพ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลองมีการสร้างสารทุกชนิดจึงเหมาะที่จะนำมาใช้ในการผลิตสาร แต่ในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้ Tryptic soy broth เป็นอาหารที่ใช้ในการสร้างสารและใช้ในการทดลองต่อไป เพราะเป็นอาหารที่มีราคาถูกที่สุดในอาหารที่ใช้ทดสอบ และมีแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนเพียงพอสำหรับการเจริญและการสร้างสารต่อต้านจุลชีพ ต่อมาได้นำมาหาภาวะอุณหภูมิที่เหมาะต่อการสร้างสาร โดยใช้อาหาร Tryptic soy broth นำมาเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 20, 28, 30, 37 °ซ และที่อุณหภูมิห้อง (โดยให้อากาศและไม่ให้อากาศ) พบว่า *Bacillus* S11 จะสร้างสารได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 25-30 °ซ สร้างได้น้อยที่อุณหภูมิ 20 °ซ และ 37 °ซ สอดคล้องกับการทดลองของ Naclerio และคณะ (1993) ที่พบว่า *B.cereus* จะสร้างสารได้ดีที่อุณหภูมิ 30 °ซ จะสร้างได้น้อยที่อุณหภูมิ 37 °ซ ได้มีผู้รายงานว่าการสร้างสารต่อต้านจุลชีพของแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* sp. จะสร้างได้ดีที่อุณหภูมิ 25-30 °ซ และ *Bacillus* sp. ที่สามารถสร้างสารต่อต้านจุลชีพได้จะอยู่ในกลุ่มของ Mesophilic bacteria ที่มีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญอยู่ในช่วง 25-37 °ซ (Stoffels และคณะ, 1992)

การทดสอบทางสัณฐานวิทยาของ *Bacillus* S11 พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปแท่ง สร้างสปอร์ และต้องการอากาศในการเจริญ จัดเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* sp. (O' Leary, 1987) เมื่อทดสอบทางชีวเคมีเพื่อจัดจำแนกสปีชีส์โดยยึดหลักการจัดจำแนกตาม Bergey's Mannual of Systematic Bacteriology (Sneath และคณะ, 1986) สามารถจำแนกได้เป็น *Bacillus mycoides* ที่แยกได้จากทางเดินอาหารกุ้งกุลาดำ โดยมีรายงานว่า *Bacillus* sp. จะสามารถแยกได้จากทางเดินอาหารของสัตว์ได้ คือจะพบอยู่ในรูปของสปอร์เกาะอยู่ในส่วนทางเดินอาหาร (Gibson และ Gordon, 1974) และในปี 1996 Sugita และคณะสามารถแยก *Bacillus* sp. ได้จากทางเดินอาหารปลา ซึ่ง *Bacillus* sp. เป็นสายพันธุ์ที่ทนต่อสภาวะแวดล้อมต่างๆได้ดี เพราะการสร้างสปอร์ที่ทนต่อสภาพต่างๆได้ รวมทั้งมีอัตราการเจริญและการย่อยสลายที่รวดเร็ว เป็นแหล่งในการสร้างเอนไซม์ที่สำคัญและสารต่อต้านจุลชีพ เพื่อใช้เป็นประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่างๆได้มากมาย

ในการทดสอบทางชีวเคมีได้เปรียบเทียบกับแบคทีเรียมาตรฐานคือ *B. subtilis* TISTR 1 และ *B. cereus* TISTR 4 ผลการทดลองสอดคล้องกับ Bergey's Mannual of Systematic Bacteriology (Sneath และคณะ, 1986) *B. mycoides* ที่แยกได้มีลักษณะคล้ายกับ *B. cereus* มากจะแตกต่างกันที่ลักษณะการเจริญบนอาหารแข็งและการเคลื่อนที่โดยที่ *B. mycoides* จะไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ แต่ *B. cereus* จะเคลื่อนที่ได้ และเพื่อเป็นการศึกษาสมบัติของ *Bacillus* S11 เพิ่มขึ้น ควรมีการศึกษาหาปริมาณ Guanine+Cytosine (%mole) เปรียบเทียบกับแบคทีเรียมาตรฐาน *Bacillus* sp. แต่ละชนิดเพื่อความถูกต้องและชัดเจนยิ่งขึ้น

