บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การเลี้ยงกุ้งกุลาดำครั้งที่ 1

ผลของโพรไบโอติกต่อการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ

ทำการเลี้ยงกุ้งกุลาดำเป็นระยะเวลา 100 วัน โดยแบ่งการทดลองเป็น 2 กลุ่ม (กลุ่มละ 1 บ่อ) คือ

กลุ่มควบคุม ให้อาหารกุ้งกุลาดำสำเร็จรูป โดยไม่ผสม *Bacillus* S11

กลุ่มโพรไบโอติก ให้อาหารกุ้งกุลาดำสำเร็จรูปผสม *Bacillus* S11 ทุกวันวันละ 1 มื้อ

ทำการตรวจสอบแบคทีเรียทั้งหมดในอาหารกุ้งกุลาดำก่อนนำไปใช้ในการเลี้ยงกุ้ง พบว่าอาหารกุ้งกุลาดำปกติมีจำนวนแบคทีเรีย $1.5x10^2$ CFU/g และตรวจไม่พบ *Bacillus* S11 กับ *Vibrio* spp. ส่วนอาหารกุ้งกุลาดำที่ผสม *Bacillus* S11 ตรวจพบ *Bacillus* S11 ปริมาณ 9.8 x 10^9 CFU/g โดยที่ *Bacillus* S11 จะลดลงประมาณ 1 log cycle เมื่อเก็บที่ 4^0ซ เป็นเวลา 28 วัน (อาหรกุ้งผสม *Bacillus* S11 จะทำการเตรียมและใช้หมดภายใน 7 วัน) และตรวจไม่พบ *Vibrio* spp. (ตารางที่ 3)

เลี้ยงกุ้งกุลาดำระยะโพสลาวา 24 (PL24) จำนวน 40,000 ตัวต่อบ่อ ในบ่อดินขนาด 1,000 ตร.ม. ติดตามผลการเจริญของกุ้งกุลาดำ พบว่ามีความแตกต่างของน้ำหนักกุ้งกุลาดำเฉลี่ยโดยกุ้งกลุ่มที่ให้อาหารกุ้งผสม *Bacillus* S11 มีน้ำหนักมากกว่ากลุ่มควบคุมตั้งแต่วันที่ 30 ของการเลี้ยง (รูปที่ 1) คุณภาพน้ำของทั้ง 2 กลุ่มมีค่าใกล้เคียงกันและอยู่ในช่วงเกณฑ์ปกติที่ปลอดภัยสำหรับการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (ตารางที่ 4)

ผลการติดตามปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด *Bacillus* S11 และ *Vibrio* spp. ในน้ำเลี้ยงกุ้ง (รูปที่ 2) ดินตะกอนในบ่อเลี้ยงกุ้ง (รูปที่ 3) และลำไส้กุ้ง (รูปที่ 4) จากทั้ง 2 กลุ่มการทดลองพบว่าในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำตรวจพบแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง $1.33x10^4$-$8.88x10^4$ CFU/ml และตรวจพบ *Vibrio* spp. อยู่ในช่วง $7.50x10^1$-$2.25x10^3$ CFU/ml (รูปที่ 2) ดินตะกอนจากบ่อเลี้ยงกุ้งมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง $2.67x10^6$-$7.0x10^7$ CFU/g และ *Vibrio* spp. อยู่ในช่วง

$6.00x10^{2}$-$4.67x10^{4}$ CFU/g (รูปที่ 3) ส่วนในลำไส้ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่ตรวจพบอยู่ในช่วง $5.68x10^{5}$-$5.27x10^{8}$ CFU/g และ *Vibrio* spp. อยู่ในช่วง $2.67x10^{3}$-$8.71x10^{5}$ CFU/g (รูปที่ 4) และตรวจพบ *Bacillus* S11 ในกลุ่มที่ให้อาหารผสม *Bacillus* S11 และตรวจไม่พบในกลุ่มควบคุม

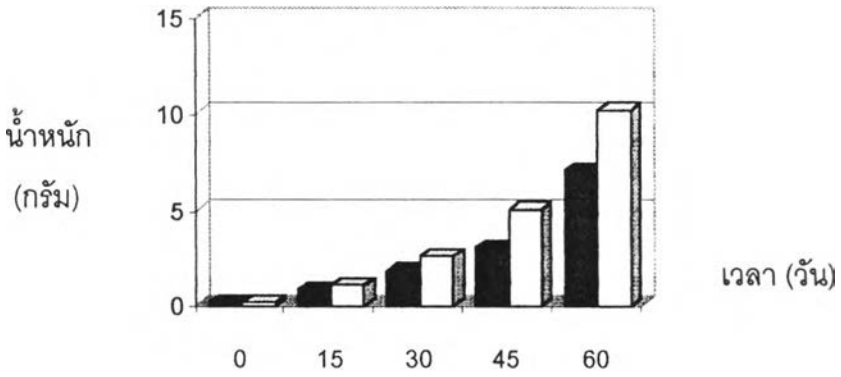
ในวันที่ 60 ของการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำในบ่อควบคุมเริ่มตายด้วยโรคตัวแดงดวงขาวจากไวรัสจนหมดบ่อ ส่วนกุ้งในบ่อที่ให้อาหารผสมโพรไบโอติกพบการตายด้วยโรคตัวแดงดวงขาวในวันที่ 70 ของการเพาะเลี้ยงเช่นกันและทยอยตายเรื่อยๆจนหมดบ่อภายในวันที่ 75 ของการเพาะเลี้ยง

ตารางที่ 3. ปริมาณ *Bacillus* S11 (CFU/g) **ในอาหารกุ้งกุลาดำระหว่างการเก็บที่** 4^{0}**ซ เป็นระยะเวลา 28 วัน**

ชนิดอาหาร	ปริมาณ *Bacillus* S11 (CFU/g)				
	0 วัน	7 วัน	14 วัน	21 วัน	28 วัน
อาหารเม็ดสำเร็จรูป	-	-	-	-	-
อาหารเม็ดสำเร็จรูป ผสม *Bacillus* S11	$9.8x10^{9}$	$7.6x10^{9}$	$5.4x10^{9}$	$3.1x10^{9}$	$5.2x10^{8}$

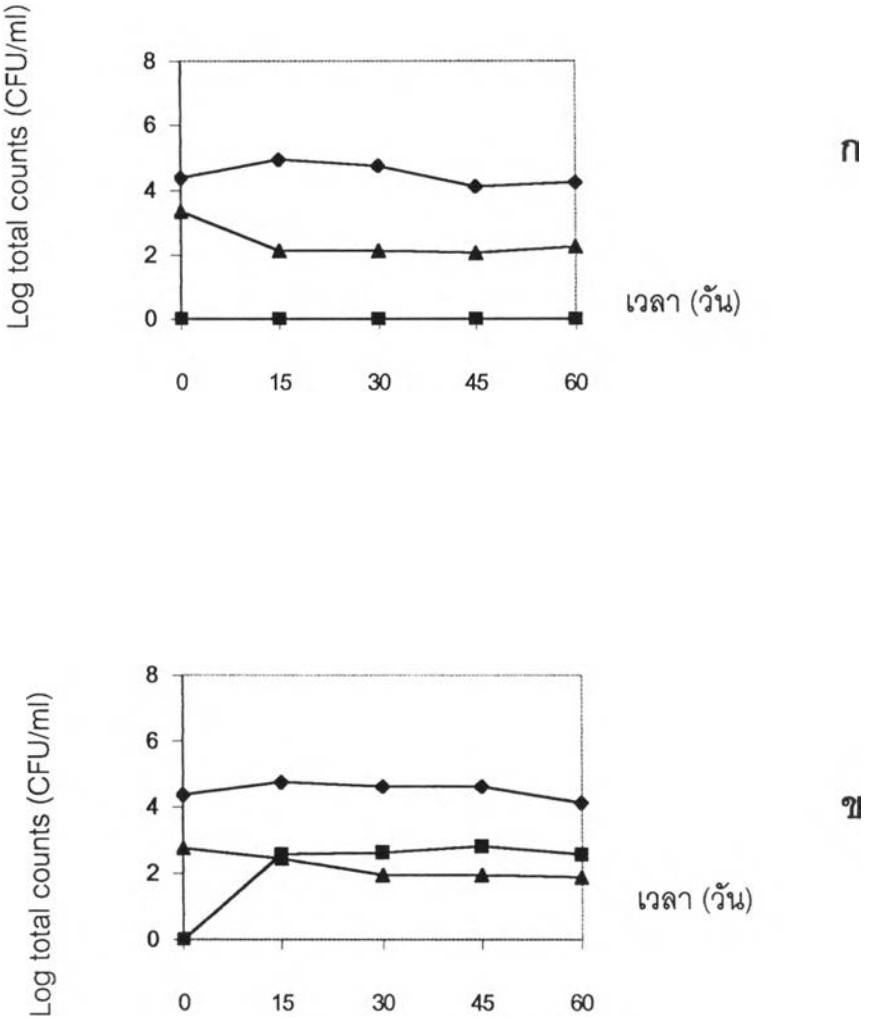
ตารางที่ 4. คุณภาพน้ำระหว่างการเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 1 เป็นระยะเวลา 60 วัน (ตรวจสอบทุก 15 วัน)

คุณภาพน้ำ	ช่วงค่าคุณภาพน้ำ (ต่ำสุด-สูงสุด)	
	บ่อควบคุม	บ่อโพรไบโอติก
แอมโมเนียม (มก./ลิตร)	0 - 0.25	0 – 0.16
ไนไตรท์ (มก./ลิตร)	0 – 0.15	0 – 0.03
ฟอสเฟต (มก./ลิตร)	0 - 0.12	0 – 0.12
อุณหภูมิ (^{0}ซ)	29.5 – 31.5	29.8 – 31.5
พีเอช	7.50 - 8.02	7.68 – 8.20
ความเค็ม (ส่วนในพันส่วน)	3 – 4	3 – 4
ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (มก./ลิตร)	6.5 – 7.6	6.4 – 7.8



กลุ่มควบคุม (■) กลุ่มโพรไบโอติก (□)

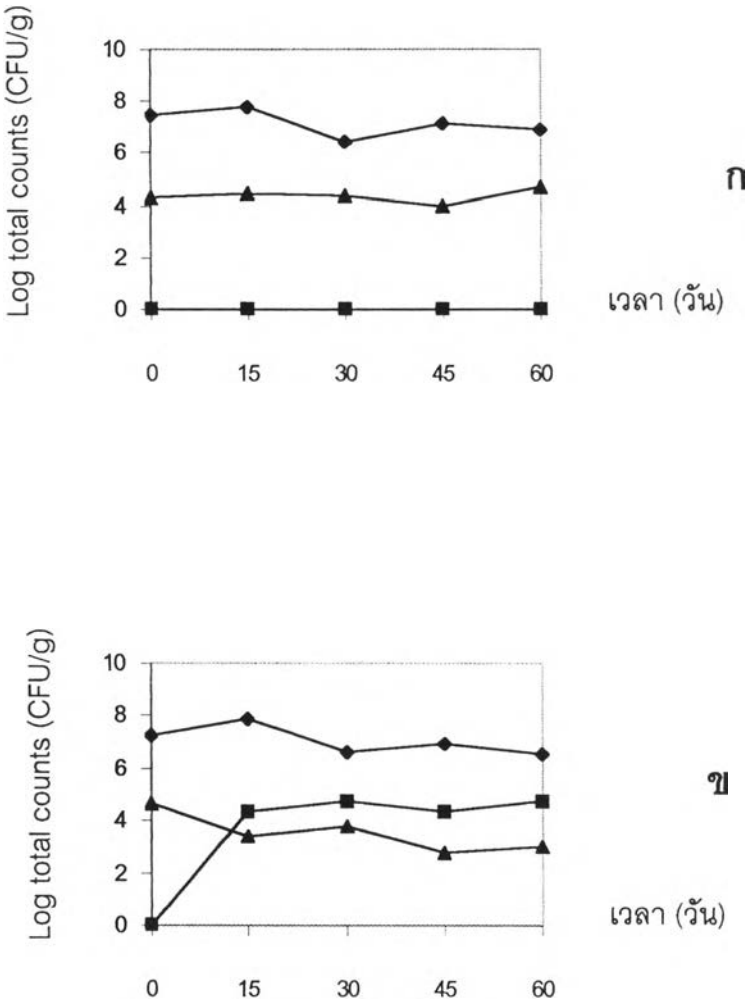
รูปที่ 1. น้ำหนักตัวของกุ้งกุลาดำ กลุ่มควบคุมและกลุ่มโพรไบโอติก ระหว่างการเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 1



กลุ่มควบคุม (ก) กลุ่มโพรไบโอติก (ข)