การที่ *Bacillus* S11 มีความสามารถในการสร้างสารต่อต้านจุลชีพยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคในกุ้งกุลาดำได้ จัดได้ว่ามีสมบัติเป็นโพรไบโอติก สามารถที่จะนำมาผสมในอาหารกุ้งเพื่อให้กุ้งแข็งแรงและเจริญเติบโตได้ดี การนำ *Bacillus* S11 ที่มีสมบัติเป็นโพรไบโอติกมาใช้ในการเลี้ยงกุ้งนั้นจะคล้ายกับในการเลี้ยงไก่ที่สามารถแยกแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในทางเดินอาหารไก่และมีสมบัติในการยับยั้งเชื้อที่ก่อโรคในไก่ได้ จัดว่าแลคติกแอซิดแบคทีเรียมีสมบัติเป็นโพรไบโอติก ได้นำมาผสมในอาหารไก่ พบว่าไก่มีน้ำหนักเพิ่มขึ้นและมีการเจริญเติบโตดีกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับเชื้อ และสามารถต้านทานการเกิดโรคติดเชื้อในไก่ได้ (ฐิติพงษ์ ธนะรัชชติการนนท์, 2539) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้นำ *Bacillus* S11 มาผสมในอาหารกุ้งกุลาดำ โดยอาหารกุ้งกุลาดำที่เตรียมได้จะเป็นอาหารเม็ดสำเร็จรูปที่มีส่วนประกอบของอาหารกุ้งครบ (ภาคผนวก ก ข้อ 24) เมื่อเตรียมเสร็จตามขั้นตอนได้นำมานับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่อยู่ในอาหารกุ้งพบว่ามีจำนวน 2.0×10^{2} cfu/g เมื่อตรวจสอบการติดสีแกรม รูปร่างลักษณะจัดได้ว่าเป็นกลุ่ม *Bacillus* sp. แบคทีเรียกลุ่มนี้จะพบได้ในอาหารทั่วๆไป แม้ว่าอาหารกุ้งที่เตรียมได้จะอบฆ่าเชื้อแล้วแต่แบคทีเรียกลุ่มนี้จะสามารถคงอยู่ได้ในรูปของสปอร์ (Sneath, 1962) และเมื่อนำมาตรวจสอบสมบัติต่างๆ จะเป็น *Bacillus* sp. สายพันธุ์ที่ต่างจาก *Bacillus* S11 ที่แยกมาได้จากทางเดินอาหารกุ้ง การนำ *Bacillus* S11 มาผสมในอาหารกุ้งได้แบ่งการทดลองเป็น 4 กลุ่มการทดลอง ได้แก่ Control, Fresh cells, Fresh cells in NSS และ Lyophilized cells (รายละเอียดในการทดลองข้อ 6) ก่อนที่จะนำ *Bacillus* S11 มาผสมในอาหารกุ้งได้นับจำนวน *Bacillus* S11 ทั้งหมดในรูป Fresh cells, Fresh cells in NSS และ Lyophilized cells ได้จำนวน 3.0×10^{13} cfu/g, 3.4×10^{10} cfu/ml และ 5.0×10^{12} cfu/g ตามลำดับ เมื่อนำมาผสมในอาหารกุ้งในอัตราส่วนต่างๆ (น้ำหนักเซลล์ : อาหาร) ในหน่วยกรัม ผลในตารางที่ 10 ในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้อัตราส่วน 1:3 เพราะเมื่อใช้อัตราส่วน 1:4 จำนวน *Bacillus* S11 ที่นับได้ในอาหารจะเริ่มลดลง เมื่อสังเกตจากอาหารจะเห็นว่าเม็ดอาหารจะแห้งเพราะ *Bacillus* S11 ที่คลุกในอาหารมีน้อยกว่าจำนวนเม็ดอาหารทำให้เซลล์ไม่สามารถซึมเข้าสู่เม็ดอาหารได้ตลอดเม็ดอาหาร และสาเหตุที่ไม่เลือกใช้อัตราส่วน 1:1 และ 1:2