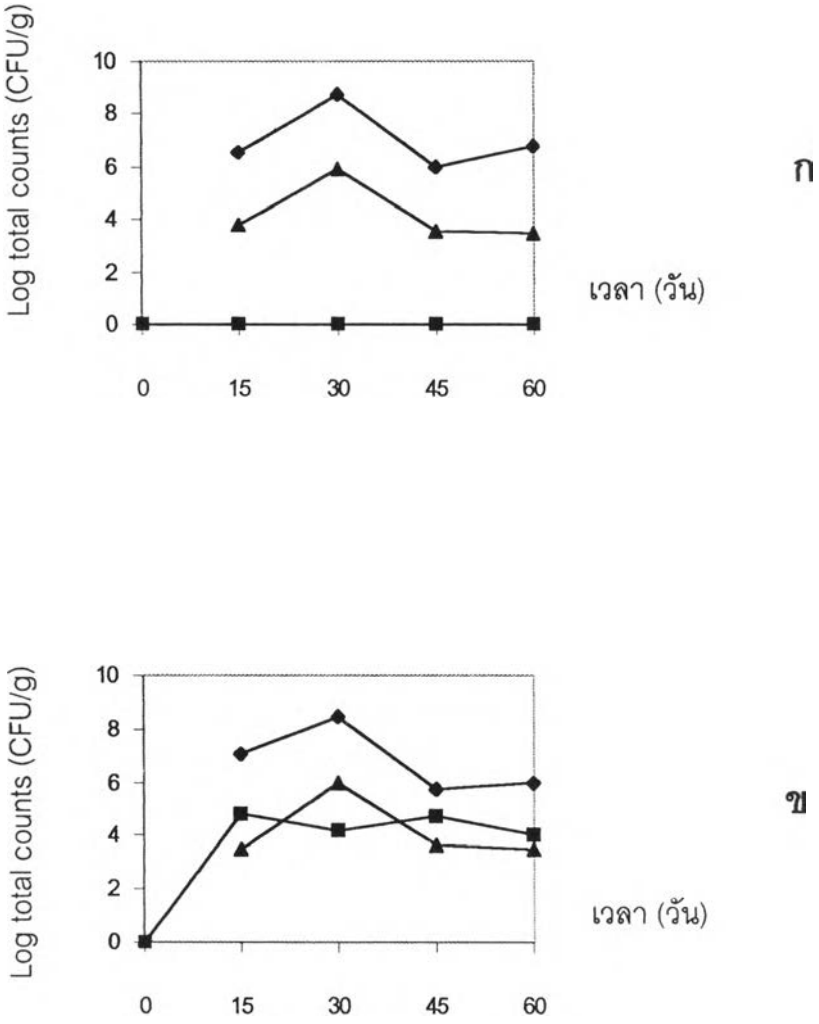
รูปที่ 2. จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (-◆-) *Bacillus* S11 (-■-) และ *Vibrio* spp. (-▲-)ในน้ำเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำระหว่างการเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 1.
แต่ละจุดเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 9 ซ้ำ

I 20604555



กลุ่มควบคุม (ก) กลุ่มโพรไบโอติก (ข)

รูปที่ 3. จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (-◆-) *Bacillus* S11 (-■-) และ *Vibrio* spp. (-▲-) ในตะกอนดิน ในบ่อกุ้งกุลาดำระหว่างการเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 1
แต่ละจุดเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 9 ซ้ำ



กลุ่มควบคุม (ก) กลุ่มโพรไบโอติก (ข)

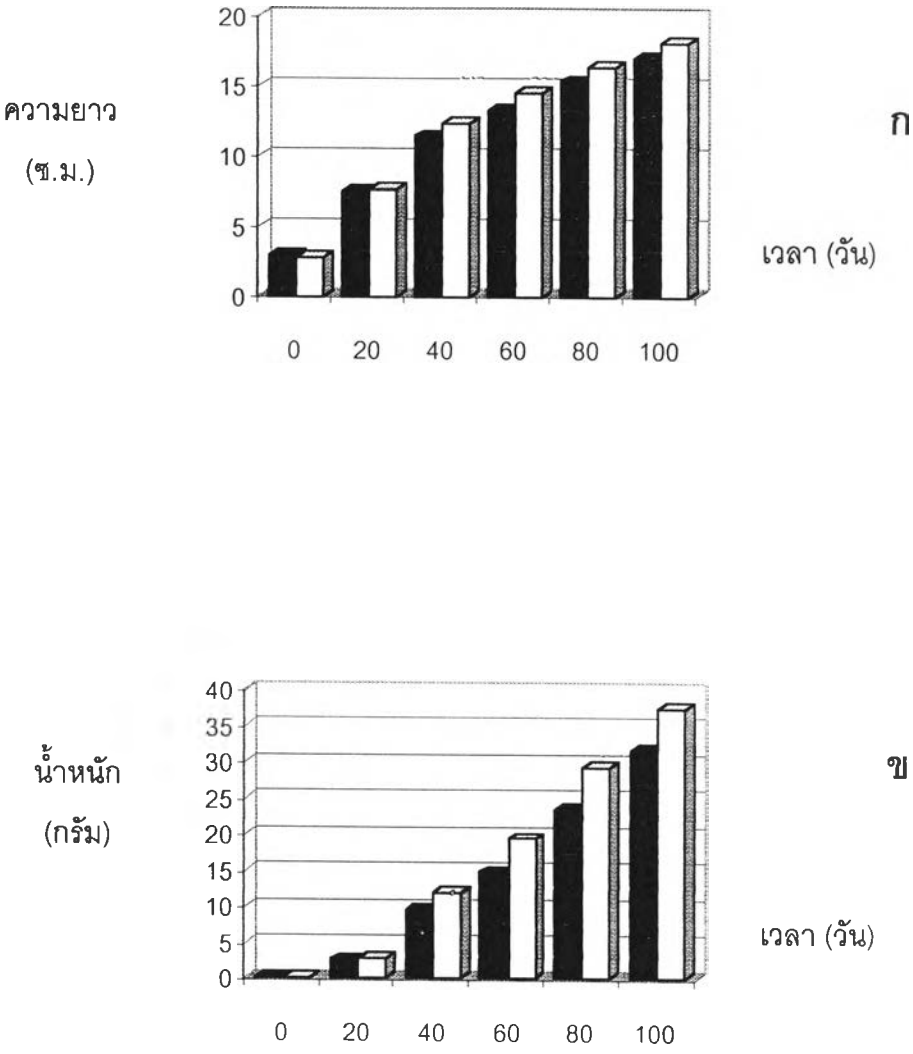
รูปที่ 4. จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (-◆-) *Bacillus* S11 (-■-) และ *Vibrio* spp. (-▲-) ในลำไส้กุ้งกุลาดำระหว่างการเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 1.
แต่ละจุดเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 9 ซ้ำ

2. การเลี้ยงกุ้งกุลาดำครั้งที่ 2

2.1 ผลของโพรไบโอติกต่อการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ

ใช้บ่อดิน 2 บ่อขนาดเดียวกันกับการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำครั้งที่ 1 โดยทั้ง 2 บ่อจะให้อาหารผสมโพรไบโอติก *Bacillus* S11 เหมือนกัน เลี้ยงกุ้งระยะโพสลาวา 24 (PL24) จำนวน 30,000 ตัวต่อบ่อ ติดตามผลการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำพบว่า น้ำหนักและความยาวของกุ้งกุลาดำในบ่อที่ 2 มากกว่ากุ้งกุลาดำที่เสริมโพรไบโอติกในบ่อที่ 1 (รูปที่ 5) โดยแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ คุณภาพน้ำของทั้ง 2 บ่อมีค่าใกล้เคียงกันและอยู่ในช่วงเกณฑ์ปกติที่ปลอดภัยสำหรับการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (ตารางที่ 2)

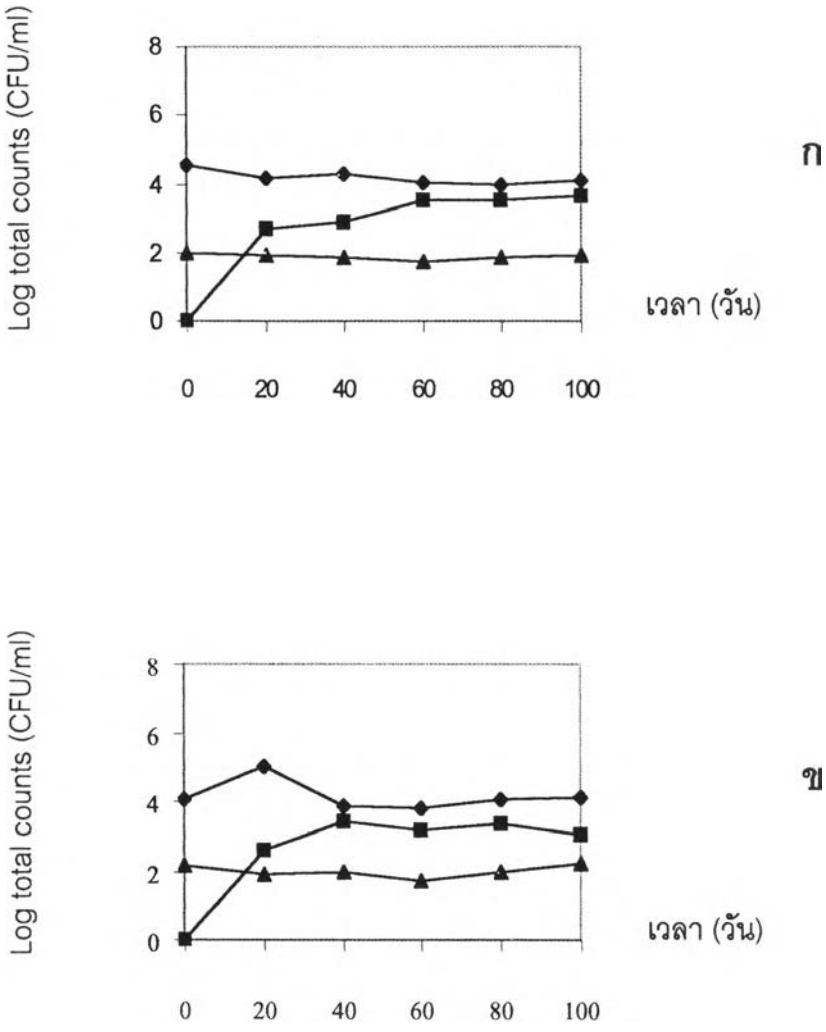
ผลการตรวจปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด *Bacillus* S11 และ *Vibrio* spp. ในน้ำเลี้ยงกุ้ง (รูปที่ 6) ดินตะกอนในบ่อกุ้ง (รูปที่ 7) และลำไส้กุ้ง (รูปที่ 8) จากทั้ง 2 บ่อ พบว่าในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำตรวจพบแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง $6.45x10^{3}$-$1.03x10^{5}$ CFU/ml และตรวจพบ *Vibrio* spp. อยู่ในช่วง $5.0x10^{1}$-$3.1x10^{2}$ CFU/ml (รูปที่ 6) ดินตะกอนจากบ่อเลี้ยงกุ้งมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง $9.2x10^{5}$-$7.87x10^{7}$ CFU/g และ *Vibrio* spp. อยู่ในช่วง $1.4x10^{3}$-$3.7x10^{4}$ CFU/g (รูปที่ 7) ส่วนในลำไส้กุ้งปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่ตรวจพบอยู่ในช่วง $3.6x10^{6}$-$3.0x10^{8}$ CFU/g และ *Vibrio* spp. อยู่ในช่วง$4.18x10^{3}$-$1.89x10^{6}$ CFU/g (รูปที่ 8) และตรวจพบ *Bacillus* S11 ในน้ำเลี้ยงกุ้งซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง $3.16x10^{2}$-$4.8x10^{3}$ CFU/ml (รูปที่ 6) ในดินตะกอนมีค่าอยู่ในช่วง $1.0x10^{5}$-$1.91x10^{6}$ CFU/g (รูปที่ 7) และในลำไส้มีค่าอยู่ในช่วง $1.3x10^{6}$-$2.56x10^{7}$ CFU/g (รูปที่ 8)



รูปที่ 5. ความยาว (ก) และน้ำหนัก (ข) ของกุ้งกุลาดำ กลุ่มโพรไบโอติกบ่อที่ 1 และกลุ่มโพรไบโอติกบ่อที่ 2 ระหว่างการเลี้ยงกุ้งกุลาดำครั้งที่ 2

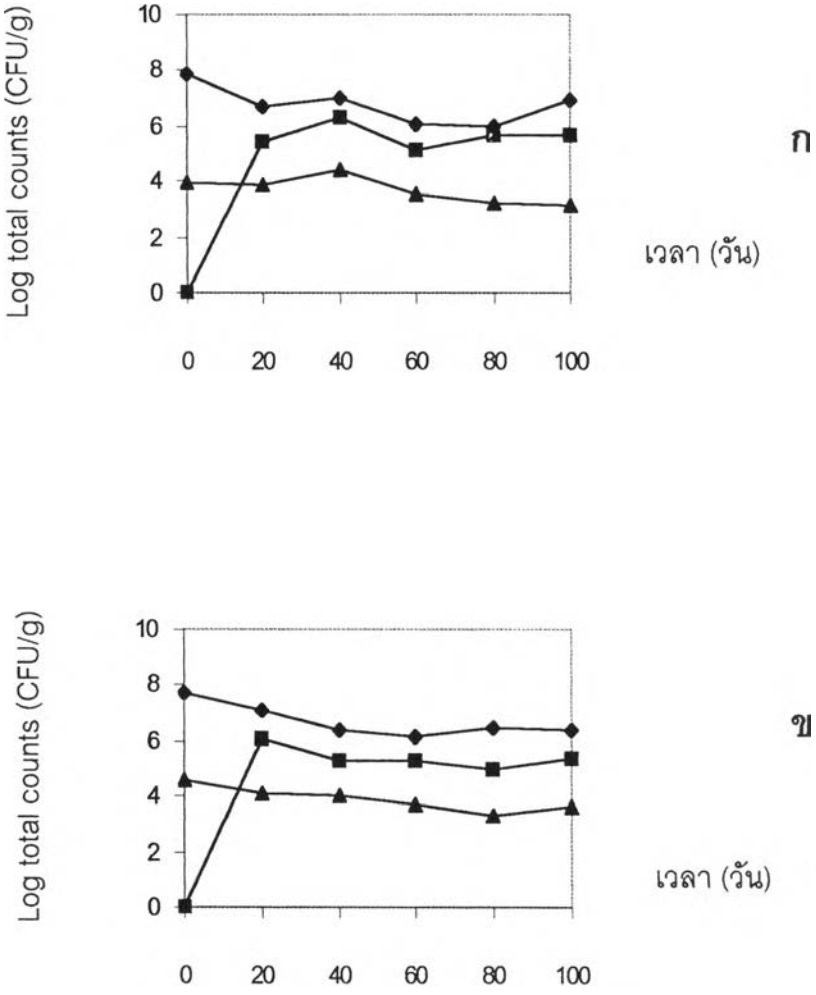
ตารางที่ 5. คุณภาพน้ำระหว่างการเลี้ยงกุ้งกุลาดำครั้งที่ 2 เป็นระยะเวลา 100 วัน (ตรวจสอบทุก 20 วัน)

คุณภาพน้ำ	ช่วงค่าคุณภาพน้ำ (ต่ำสุด-สูงสุด)	
	บ่อโพรไบโอติกที่ 1	บ่อโพรไบโอติกที่ 2
แอมโมเนียม (มก/ลิตร)	0 – 0.25	0 – 0.25
ไนไตรท์ (มก/ลิตร)	0 – 0.1	0 – 0.25
ฟอสเฟต (มก/ลิตร)	0 – 0.25	0 – 0.25
อุณหภูมิ (^{0}ซ)	29.7 – 31.2	29.5 – 31.0
พีเอช	7.9 – 8.5	7.45 – 8.40
ความเค็ม (ส่วนในพันส่วน)	3 - 4	3 - 4
อัลคาลินิตี้ (มก/ลิตร)	90 - 130	85 – 140
ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (มก/ลิตร)	6.3 – 7.9	6.5 – 8.1



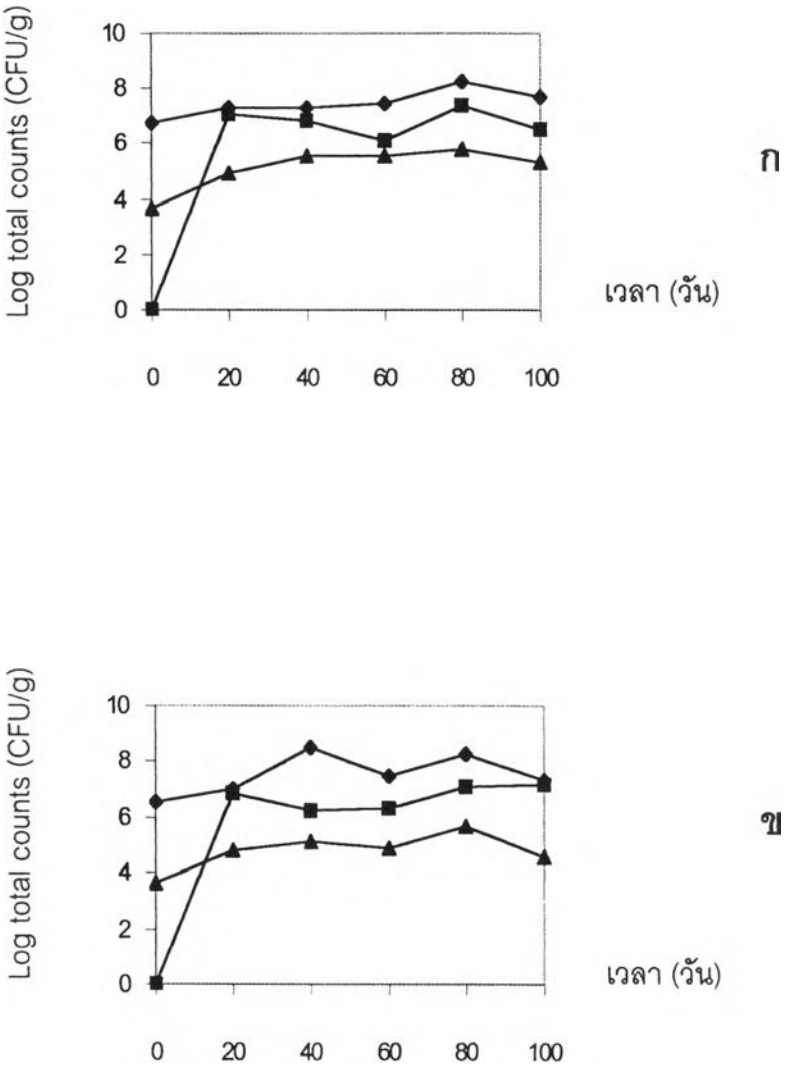
กลุ่มโพรไบโอติกบ่อที่ 1 (ก) กลุ่มโพรไบโอติกบ่อที่ 2 (ข)

รูปที่ 6. จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (-◆-) *Bacillus* S11 (-■-) และ *Vibrio* spp. (-▲-) ในน้ำเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำระหว่างการเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 2
แต่ละจุดเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 9 ซ้ำ



กลุ่มโพรไบโอติกบ่อที่ 1 (ก) กลุ่มโพรไบโอติกบ่อที่ 2 (ข)

รูปที่ 7. จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (-◆-) *Bacillus* S11 (-■-) และ *Vibrio* spp. (-▲-) ในดินตะกอนในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำระหว่างการเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 2
แต่ละจุดเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 9 ซ้ำ



กลุ่มโพรไบโอติกบ่อที่ 1 (ก) กลุ่มโพรไบโอติกบ่อที่ 2 (ข)

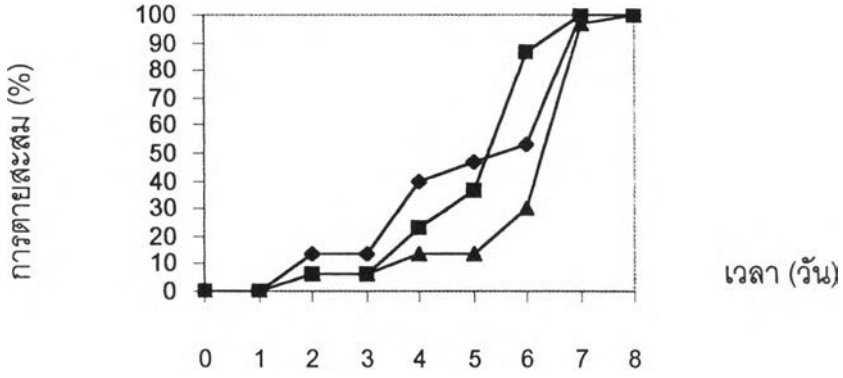
รูปที่ 8. จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (-◆-) *Bacillus* S11 (-■-) และ *Vibrio* spp. (-▲-) ในลำไส้กุ้งกุลาดำระหว่างการเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 2
แต่ละจุดเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 9 ซ้ำ

2.2 การทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค

รวบรวมกุ้งที่เหลือจากการเพาะเลี้ยง 100 วัน ในแต่ละบ่อ นำมาทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค โดยใช้ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 1526 เป็นเชื้อก่อโรค และใช้กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในสภาพปกติจากบ่อกุ้งบริเวณที่ใกล้เคียงกันและมีอายุเท่ากัน คือ โพสลาวา 125 (PL125) มาเป็นกลุ่มควบคุม หลังจากนั้นเติมเชื้อก่อโรคในน้ำเลี้ยงกุ้งจำนวน 5.30×10^7 CFU/ml พบว่า กุ้งกลุ่มที่ให้อาหารผสมโพรไบโอติกบ่อที่1 และบ่อที่ 2 มีการตายสะสมต่อเวลาช้ากว่ากุ้งกลุ่มควบคุม (รูปที่ 9)

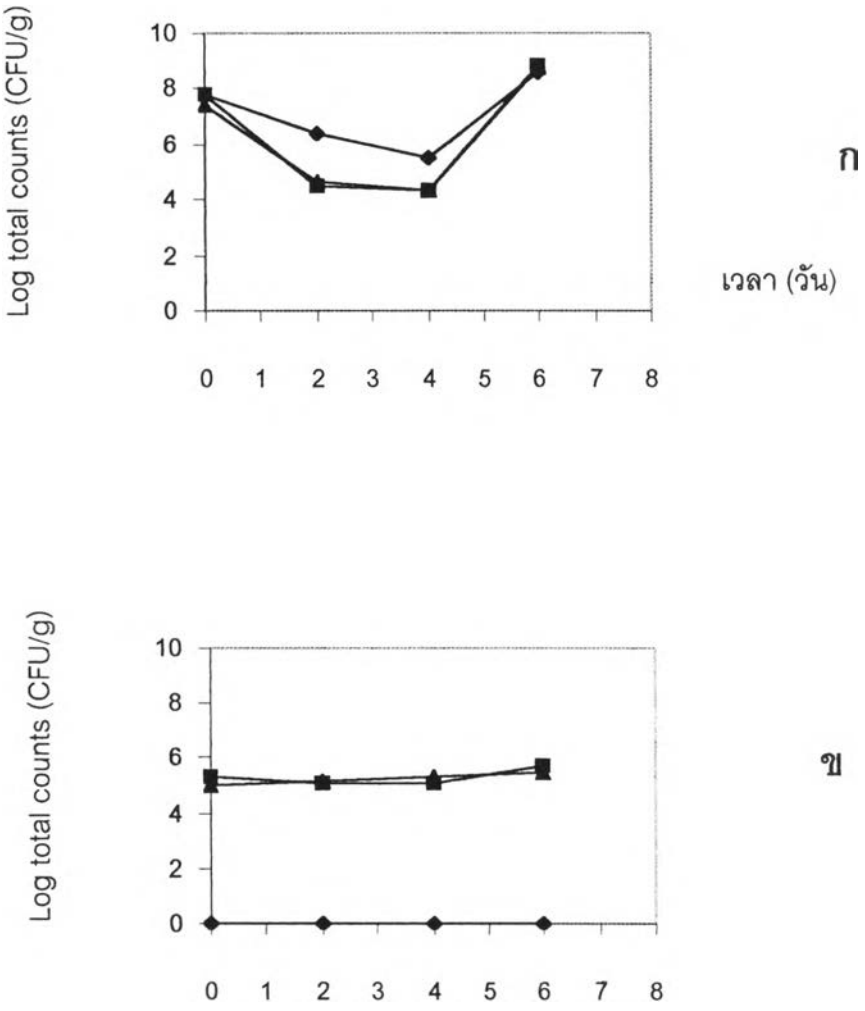
ติดตามจำนวน *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 1526 และ *Bacillus* S11 ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (รูปที่ 10) และในลำไส้กุ้งกุลาดำ (รูปที่ 11) ระหว่างการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 1526 เป็นเวลา 8 วัน พบว่าจำนวน *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 1526 ในน้ำเลี้ยงมีจำนวนใกล้เคียงกันในกลุ่มการทดลองทั้ง 3 กลุ่ม (รูปที่ 10) ส่วนในลำไส้พบว่ากุ้งกลุ่มควบคุมมีปริมาณ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 1526 สูงกว่ากุ้งกลุ่มที่ให้อาหารผสม *Bacillus* S11 และมีปริมาณใกล้เคียงกันอีกครั้งหนึ่งในวันที่ 6 ของการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคเนื่องจากทำการเติมเชื้อ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 1526 เป็นครั้งที่ 2 (รูปที่ 11) ส่วน *Bacillus* S11 สามารถตรวจพบได้ทั้งในน้ำเลี้ยง (รูปที่ 10)และในลำไส้ของกุ้งกลุ่มโพรไบโอติก (รูปที่ 11) และตรวจไม่พบ *Bacillus* S11 ทั้งในน้ำเลี้ยง (รูปที่ 10) และในลำไส้ของกุ้งกลุ่มควบคุม (รูปที่ 11)

นำเฮปพาโตแพนเครียส (hepatopancrease) และลำไส้ของกุ้งที่ตายมาเพาะแยกเชื้อสาเหตุการเกิดโรค และแยกเชื้อ *Vibrio* spp. โคโลนีสีเขียวที่พบในน้ำเลี้ยง ลำไส้และในเฮปพาโตแพนเครียสของกุ้ง ในระหว่างการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค ไปทดสอบลักษณะทางชีวเคมี พบว่าเชื้อที่เป็นสาเหตุการตายของกุ้งและเชื้อที่พบในน้ำและลำไส้กุ้งระหว่างการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค มีลักษณะทางชีวเคมีเหมือน *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 1526 ที่ใช้ในการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคทุกประการ ดังแสดงผลในตารางที่ 6



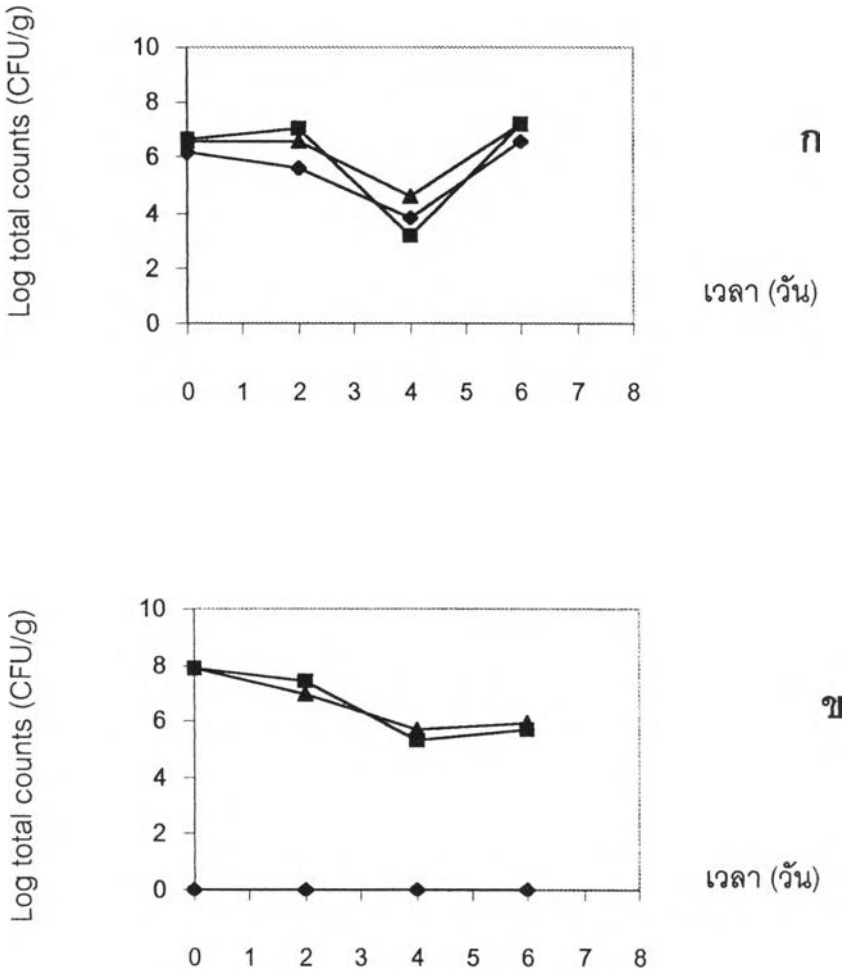
กลุ่มควบคุม (-◆-) กลุ่มโพรไบโอติกบ่อที่ 1 (-■-) กลุ่มโพรไบโอติกบ่อที่ 2 (-▲-)