เพราะ *Bacillus* S11 ที่คลุกในอาหารมีใกล้เคียงกับจำนวนเม็ดอาหาร ทำให้เซลล์ซึมเข้าสู่เม็ดอาหารจนเม็ดอาหารมีลักษณะเปียก จนเม็ดอาหารไม่สามารถคงรูปเดิมได้ เมื่อนำไปเลี้ยงกุ้งจะทำให้กุ้งกินอาหารได้ยากเพราะเม็ดอาหารจะแตกละเอียด และที่เลือกใช้อัตราส่วน 1:3 เพราะเป็นอัตราส่วนที่พอดีเมื่อคลุก *Bacillus* S11 กับอาหารแล้วลักษณะเม็ดอาหารจะคงลักษณะเดิม ทำให้กุ้งสามารถแทะกินได้ และ *Bacillus* S11 จะซึมเข้าสู่อาหารได้หมด เมื่อตรวจสอบจำนวน *Bacillus* S11 จะเห็นว่ามีจำนวนใกล้เคียงกับอัตราส่วน 1:1 และ 1:2 และเป็นการประหยัดอาหารกุ้งกุลาดำได้ เพราะใช้เพียงน้ำหนักเซล์ 1 กรัมต่ออาหารกุ้ง 3 กรัม จะได้อาหารกุ้งที่มีจำนวน *Bacillus* S11 ประมาณ 10^{10} cfu/g และที่ใช้จำนวนเซลล์นี้คือเพื่อที่จะรักษาจำนวนแบคทีเรียในทางเดินอาหารกุ้งให้อยู่ในระดับประมาณ 10^{6}-10^{7} cfu/g ซึ่งเป็นจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในทางเดินอาหารกุ้งที่ Yuthachit และคณะ (1990) ได้รายงานไว้

การเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ กุ้งกุลาดำที่ใช้ในการทดลองจะใช้ขนาด พี 30 นำมาเลี้ยงในบ่อซีเมนต์ขนาด 80x74x87 ลูกบาศก์เซนติเมตร สภาพบ่อที่ใช้ในการเลี้ยงจะเป็นระบบน้ำหมุนเวียนแบบปิด (Closed recirculating water system) (Menasveta และคณะ, 1989) คือมีบ่อเลี้ยงกุ้ง และบ่อที่ใช้เป็นบ่อกรองโดยกระบวนการทางชีวภาพประกอบด้วย ทราย หิน หอย และแบคทีเรียที่สามารถใช้สารประกอบไนโตรเจนได้จะเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติภายหลังจากที่มีการเลี้ยงกุ้ง การใช้ระบบนี้มีประโยชน์คือสามารถควบคุมคุณภาพน้ำให้เหมาะสมต่อการเลี้ยงกุ้ง โดยระบบปิดนี้จะสามารถลดปริมาณสารอินทรีย์ที่อยู่ในน้ำ แอมโมเนียม ไนไตรท์ ไนเตรท และฟอสเฟตให้อยู่ในภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงกุ้ง เป็นการป้องกันโรคติดเชื้อจากการเปลี่ยนถ่ายน้ำได้ เนื่องจากระบบจะไม่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำตลอดการเลี้ยง จึงเป็นการรักษาสภาพแวดล้อมได้อย่างดี การเลี้ยงกุ้งกุลาดำด้วยอาหารที่ผสม *Bacillus* S11 ที่มีสมบัติเป็นโพรไบโอติก ได้ศึกษาน้ำหนัก ความยาวที่เพิ่มขึ้นและอัตราการรอด พบว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับ *Bacillus* S11 ในรูปแบบต่างๆ จะมีการเจริญเติบโตได้ดีกว่ากุ้งที่ไม่ได้รับ *Bacillus* S11 เมื่อนำผลมาทดสอบค่าทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ 0.05 จากรูปที่ 10 จะเห็นว่าในช่วง 21 วันน้ำหนัก ความยาว และอัตรารอดจะใกล้เคียงกันทุกการทดลอง เมื่อถึงวันที่ 42 กลุ่ม Fresh cells จะมีการเจริญเติบโตมากกว่ากลุ่ม Control อย่างชัดเจน และเมื่อถึงวันที่ 63 จนสิ้นสุดการทดลอง ทุกกลุ่มการทดลองที่ได้รับ *Bacillus* S11 จะเจริญเติบโตและอัตราการรอดมากกว่ากลุ่ม Control แสดงว่า *Bacillus* S11 น่าจะมีผลช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของของกุ้งกุลาดำได้ ซึ่งกลไกการทำงานควรจะต้องมีการศึกษากันอย่างละเอียดต่อไป จากการทดลองจะเห็นได้ว่ากลุ่มที่ได้รับ Fresh cells มีการเจริญเติบโตดีที่สุด เพราะกลุ่มนี้จะได้รับเซลล์ของ *Bacillus* S11 คลุกกับอาหาร เมื่อกุ้งกิน *Bacillus* S11จะเข้าสู่ทางเดินอาหารกุ้งได้โดยตรง แต่กลุ่ม Fresh cells in NSS มีการเจริญเติบโตช้ากว่าเพราะ