รูปที่ 9. การตายสะสม (cumulative mortality) ของกุ้งกุลาดำ ระหว่างการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 1526 เป็นเวลา 8 วัน
แต่ละจุดเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ
(กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ใส่ *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 มีการตายสะสม 0% ข้อมูลไม่ได้แสดงในรูป)



กลุ่มควบคุม (-◆-) กลุ่มโพรไบโอติกบ่อที่ 1 (-■-) กลุ่มโพรไบโอติกบ่อที่ 2 (-▲-)

รูปที่ 10. จำนวน *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 (ก) และ *Bacillus* S11 (ข) ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ระหว่างการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 เป็นเวลา 8 วัน แต่ละจุดเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ



กลุ่มควบคุม (-◆-) กลุ่มโพรไบโอติกบ่อที่ 1 (-■-) กลุ่มโพรไบโอติกบ่อที่ 2 (-▲-)

รูปที่ 11. จำนวน *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 (ก) และ *Bacillus* S11 (ข) ในลำไส้กุ้งกุลาดำระหว่างการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 เป็นเวลา 8 วัน แต่ละจุดเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

ตารางที่ 6. ลักษณะการเจริญและการทดสอบทางชีวเคมีของ *Vibrio* spp. ที่แยกได้ระหว่างการทดสอบการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 1526 เทียบกับ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 1526 ของการเลี้ยงกุ้งกุลาดำครั้งที่ 2

ลักษณะที่ทดสอบ	*Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 1526	*Vibrio* spp.
Gram' s stain	Negative, Rod	Negative, Rod
Growth on TCBS	Green	Green
Luminescence	+	+
Pigment production	-	-
Motility	+	+
Indole	+	+
Oxidase	+	+
Catalase	+	+
Gas from D-glucose	-	-
Nitrate test	+	+
Methyl red	+	+
Voges-proskauer	-	-
Oxidative-fermentative test	Fermentative	Fermentative
Citrate utilization	-	-
Growth at:		
$4^{0}C$	-	-
$30^{0}C$	+	+
$37^{0}C$	+	+
$40^{0}C$	-	-
Na^{+} required for growth:		
0 %	-	-
1 %	+	+
3 %	+	+
6 %	+	+

8 %	-	-
10 %	-	-
Utilization of:		
D-glucose	+	+
L-arabinose	-	-
D-mannose	+	+
Sucrose	-	-
Cellobiose	+	+
Lactose	-	-

'+' = positive test, '-' = negative test

อาหารที่ใช้ทดสอบทุกชนิดเติม NaCl 1% (w/v) ยกเว้นการทดสอบ Na^+ required for growth: 0%

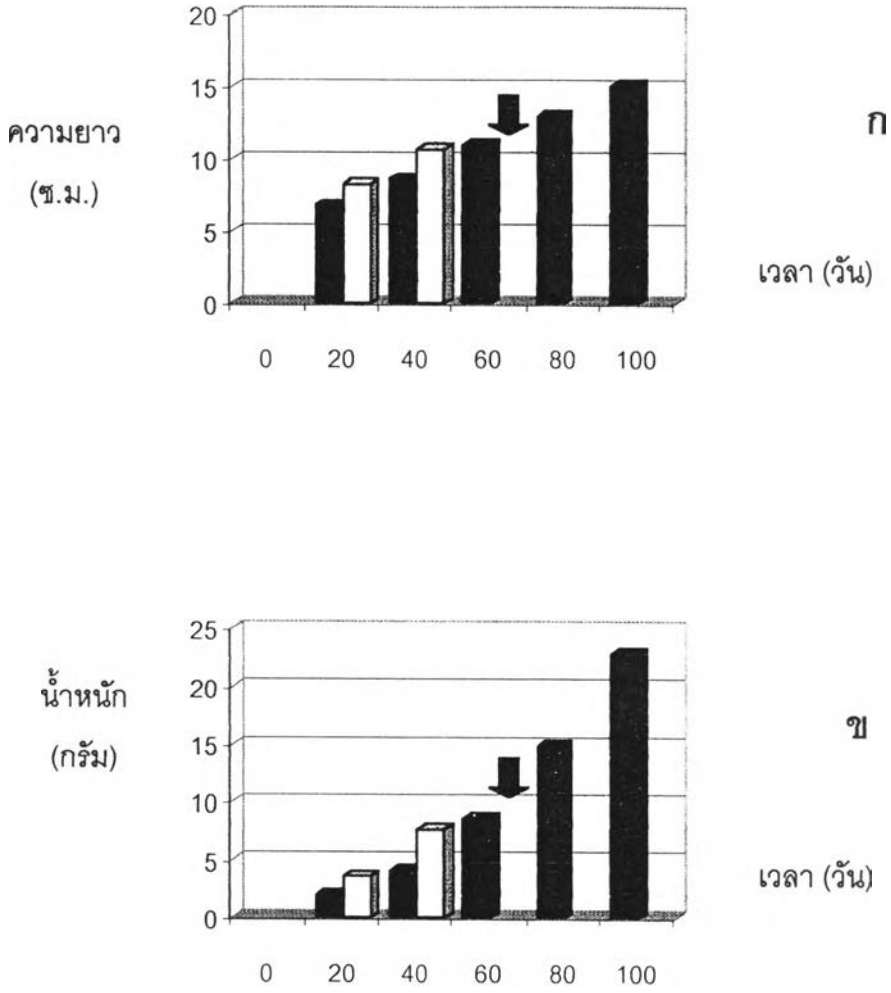
3. การเลี้ยงกุ้งกุลาดำครั้งที่ 3

ผลของโพรไบโอติกต่อการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ

เลี้ยงกุ้งกุลาดำระยะโพสลาวา 25 (PL25) จำนวน 40,000 ตัวต่อบ่อในบ่อดินเดียวกับการทดลองที่ 1 และ 2 ติดตามการเจริญของกุ้งกุลาดำ พบว่าความยาวและน้ำหนักของกุ้งกุลาดำในกลุ่มที่ได้รับโพรไบโอติกในระยะเวลา 40 วันแรกของการเลี้ยงมากกว่ากุ้งกุลาดำในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 12 และคุณภาพน้ำของทั้ง 2 กลุ่มการทดลองมีค่าใกล้เคียงกันและอยู่ในช่วงเกณฑ์ปกติที่ปลอดภัยสำหรับการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (ตารางที่ 7)

จากการติดตามปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำเลี้ยงกุ้ง (รูปที่ 13) ดินตะกอนจากบ่อเลี้ยง (รูปที่ 14) และลำไส้กุ้ง (รูปที่ 15) จากทั้ง 2 กลุ่มการทดลองพบว่า ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำตรวจพบแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง $6.02 \times 10^4 - 8.03 \times 10^4$ CFU/ml และตรวจพบ *Vibrio* spp. อยู่ในช่วง $5.0 \times 10^1 - 6.0 \times 10^2$ CFU/ml (รูปที่ 13) ดินตะกอนจากบ่อเลี้ยงดินตะกอนจากบ่อเลี้ยงกุ้งมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง $5.02 \times 10^6 - 3.04 \times 10^7$ CFU/g และ *Vibrio* spp. อยู่ในช่วง $2.3 \times 10^2 - 1.83 \times 10^5$ CFU/g (รูปที่ 14) ในลำไส้ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่ตรวจพบอยู่ในช่วง $7.75 \times 10^6 - 1.39 \times 10^9$ CFU/g และ *Vibrio* spp. อยู่ในช่วง $1.07 \times 10^4 - 3.32 \times 10^7$ CFU/g (รูปที่ 15) ส่วน *Bacillus* S11 สามารถตรวจพบทั้งในน้ำเลี้ยง (รูปที่ 13) ดินตะกอน (รูปที่ 14) และลำไส้ (รูปที่ 15) ของกุ้งทั้ง 2 กลุ่มการทดลอง แต่จะพบในกลุ่มที่ให้อาหารผสม *Bacillus* S11 มากกว่ากลุ่มควบคุมซึ่งให้อาหารปกติ

ในวันที่ 50 ของการเลี้ยงพบว่ากุ้งในบ่อโพรไบโอติกมีอาการของโรคตัวแดงดวงขาวปรากฏและเริ่มทยอยตายเป็นจำนวนมาก จึงทำการจับกุ้งในบ่อโพรไบโอติกทั้งหมดขึ้นเพื่อยับยั้งการแพร่ระบาดของโรคไปยังบ่อใกล้เคียง ผลการทดลองจึงมีเพียง 40 วันแรกของการเพาะเลี้ยงเท่านั้น ส่วนกุ้งในกลุ่มควบคุมพบว่ากุ้งเริ่มป่วยในวันที่ 50 ของการเพาะเลี้ยงเช่นกันแต่ไม่ได้เกิดจากโรคตัวแดงดวงขาวและได้เริ่มตายไปบางส่วนจึงทำการเก็บตัวที่ตายออกและส่วนที่เหลือก็ได้รับการดูแลจนครบ 100 วัน

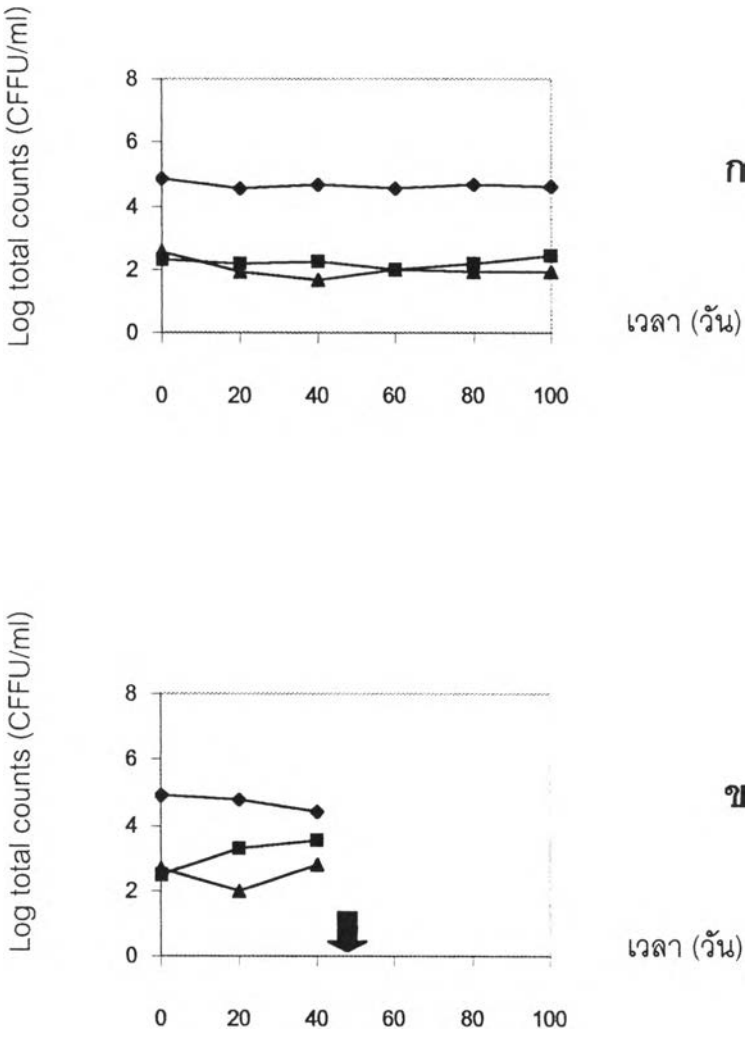


รูปที่ 12. ความยาว (ก) และน้ำหนัก (ข) ของกุ้งกุลาดำ กลุ่มควบคุมและกลุ่มโพรไบโอติก ระหว่างการเลี้ยงกุ้งกุลาดำครั้งที่ 3

⬇ กุ้งตายด้วยโรคไวรัสตัวแดงดวงขาวในวันที่ 50 ของการเลี้ยง

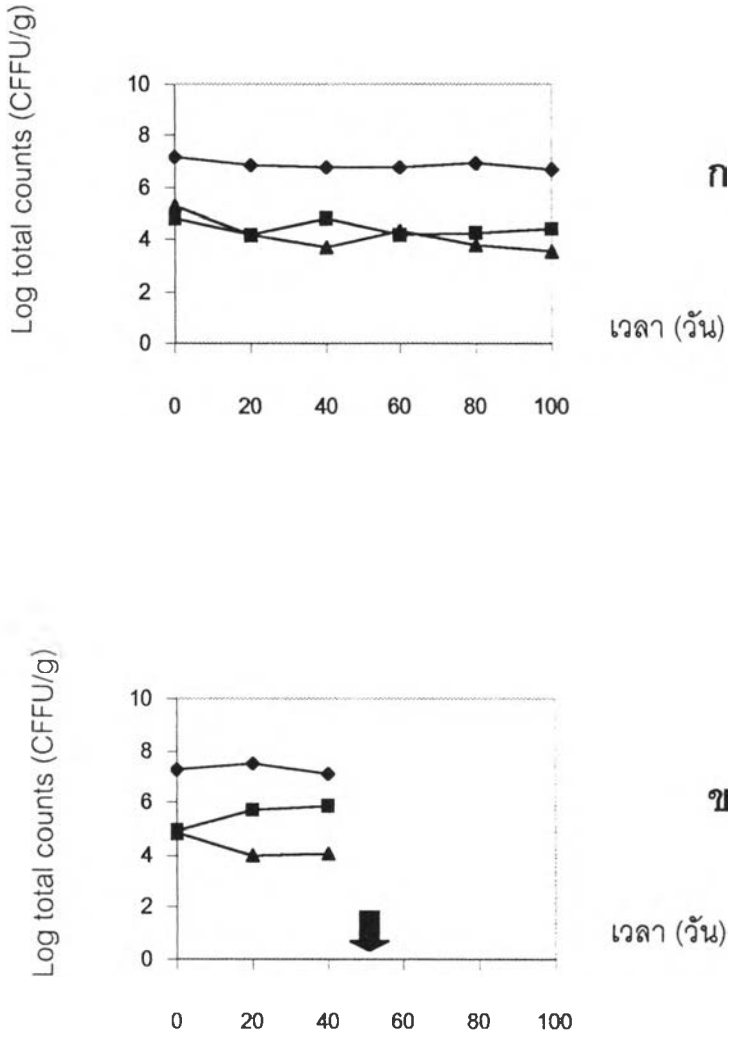
ตารางที่ 7. คุณภาพน้ำระหว่างการเลี้ยงกุ้งกุลาดำครั้งที่ 3 เป็นระยะเวลา 100 วัน (ตรวจสอบทุก 20 วัน)