Bacillus S11 ที่กุ้งได้รับนั้นจะละลายอยู่ใน 0.85% NaCl และนำไปใส่ในน้ำ ดังนั้นกุ้งจะได้รับ *Bacillus* S11 ช้าเพราะกุ้งจะได้รับเซลล์ผ่านน้ำเข้าไปสู่ทางเดินอาหาร ส่วนกลุ่ม Lyophilized cells จะได้รับ *Bacillus* S11ในรูปที่เป็นผงแห้งคลุกในอาหาร จะมีการเจริญเติบโตช้ากว่ากลุ่ม Fresh cells แต่จะเร็วกว่า Fresh cells in NSS เพราะ *Bacillus* S11 เมื่อนำมาทำ Lyophilization เพื่อให้อยู่ในรูปผงแห้ง จะทำให้เซลล์เปลี่ยนสภาพไปอยู่ในรูปของสปอร์ เมื่อผสมในอาหารให้กุ้งกิน กุ้งจะได้รับ *Bacillus* S11 ในรูปของสปอร์ที่จะเข้าไปเกาะในทางเดินอาหาร (Gibson และ Gordon, 1974) ทำให้การทำงานของเซลล์เกิดขึ้นได้ช้ากว่าเซลล์ปกติ ดังนั้นน่าจะเป็นสาเหตุให้กลุ่มนี้มีการเจริญเติบโตช้ากว่ากลุ่ม Fresh cells

ได้ศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียในการเลี้ยงกุ้ง โดยการนำน้ำเลี้ยงกุ้งมาตรวจดูจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด *Bacillus* S11 และ *Vibrio* sp. พบว่าในกลุ่ม Control เป็นกลุ่มที่ไม่ได้รับ *Bacillus* S11 ในช่วง 21 วัน จะมีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด 10^4 cfu/ml และจะเพิ่มขึ้นเมื่อถึงวันที่ 42 ตลอดจนสิ้นสุดการทดลอง และจะพบว่ามี *Vibrio* sp. อยู่ในปริมาณที่สูงมากประมาณ 10^2-10^6 cfu/ml ใกล้เคียงกับรายงายของ กุลวรา แสงรุ่งเรือง (2534) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ *Vibrio* sp. ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำในบ่อดิน พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วง $0.65x10^2$-$1.22x10^4$ cfu/ml สาเหตุที่พบ *Vibrio* sp. มีในปริมาณที่สูงมากเพราะในน้ำทะเลที่ใช้ในการเลี้ยงจะมี *Vibrio* sp. เป็นแบคทีเรียประจำถิ่น (ลิลา เรืองแป้น และคณะ, 2528) เมื่อนับจำนวนแบคทีเรีย ในลำตัว ทางเดินอาหารและขี้กุ้ง จะพบ *Vibrio* sp. มากกว่าแบคทีเรียชนิดอื่น จากการศึกษาพบว่ามีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดสูงมากเนื่องมาจากระบบการเลี้ยงในการทดลองเป็นระบบปิดไม่มีการถ่ายเทน้ำ มีปริมาณสารอินทรีย์อยู่มากทำให้เป็นแหล่งสำหรับการเจริญของแบคทีเรียต่างๆได้เป็นอย่างดี และในบ่อ Control มีการตรวจพบ *Bacillus* sp. อยู่เนื่องจาก *Bacillus* sp. ได้ตรวจพบในอาหารกุ้ง เมื่อตรวจนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด *Bacillus* S11 และ *Vibrio* sp. ในกลุ่มที่ได้รับ *Bacillus* S11 ในรูป Fresh cells, Fresh cells in NSS และ Lyophilized cells ในน้ำเลี้ยงกุ้งจะพบว่าตั้งแต่วันที่ 21 จนสิ้นสุดการทดลองจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด ที่พบส่วนมากจะเป็น *Bacillus* S11 แสดงว่า *Bacillus* S11 ที่ผสมในอาหารและในน้ำสามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ตลอดการทดลอง จำนวน *Vibrio* sp. ที่นับได้ตลอดการทดลองมีจำนวนใกล้เคียงกันกับจำนวน *Vibrio* sp. เริ่มต้น แสดงว่า *Bacillus* S11 ที่เติมลงในอาหารกุ้งและในน้ำจะมีผลไปยับยั้งการเจริญของ *Vibrio* sp. ได้ และเป็นการพิสูจน์ได้ว่าในบ่อเลี้ยงกุ้ง *Bacillus* S11 สามารถที่จะดำรงชีวิตอยู่ร่วมกับแบคทีเรียชนิดอื่นได้โดยไม่เป็นอันตรายต่อตัวกุ้ง เมื่อตรวจนับจำนวนแบคทีเรียในลำตัวกุ้ง คือส่วนลำตัวรวมทั้งเปลือกกุ้งด้วย จะพบ *Bacillus* S11 ใกล้เคียงกับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด เหตุผลที่พบ *Bacillus* S11 ในลำตัวกุ้งเพราะ *Bacillus* S11 ที่ใช้ในการเลี้ยงกุ้งจะอยู่ในน้ำและตัวกุ้งจะมีการ