คุณภาพน้ำ	ช่วงค่าคุณภาพน้ำ (ต่ำสุด-สูงสุด)	
	บ่อควบคุม	บ่อโพรไบโอติก
แอมโมเนียม (มก/ลิตร)	0 – 0.25	0 – 0.13
ไนไตรท์ (มก/ลิตร)	0 – 0.1	0 – 0.1
ฟอสเฟต (มก/ลิตร)	0 – 0.13	0 – 0.13
อุณหภูมิ (^{o}ซ)	29.5 – 30.5	29.5 – 30.5
พีเอช	7.4 – 8.2	7.6 – 7.5
ความเค็ม (ส่วนในพันส่วน)	3 - 4	3 – 4
อัลคาลินิตี้ (มก/ลิตร)	111 - 160	125 - 142
ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (มก/ลิตร)	6.2 – 7.9	6.3 – 8.0



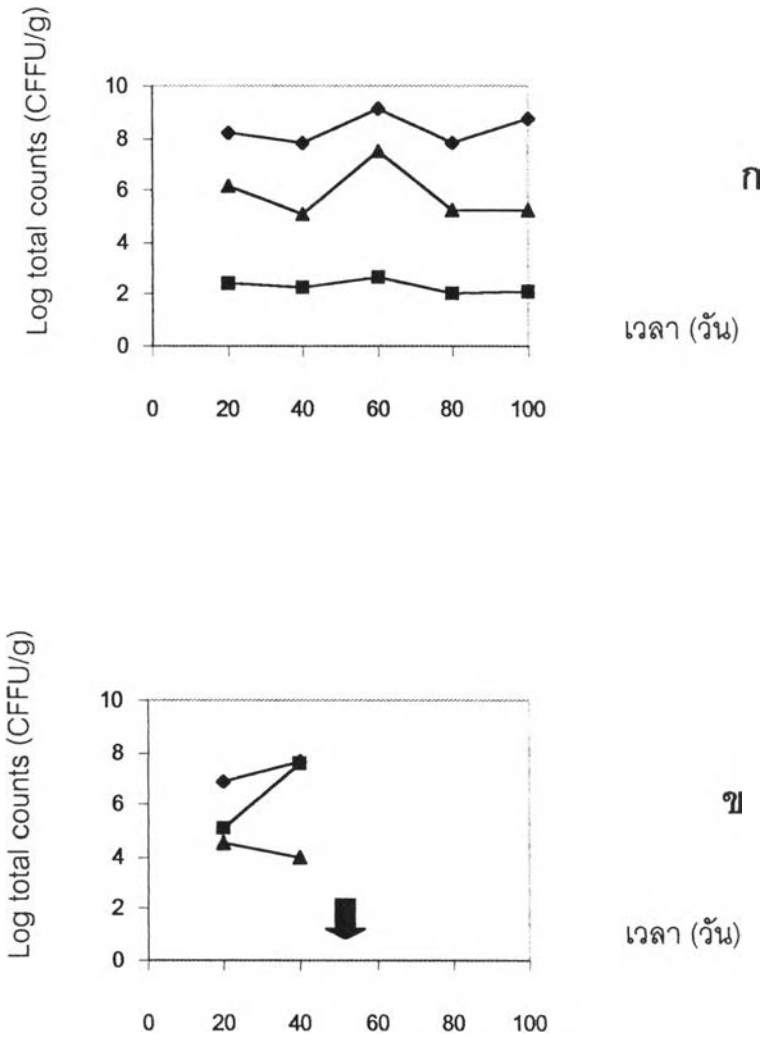
กลุ่มควบคุม (ก) กลุ่มโพรไบโอติก (ข)

รูปที่ 13. จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (-◆-) *Bacillus* S11 (-■-) และ *Vibrio* spp. (-▲-) ในน้ำเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำระหว่างการเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 3
แต่ละจุดเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 9 ซ้ำ
⬇ กุ้งตายด้วยโรคไวรัสตัวแดงดวงขาวในวันที่ 50 ของการเลี้ยง



กลุ่มควบคุม (ก) กลุ่มโพรไบโอติก (ข)

รูปที่ 14. จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (-◆-) *Bacillus* S11 (-■-) และ *Vibrio* spp. (-▲-) ในตะกอนดินในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำระหว่างการเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 3
แต่ละจุดเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 9 ซ้ำ
⬇ กุ้งตายด้วยโรคไวรัสตัวแดงดวงขาวในวันที่ 50 ของการเลี้ยง



กลุ่มควบคุม (ก) กลุ่มโพรไบโอติก (ข)

รูปที่ 15. จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (-◆-) *Bacillus* S11 (-■-) และ *Vibrio* spp. (-▲-) ในลำไส้กุ้งกุลาดำระหว่างการเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 3
แต่ละจุดเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 9 ซ้ำ
⬇ กุ้งตายด้วยโรคไวรัสตัวแดงดวงขาวในวันที่ 50 ของการเลี้ยง

4. การเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำครั้งที่ 4

4.1 ผลของโพรไบโอติกต่อการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ

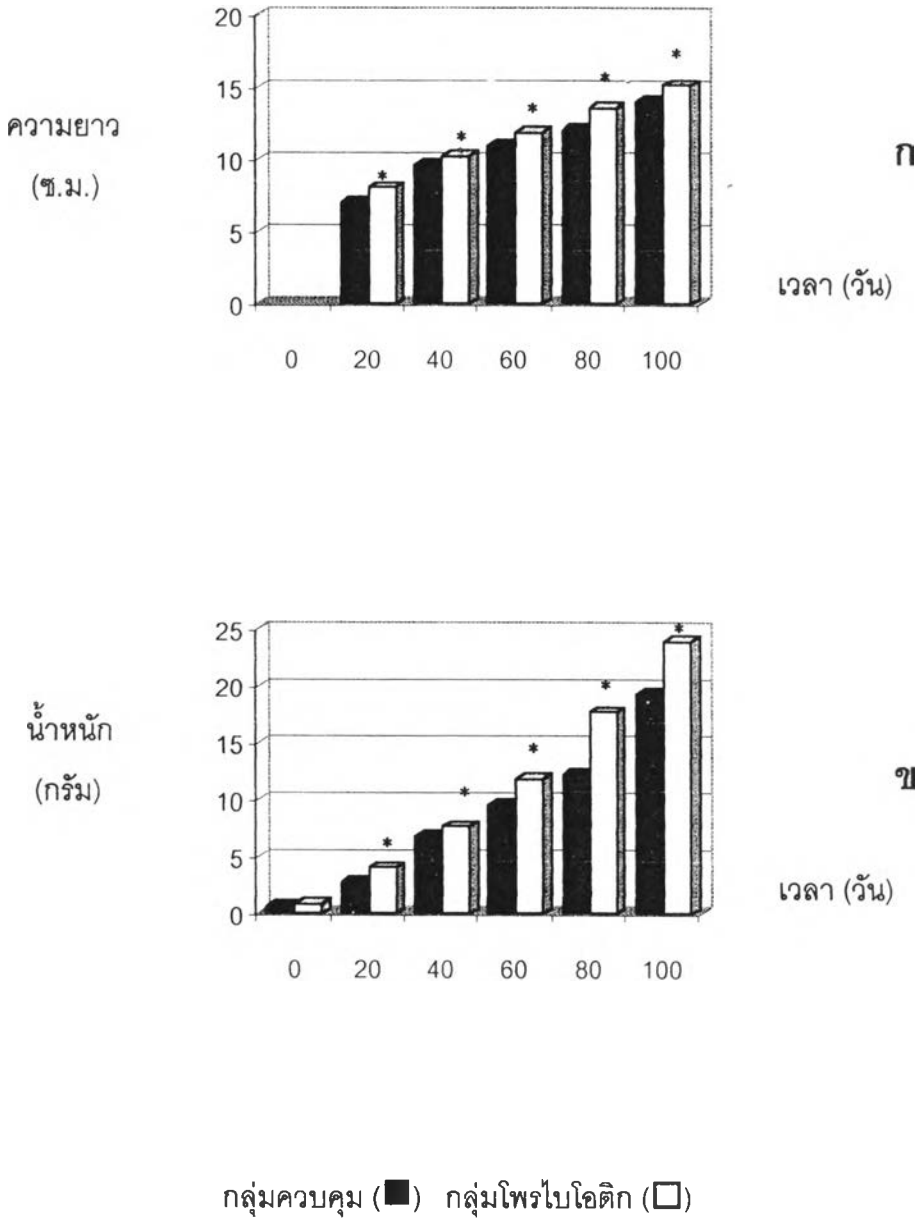
เลี้ยงกุ้งกุลาดำระยะโพสลาวา 25 (PL25) 80 ตัว ในกระชังพื้นที่ขนาด 2 ตร.ม. จำนวน 24 กระชังในบ่อดินเดียวกันขนาด 600 ตร.ม. เป็นระยะเวลา 100 วัน โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม (แต่ละกลุ่มทำการทดลอง 12 ซ้ำ) คือ

กลุ่มควบคุม ให้อาหารกุ้งกุลาดำสำเร็จรูป โดยไม่ผสม *Bacillus* S11

กลุ่มโพรไบโอติก ให้อาหารกุ้งกุลาดำสำเร็จรูป ผสม *Bacillus* S11

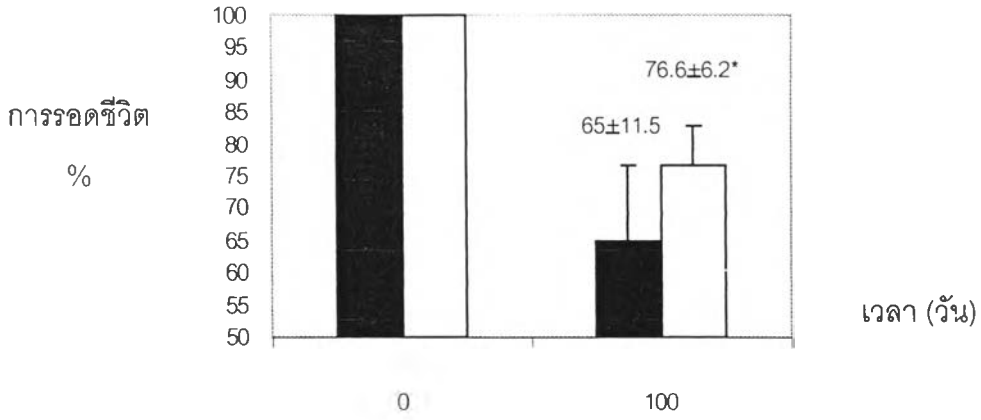
ติดตามผลการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ พบว่า กุ้งกุลาดำกลุ่มโพรไบโอติกมีขนาดความยาวและน้ำหนักมากกว่ากุ้งกุลาดำกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ $p<0.05$ (รูปที่ 16) และมีการรอดหลังจากทำการเลี้ยงครบ 100 วัน ในกุ้งกลุ่มโพรไบโอติก 76.7 เปอร์เซ็นต์ มากกว่ากุ้งกลุ่มควบคุม ซึ่งมีการรอด 65.0 เปอร์เซ็นต์ โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p<0.05$ เช่นกัน (รูปที่ 17) คุณภาพน้ำของทั้ง 2 กลุ่มมีค่าใกล้เคียงกันและอยู่ในช่วงเกณฑ์ปกติที่ปลอดภัยสำหรับการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (ตารางที่ 8)

จากการติดตามปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด *Bacillus* S11 และ *Vibrio* spp. ในน้ำเลี้ยงกุ้ง (รูปที่ 18) ดินตะกอนในบ่อเลี้ยงกุ้ง (รูปที่ 19) และลำไส้กุ้ง (รูปที่ 20) จากทั้ง 2 กลุ่มการทดลองพบว่า ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำตรวจพบปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง $5.56\text{x}10^{3}$ – $8.66\text{x}10^{4}$ CFU/ml และตรวจพบ *Vibrio* spp. อยู่ในช่วง 1.0 – $2.5\text{x}10^{2}$ CFU/ml (รูปที่ 18) ดินตะกอนในบ่อเลี้ยงกุ้งมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง $9.35\text{x}10^{5}$ – $1.03\text{x}10^{7}$ CFU/g และตรวจพบ *Vibrio* spp. อยู่ในช่วง $7.5\text{x}10^{1}$ – $1.83\text{x}10^{4}$ CFU/g (รูปที่ 19) ส่วนในลำไส้กุ้งกุลาดำปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง $2.53\text{x}10^{7}$ – $2.52\text{x}10^{9}$ CFU/g และพบ *Vibrio* spp. อยู่ในช่วง $1.05\text{x}10^{3}$ – $1.51\text{x}10^{6}$ CFU/g (รูปที่ 20) และตรวจพบ *Bacillus* S11 ในกุ้งกลุ่มโพรไบโอติก โดยพบในน้ำเลี้ยงอยู่ในช่วง $1.49\text{x}10^{3}$ – $7.7\text{x}10^{3}$ CFU/ml (รูปที่ 18) ในดินตะกอนตรวจพบอยู่ในช่วง $4.43\text{x}10^{4}$ – $3.25\text{x}10^{6}$ CFU/g (รูปที่ 19) และในลำไส้พบอยู่ในช่วง $4.29\text{x}10^{6}$ – $1.69\text{x}10^{9}$ CFU/g (รูปที่ 20) ส่วนในกลุ่มควบคุมตรวจพบ *Bacillus* S11 เช่นกันทั้งในน้ำ ในดินตะกอนและในลำไส้ของกุ้ง แต่พบในปริมาณที่น้อยมากเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม



รูปที่ 16. ความยาว (ก) น้ำหนัก (ข) ของกุ้งกุลาดำกลุ่มควบคุมและกลุ่มโพรไบโอติกระหว่างการเลี้ยงกุ้งกุลาดำครั้งที่ 4

* แสดงความแตกต่างที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

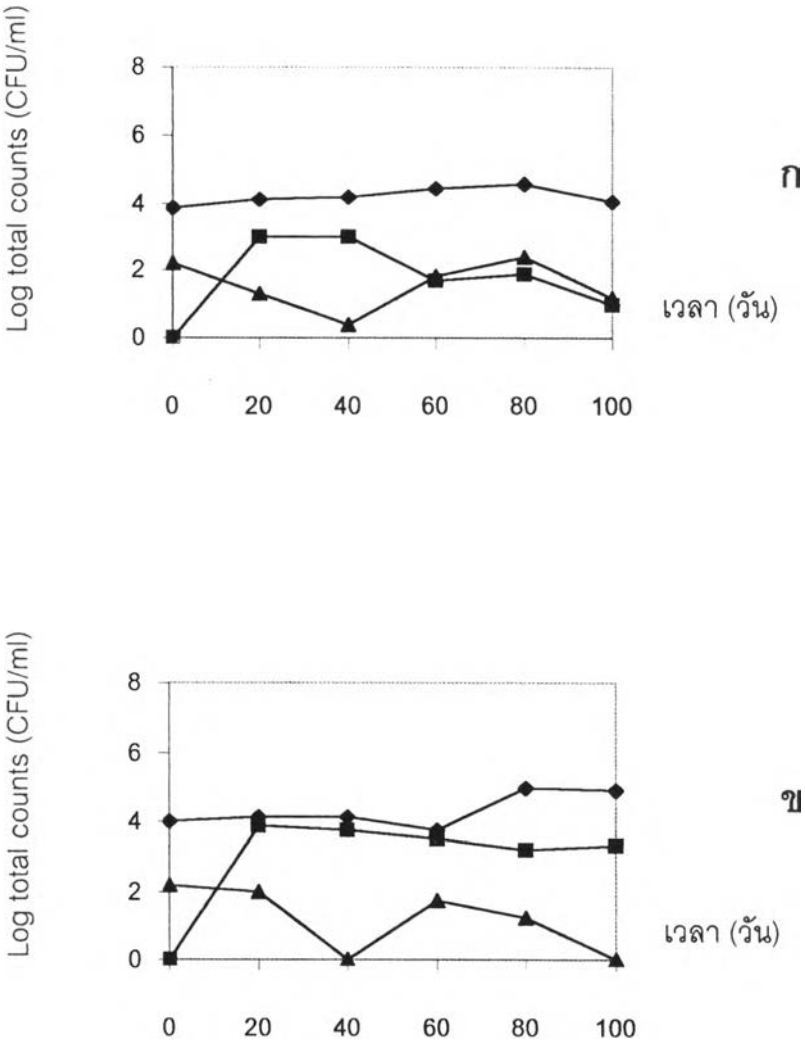


รูปที่ 17. การรอดชีวิตของกุ้งกุลาดำกลุ่มควบคุมและกลุ่มโพรไบโอติกระหว่างการเลี้ยงกุ้งกุลาดำครั้งที่ 4

* แสดงความแตกต่างที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

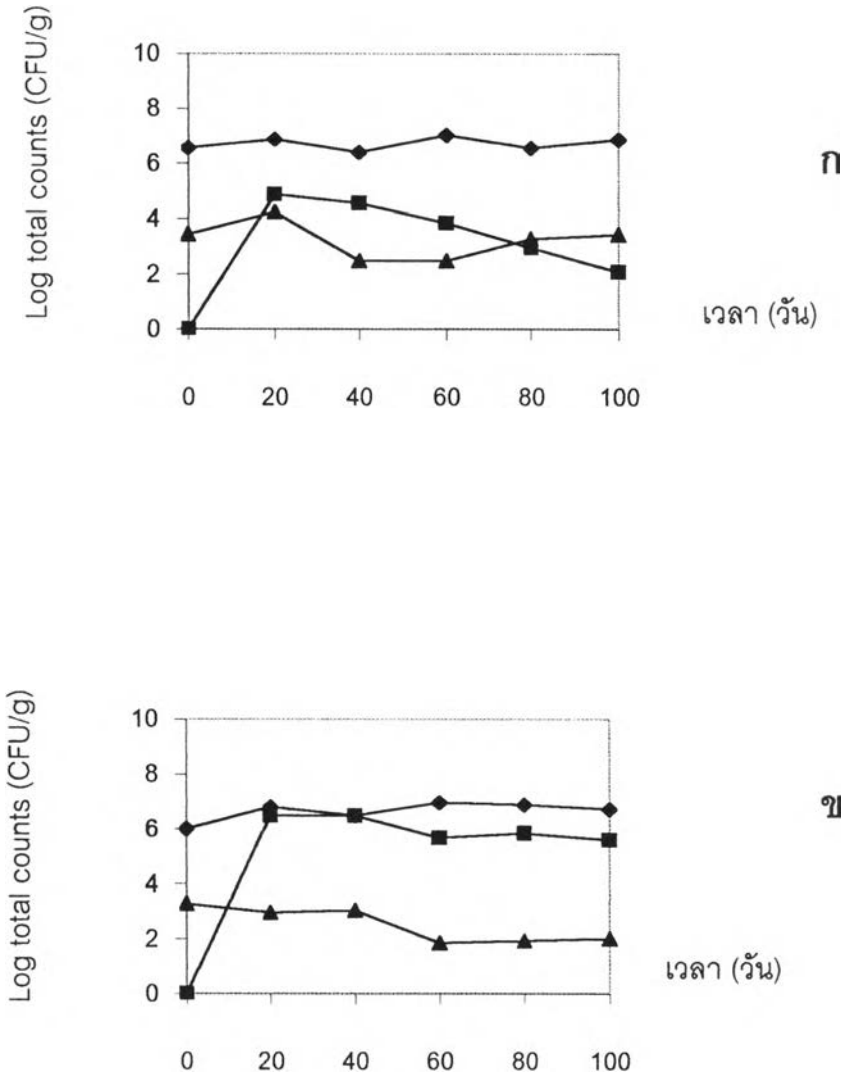
ตารางที่ 8. คุณภาพน้ำระหว่างการเลี้ยงกุ้งกุลาดำครั้งที่ 4 เป็นระยะเวลา 100 วัน (ตรวจสอบทุก 20 วัน)

คุณภาพน้ำ	**ช่วงค่าคุณภาพน้ำ (ต่ำสุด-สูงสุด)**	
	บ่อควบคุม	**บ่อโพรไบโอติก**
แอมโมเนียม (มก/ลิตร)	0 – 0.05	0 – 0.05
ไนไตรท์ (มก/ลิตร)	0 – 0.25	0 – 0.25
ฟอสเฟต (มก/ลิตร)	0 – 0.25	0 – 0.25
อุณหภูมิ (^{0}ซ)	29.5 – 31	30 – 31
พีเอช	7.4 – 8.18	7.5 – 8.17
ความเค็ม (ส่วนในพันส่วน)	3 - 4	3 - 4
อัลคาลินิตี้ (มก/ลิตร)	96.5 - 130	90 - 136
ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (มก/ลิตร)	5.7 – 6.7	5.8 – 6.5



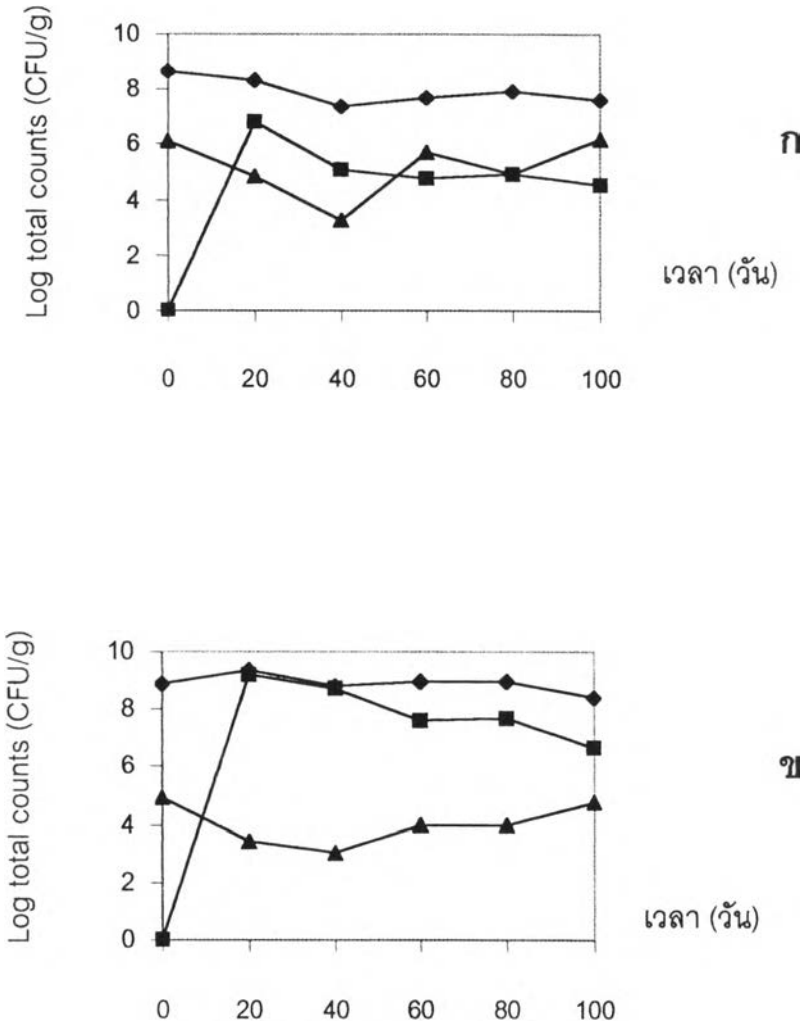
กลุ่มควบคุม (ก) กลุ่มโพรไบโอติก (ข)

รูปที่ 18. จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (-◆-) *Bacillus* S11 (-■-) และ *Vibrio* spp. (-▲-) ในน้ำเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำระหว่างการเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 4
แต่ละจุดเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 9 ซ้ำ



กลุ่มควบคุม (ก) กลุ่มโพรไบโอติก (ข)

รูปที่ 19. จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (-◆-) *Bacillus* S11 (-■-) และ *Vibrio* spp. (-▲-) ในตะกอนดินในบ่อกุ้งกุลาดำระหว่างการเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 4
แต่ละจุดเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 9 ซ้ำ



กลุ่มควบคุม (ก) กลุ่มโพรไบโอติก (ข)

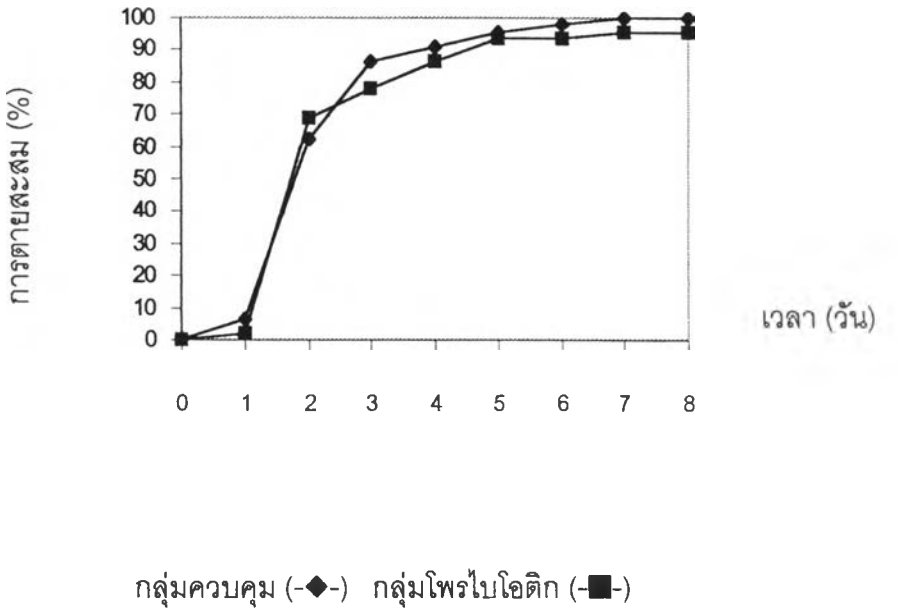
รูปที่ 20. จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (-◆-) *Bacillus* S11 (-■-) และ *Vibrio* spp. (-▲-) ในลำไส้กุ้งกุลาดำระหว่างการเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 4
แต่ละจุดเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 9 ซ้ำ

4.2 การทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค

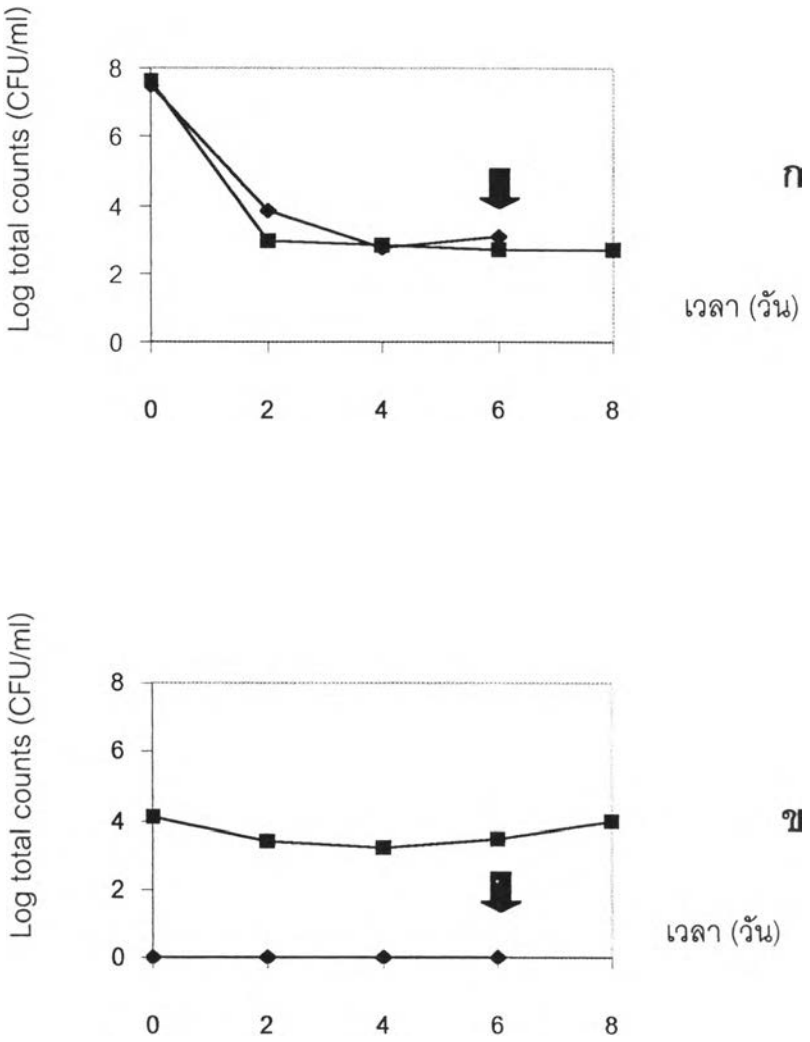
รวบรวมกุ้งที่เหลือจากการเพาะเลี้ยง 100 วัน ในแต่ละกระชัง นำมาทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค ด้วยการใช้ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 1526 เป็นเชื้อก่อโรคโดยเติมเชื้อก่อโรคนี้ลงในน้ำเลี้ยงกุ้งจำนวน $3.5x10^7$ CFU/ml เมื่อครบ 8 วันของการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค พบว่ากุ้งกลุ่มที่ให้อาหารผสมโพรไบโอติกมีการตายสะสม 95.55 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งน้อยกว่ากุ้งกลุ่มควบคุมโดยมีการตายสะสม 100 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 21)

ติดตามจำนวน *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 1526 และ *Bacillus* S11 ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (รูปที่ 22) และในลำไส้กุ้งกุลาดำ (รูปที่ 23) ระหว่างการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 1526 เป็นเวลา 8 วัน พบว่าจำนวน *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 1526 ของทั้ง 2 กลุ่มการทดลองมีค่าใกล้เคียงกันทั้งในน้ำเลี้ยง (รูปที่ 22) และในลำไส้ (รูปที่ 23) ส่วน *Bacillus* S11 สามารถตรวจพบได้ทั้งในน้ำเลี้ยง (รูปที่ 22) และในลำไส้ของกุ้งกลุ่มโพรไบโอติก (รูปที่ 23) และตรวจไม่พบ *Bacillus* S11 ทั้งในน้ำเลี้ยง (รูปที่ 22) และในลำไส้ของกุ้งกลุ่มควบคุม (รูปที่ 23)

นำเฮปพาโตแพนเครียส (hepatopancrease) และลำไส้ของกุ้งที่ตายมาเพาะแยกเชื้อสาเหตุการเกิดโรค และแยกเชื้อ *Vibrio* spp. โคโลนีสีเขียวที่พบในน้ำเลี้ยง ลำไส้และในเฮปพาโตแพนเครียสของกุ้ง ในระหว่างการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค ไปทดสอบลักษณะทางชีวเคมี พบว่าเชื้อที่เป็นสาเหตุการตายของกุ้งและเชื้อที่พบในน้ำและลำไส้กุ้งระหว่างการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค มีลักษณะทางชีวเคมีเหมือน *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 1526 ที่ใช้ในการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคทุกประการ ดังแสดงผลในตารางที่ 9



รูปที่ 21. การตายสะสม (cumulative mortality) ของกุ้งกุลาดำ ระหว่างการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 1526 เป็นเวลา 8 วัน
แต่ละจุดเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ
(กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ใส่ *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 มีการตายสะสม 0% ข้อมูลไม่ได้แสดงในรูป)

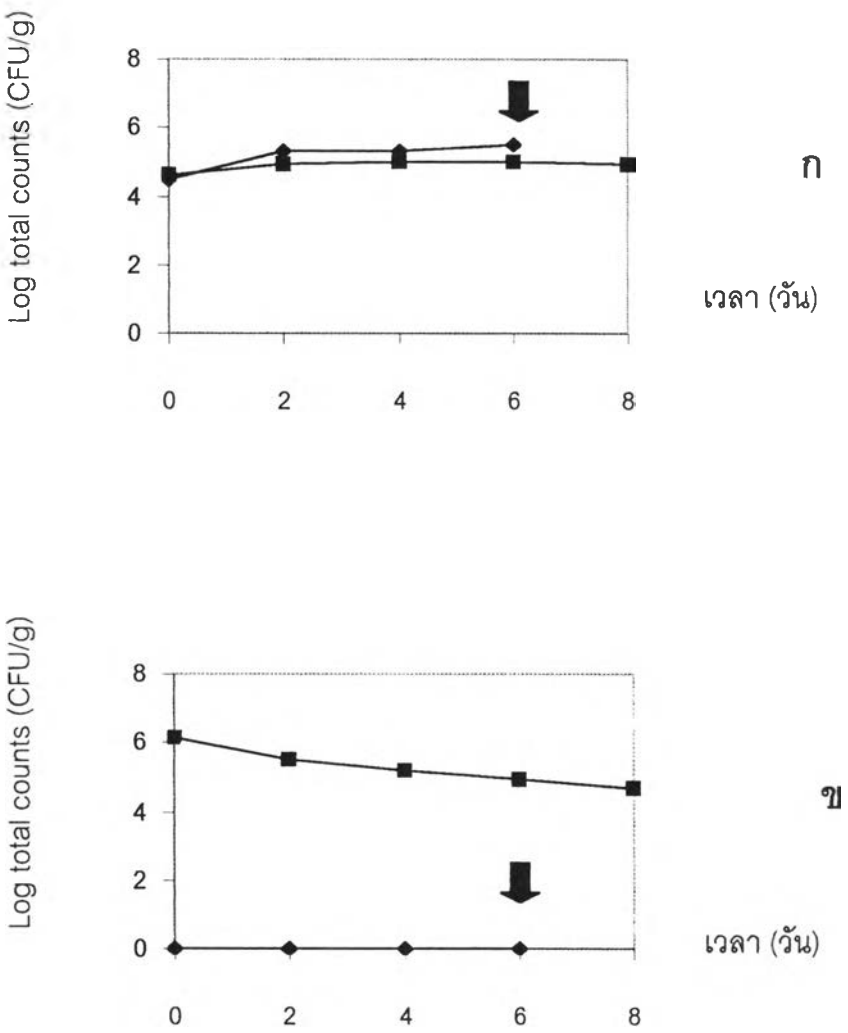


กลุ่มควบคุม (-◆-) กลุ่มโพรไบโอติก (-■-)

รูปที่ 22. จำนวน *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 1526 (ก) และ *Bacillus* S11 (ข) ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ระหว่างการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 1526 เป็นเวลา 8 วัน

แต่ละจุดเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

⬇ กุ้งกลุ่มควบคุมตายครบ 100 % ในวันที่ 7 ของงการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค



กลุ่มควบคุม (-◆-) กลุ่มโพรไบโอติก (-■-)

รูปที่ 22. จำนวน *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 1526 (ก) และ *Bacillus* S11 (ข) ในลำไส้กุ้งกุลาดำ ระหว่างการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 1526 เป็นเวลา 8 วัน แต่ละจุดเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

⬇ กุ้งกลุ่มควบคุมตายครบ 100 % ในวันที่ 7 ของงการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค

ตารางที่ 9. ลักษณะการเจริญและการทดสอบทางชีวเคมีของ *Vibrio* spp. ที่แยกได้ระหว่างการทดสอบการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 1526 เทียบกับ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 1526 ของการเลี้ยงกุ้งกุลาดำครั้งที่ 4

ลักษณะที่ทดสอบ	*Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 1526	*Vibrio* spp.
Gram' s stain	Negative, Rod	Negative, Rod
Growth on TCBS	Green	Green
Luminescence	+	+
Pigment production	-	-
Motility	+	+
Indole	+	+
Oxidase	+	+
Catalase	+	+
Gas from D-glucose	-	-
Nitrate test	+	+
Methyl red	+	+
Voges-proskauer	-	-
Oxidative-fermentative test	Fermentative	Fermentative
Citrate utilization	-	-
Growth at:		
$4^{\circ}C$	-	-
$30^{\circ}C$	+	+
$37^{\circ}C$	+	+
$40^{\circ}C$	-	-
Na^{+} required for growth:		
0 %	-	-
1 %	+	+
3 %	+	+
6 %	+	+

ตารางที่ 9. (ต่อ)

8 %	-	-
10 %	-	-
Utilization of:		
D-glucose	+	+
L-arabinose	-	-
D-mannose	+	+
Sucrose	-	-
Cellobiose	+	+
Lactose	-	-

'+' = positive test, '-' = negative test

อาหารที่ใช้ทดสอบทุกชนิดเติม NaCl 1% (w/v) ยกเว้นการทดสอบ Na^+ required for growth: 0%

5. การเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำครั้งที่ 5

5.1 ผลของโพรไบโอติกต่อการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ

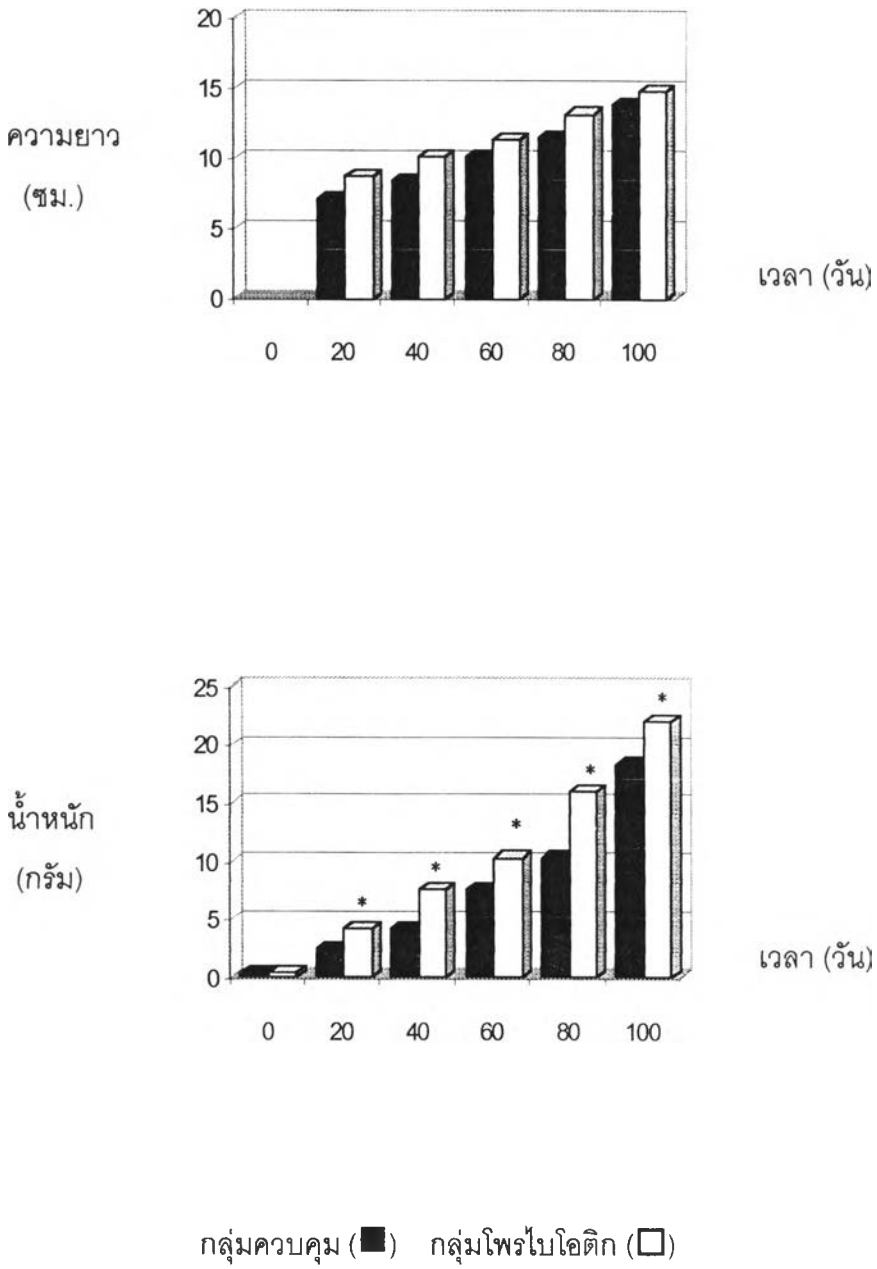
เลี้ยงกุ้งกุลาดำระยะโพสลาวา 15 (PL15) 80 ตัว ในกระชังพื้นที่ขนาด 2 ตร.ม. จำนวน 12 กระชังในบ่อดินเดียวกันขนาด 600 ตร.ม. เป็นระยะเวลา 100 วัน โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม (แต่ละกลุ่มทำการทดลอง 6 ซ้ำ) คือ