สัมผัสกับน้ำตลอดเวลา ส่วนในทางเดินอาหารจะเห็นได้ชัดเจนว่า *Bacillus* S11 สามารถที่จะเข้าไปเจริญและตั้งรกรากแทนแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นในทางเดินอาหารกุ้งได้ เพราะเมื่อนับจำนวนแบคทีเรียจะพบ *Bacillus* S11 ในจำนวนที่ใกล้เคียงกับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และจะพบ *Vibrio* sp. ในจำนวนที่น้อยมากเมื่อเทียบกับกลุ่ม Control จะพบว่ามีจำนวนประมาณ 10^2 cfu/g ในกลุ่ม Fresh cells จะตรวจพบ *Bacillus* S11 ได้เร็วกว่าในกลุ่มที่ได้รับ Fresh cells in NSS และ Lyophilized cells คือจะพบ *Bacillus* S11 ในจำนวนที่ใกล้เคียงกับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดตั้งแต่วันที่ 42 ของการทดลอง แต่อีก 2 กลุ่มจะพบ *Bacillus* S11 ได้สูงเมื่อวันที่ 63 ของการทดลอง แสดงว่า *Bacillus* S11 สามารถเจริญ และเข้าไปเกาะอยู่ในทางเดินอาหารเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในทางเดินอาหารกุ้งได้ พบว่ามีจำนวน 10^6-10^7 cfu/g ใกล้เคียงกับจำนวนแบคทีเรียประจำถิ่นในกุ้งกุลาดำที่มีรายงานไว้ เพื่อเป็นการยืนยันว่า *Bacillus* S11 สามารถเข้าไปอาศัยอยู่ในทางเดินอาหารกุ้งได้คือ การนำขี้กุ้งมาตรวจนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด *Bacillus* S11 และ *Vibrio* sp. ผลการตรวจนับพบ *Bacillus* S11 ในขี้กุ้งเป็นจำนวนมาก ในทุกกลุ่มการทดลองที่ได้รับ *Bacillus* S11 แต่ในกลุ่ม Control จะพบแต่ *Vibrio* sp. ในขี้กุ้ง แสดงว่าในทางเดินอาหารกลุ่ม Control มีแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* sp. เป็นแบคทีเรียประจำถิ่น

นอกจาก *Bacillus* S11 และ *Vibrio* sp. ที่ตรวจพบในการทดลอง สามารถแยกแบคทีเรียชนิดอื่นได้จากน้ำ ลำตัว ทางเดินอาหาร และขี้กุ้งได้ เมื่อนำมาตรวจสอบสมบัติ รูปร่าง ลักษณะ พบว่าจัดอยู่ในกลุ่มของ *Aeromonas* sp., *Staphylococcus* sp. และ *Bacillus* sp. สายพันธุ์อื่นที่แตกต่างจาก *Bacillus* S11 แบคทีเรียกลุ่ม *Aeromonas* sp. เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในน้ำทะเลแต่จะพบได้น้อย *Staphylococcus* sp. พบเนื่องจากการปนเปื้อนจากมือในขณะทำการทดลอง ส่วน *Bacillus* sp. สายพันธุ์อื่นที่แตกต่างจาก *Bacillus* S11 อาจเนื่องจากอาหารกุ้งกุลาดำที่ตรวจพบว่ามี *Bacillus* sp. ปนเปื้อนอยู่ และได้ตรวจสอบ *Bacillus* S11 ที่แยกได้จากน้ำ ลำตัว ทางเดินอาหาร และขี้กุ้ง พบว่าเป็นสายพันธุ์เดียวกับที่ใช้ในการทดลอง เมื่อนำมาตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบได้ผลเหมือนเดิมทุกประการ