กลุ่มควบคุม ให้อาหารกุ้งกุลาดำสำเร็จรูป โดยไม่ผสม *Bacillus* S11

กลุ่มโพรไบโอติก ให้อาหารกุ้งกุลาดำสำเร็จรูป ผสม *Bacillus* S11

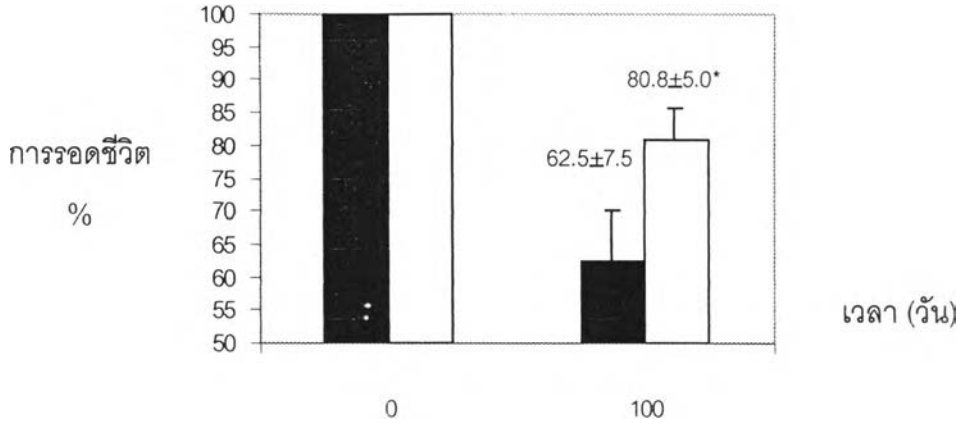
ติดตามผลการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ พบว่า กุ้งกุลาดำกลุ่มโพรไบโอติกมีขนาดความยาวและน้ำหนักมากกว่ากุ้งกุลาดำกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ $p<0.05$ (รูปที่ 24) และมีการรอดหลังจากทำการเลี้ยงครบ 100 วัน ในกุ้งกลุ่มโพรไบโอติก 80.8 เปอร์เซ็นต์ มากกว่ากุ้งกลุ่มควบคุมซึ่งมีการรอด 62.5 เปอร์เซ็นต์ โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p<0.05$ เช่นกัน (รูปที่ 25) คุณภาพน้ำของทั้ง 2 กลุ่มมีค่าใกล้เคียงกันและอยู่ในช่วงเกณฑ์ปกติที่ปลอดภัยสำหรับการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (ตารางที่ 10)

จากการติดตามปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด *Bacillus* S11 และ *Vibrio* spp. ในน้ำเลี้ยงกุ้ง (รูปที่ 26) ดินตะกอนในบ่อเลี้ยงกุ้ง (รูปที่ 27) และลำไส้กุ้ง (รูปที่ 28) จากทั้ง 2 กลุ่มการทดลอง พบว่าในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำตรวจพบปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง $1.23x10^3$ – $9.62x10^3$ CFU/ml และตรวจพบ *Vibrio* spp. อยู่ในช่วง 5.0 – $2.91x10^2$ CFU/ml (รูปที่ 26) ดินตะกอนในบ่อเลี้ยงกุ้งมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง $3.0x10^4$ – $6.68x10^6$ CFU/g และตรวจพบ *Vibrio* spp. อยู่ในช่วง $5.0x10^1$ – $3.58x10^3$ CFU/g (รูปที่ 27) ส่วนในลำไส้กุ้งกุลาดำปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง $7.02x10^5$ – $6.1x10^8$ CFU/g และพบ *Vibrio* spp. อยู่ในช่วง $3.11x10^3$ – $1.04x10^6$ CFU/g (รูปที่ 28) และตรวจพบ *Bacillus* S11 ในกุ้งกลุ่มโพรไบโอติก โดยพบในน้ำเลี้ยงอยู่ในช่วง $3.18x10^2$ – $1.05x10^3$ CFU/ml (รูปที่ 26) ในดินตะกอนตรวจพบอยู่ในช่วง $1.6x10^4$ – $1.11x10^6$ CFU/g (รูปที่ 27) และในลำไส้พบอยู่ในช่วง $8.2x10^5$ – $5.2x10^8$ CFU/g (รูปที่ 28) ส่วนในกลุ่มควบคุมตรวจพบ *Bacillus* S11 เช่นกันทั้งในน้ำและในลำไส้ของกุ้ง แต่พบในปริมาณที่น้อยมากเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและตรวจไม่พบเลยในดินตะกอน



รูปที่ 24. ความยาว (ก) น้ำหนัก (ข) ของกุ้งกุลาดำกลุ่มควบคุมและกลุ่มโพรไบโอติกระหว่างการเลี้ยงกุ้งกุลาดำครั้งที่ 5

* แสดงความแตกต่างที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

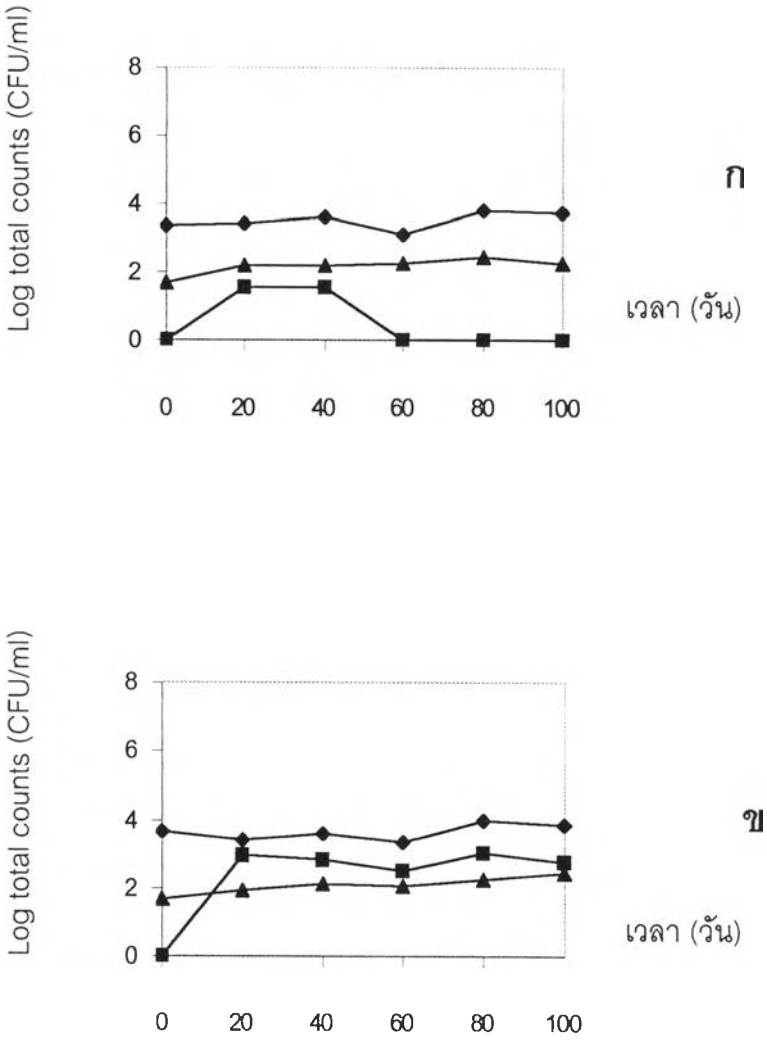


รูปที่ 25. การรอดชีวิตของกุ้งกุลาดำกลุ่มควบคุมและกลุ่มโพรไบโอติกระหว่างการเลี้ยงกุ้งกุลาดำครั้งที่ 5

* แสดงความแตกต่างที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

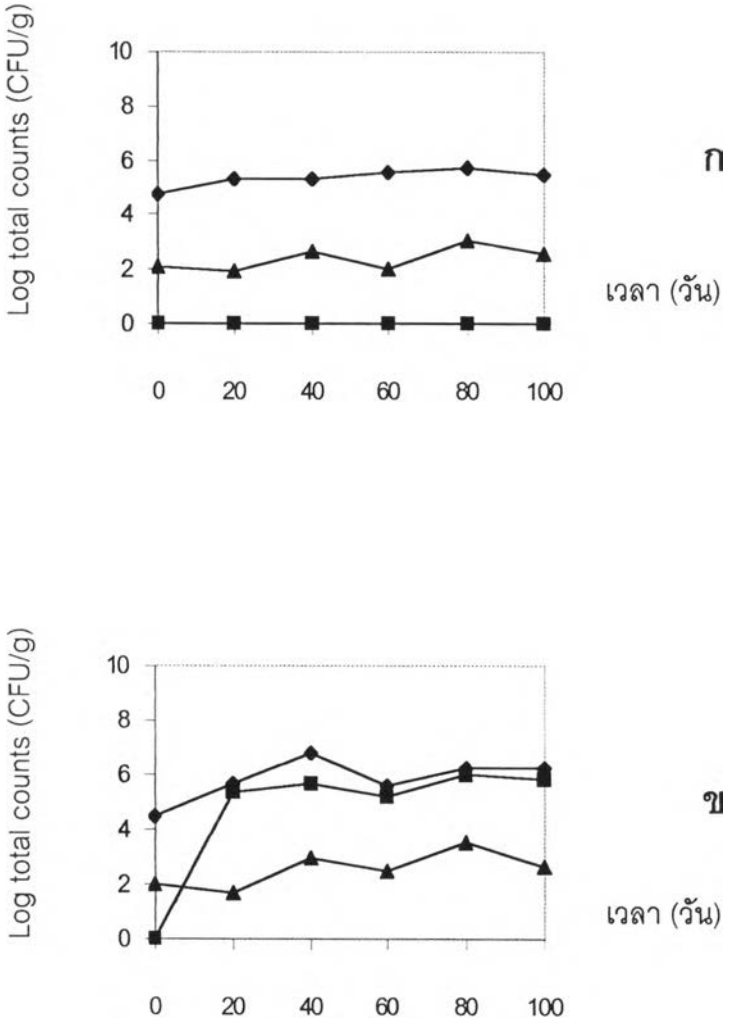
ตารางที่ 10. คุณภาพน้ำระหว่างการเลี้ยงกุ้งกุลาดำครั้งที่ 5 เป็นระยะเวลา 100 วัน (ตรวจสอบทุก 20 วัน)

คุณภาพน้ำ	ช่วงค่าคุณภาพน้ำ (ต่ำสุด-สูงสุด)	
	บ่อควบคุม	บ่อโพรไบโอติก
แอมโมเนียม (มก/ลิตร)	0 – 0.05	0 – 0.05
ไนไตรท์ (มก/ลิตร)	0.03 – 0.15	0 – 0.15
ฟอสเฟต (มก/ลิตร)	0 – 0.12	0 – 0.12
อุณหภูมิ (^{0}ซ)	29.8 – 30.8	29.4 – 30.5
พีเอช	7.6 – 8.3	7.6 – 8.4
ความเค็ม (ส่วนในพันส่วน)	4 - 5	4 – 5
อัลคาลินิตี้ (มก/ลิตร)	90 – 138	90 - 140
ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (มก/ลิตร)	5.8 – 7.8	5.5 – 7.9



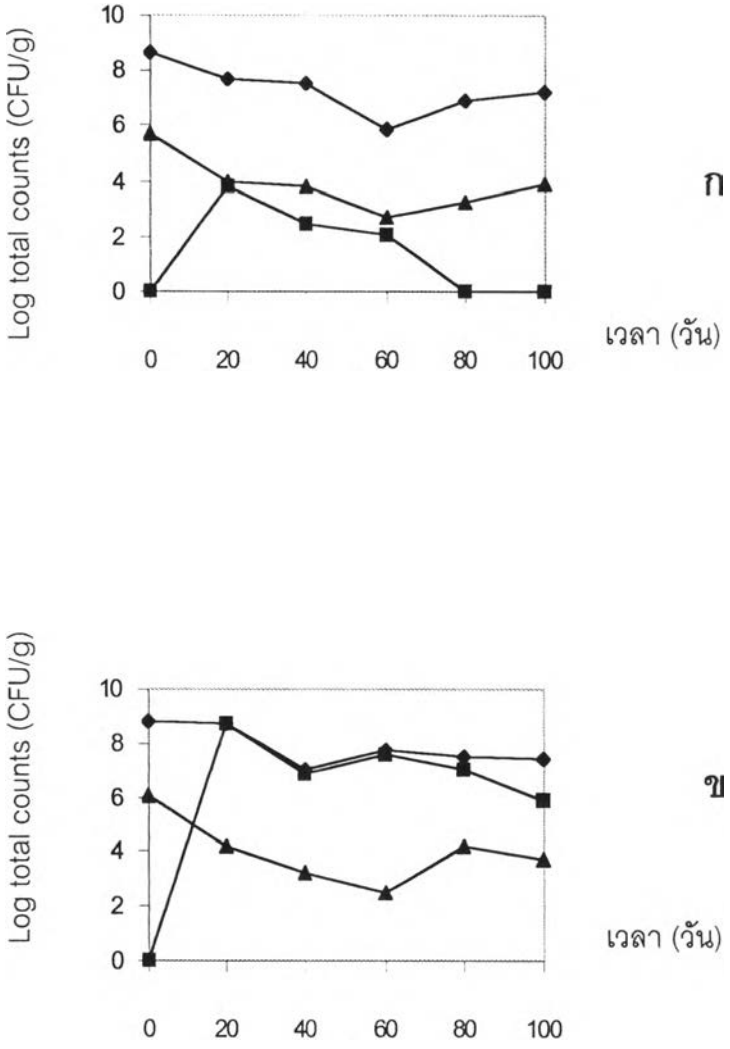
กลุ่มควบคุม (ก) กลุ่มโพรไบโอติก (ข)

รูปที่ 26. จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (-◆-) *Bacillus