ตรวจสอบคุณภาพน้ำระหว่างการเลี้ยงกุ้งกุลาดำในระบบหมุนเวียนแบบปิดระหว่างการเลี้ยงด้วยอาหารที่ผสม *Bacillus* S11 สามารถวัด พีเอช ค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำ อุณหภูมิ และความเค็ม ได้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ และค่าแอมโมเนียม ไนไตรท์ ไนเตรท และฟอสเฟต จะอยู่ในค่าที่ยอมรับได้ของการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ คุณภาพน้ำที่วัดได้จะใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Menasveta และคณะ (1991) จากรูปที่ 16 จะเห็นว่าในช่วงสัปดาห์แรกของการเลี้ยงกุ้งปริมาณไนไตรท์ที่วัดได้จะมีค่าสูงมาก แต่เมื่อระบบการเลี้ยงเข้าสู่สมดุลย์

คือในบ่อกรองที่มีส่วนประกอบเป็นพวก ทราย หิน และหอย เริ่มมีแบคทีเรียในกลุ่มของ Nitrifying bacteria เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ แบคทีเรียกลุ่มนี้จะสามารถใช้สารประกอบไนโตรเจนได้ทำให้สลายตัวได้เป็นไนเตรท ที่มีความเป็นพิษน้อยกว่าแอมโมเนียม และไนไตรท์ (Menasveta และคณะ, 1989) ทำให้แอมโมเนียม และไนไตรท์ที่วัดได้มีค่าอยู่ในระดับที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงกุ้ง

ทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค (Challenge test) โดยใช้ *Vibrio harveyi* ที่ก่อให้เกิดโรคเรืองแสงในกุ้งกุลาดำ (มณเฑียร ส่งเสริม, บัญญัติ สุขศรีงาม และปภาศิริ ศรีโสภาภรณ์, 2533) เป็นระยะเวลา 10 วัน โดยวิธีการแช่ (Immersion) จำนวนที่ใช้คือ $3.0x10^5$ cfu/ml (จันทนา นิธิเมธาโชค, 2539) พบว่ากุ้งในกลุ่มที่ได้รับ *Bacillus* S11 จะมีอัตราการรอด 100% ตลอดการทดลอง ส่วนกลุ่ม Control จะมีอัตราการรอด 26% เมื่อทดสอบทางสถิติพบว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ 0.05 และนำมาศึกษาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด *Bacillus* S11 และ *Vibrio harveyi* ในน้ำและทางเดินอาหาร พบว่าในกลุ่มที่ได้รับ *Bacillus* S11 พบว่า *V. harveyi* ที่เติมลงไปในบ่อจะมีจำนวนลดลงและไม่สามารถทำให้กุ้งในกลุ่มนี้เกิดเป็นโรคได้ ดังนั้นในวันที่ 7 ของการทดลองได้เติม *V. harveyi* จำนวน $3.0x10^7$ cfu/ml เพื่อทำให้กุ้งได้รับเชื้อเพิ่มขึ้น แต่ในกลุ่มที่ได้รับ *Bacillus* S11 พบว่า *V. harveyi* ที่เติมลงไปจะเริ่มลดลง แสดงว่า *V. harveyi* ไม่สามารถที่จะทำให้กุ้งในกลุ่มที่ได้รับ *Bacillus* S11 ที่มีสมบัติเป็นโพรไบโอติกเกิดโรคได้ และ *Bacillus* S11 สามารถที่จะยับยั้งการเจริญของ *V. harveyi* ได้ เมื่อนำกุ้งมาตรวจการติดเชื้อภายนอกพบว่าไม่มีอาการที่แสดงว่าเกิดการติดโรคเรืองแสงในกุ้ง นำทางเดินอาหารมานับจำนวนแบคทีเรีย พบว่ามีจำนวน *Bacillus* S11 อยู่สูงมาก จะพบ *V. harveyi* มีจำนวนอยู่น้อยมากประมาณ 10^2 cfu/g เป็นจำนวนที่ไม่สามารถก่อให้เกิดโรคได้ เพราะ *Vibrio* sp. ที่ทำให้เกิดโรคในกุ้งกุลาดำได้จะมีจำนวนประมาณ 10^5 cfu/g ขึ้นไป จะเกิดโรคได้เมื่อคุณภาพน้ำอยู่ในสภาพที่ไม่เหมาะสม (กุลวรา แสงรุ่งเรือง, 2534) แต่ในกลุ่ม Control พบกุ้งกุลาดำตายตั้งแต่วันที่ 2 ของการทดลองและทยอยตายขึ้นเรื่อยๆ พบว่ามีจำนวน *V. harveyi* มากเกินกว่า 10^5 cfu/ml ในน้ำ นำกุ้งที่ตายระหว่างการทดลองมาแยกแบคทีเรียจากทางเดินอาหาร พบ *V. harveyi* ถึง 10^5 cfu/g เป็นจำนวนที่ทำให้กุ้งเกิดโรคได้ (กุลวรา แสงรุ่งเรือง, 2534) และนำแบคทีเรียที่แยกได้จากทางเดินอาหารมาทดสอบสมบัติ รูปร่าง ลักษณะพบว่าเป็น *V. harveyi* ชนิดเดียวกับที่ใช้ในการทดลอง จำแนกตาม Bergey 's Mannual of Systematic Bacteriology (Baumann และ Schubert, 1986) นำกุ้งที่ตายมาศึกษาลักษณะภายนอกจะพบว่ากุ้งในบ่อ Control ที่ติดเชื้อ *V. harveyi* จะมีอาการอ่อนเพลีย ไม่กินอาหาร จะเห็นว่าในบ่อมีปริมาณอาหารเหลืออยู่มาก กุ้งจะว่ายน้ำอยู่ บริเวณผิวหน้า ตัวกุ้งเริ่มมีสีแดง กล้ามเนื้อเป็นแผล และตอนกลางคืนจะเห็นกุ้งเป็นจุดสีเขียวๆลอยอยู่ในน้ำ เมื่อสังเกต

จากบริเวณตับจะมีสีคล้ำลงและมีขนาดเล็กกว่ากุ้งจากบ่อที่ได้รับ *Bacillus* S11 สอดคล้องกับรายงานของ พรเลิศ จันทร์รัชชกูล และคณะ (2537)

จากการคัดเลือก *Bacillus* S11 ที่แยกได้จากทางเดินอาหารกุ้ง มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบที่ก่อโรคในคนและกุ้งได้ เมื่อนำมาใช้ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ สามารถที่จะเจริญและมีชีวิตอยู่ในทางเดินอาหารกุ้งได้ ไม่ก่อให้เกิดโรคในกุ้ง มีความคงทนในการเก็บรักษาขณะทำการทดลอง ทำให้เกิดประโยชน์ต่อกุ้งคือจะไปเพิ่มการเจริญเติบโตและต้านทานการเกิดโรคในกุ้ง จัดเป็นลักษณะที่ดีของโพรไบโอติก (Fuller, 1989) ดังนั้นจึงสามารถใช้ *Bacillus* S11 เสริมในอาหารกุ้งกุลาดำได้เพื่อให้กุ้งแข็งแรง มีภูมิต้านทานโรค และสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งกุลาดำได้ เพื่อทดแทนสินค้าจุลินทรีย์นำเข้าจากต่างประเทศที่มีราคาแพงประมาณ 1,000-5,000 บาทต่อกิโลกรัม เนื่องจากจุลินทรีย์เป็นที่ต้องการของเกษตรกรเป็นอย่างมาก และจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้จากต่างประเทศ ไม่เหมาะที่จะนำมาใช้กับกุ้งกุลาดำที่เพาะเลี้ยงในประเทศไทย และจากการที่ *Bacillus* S11 เป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากกุ้งกุลาดำในประเทศไทยจึงมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นโพรไบโอติกเสริมในอาหารกุ้งกุลาดำ เพื่อให้อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำพัฒนาได้ต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย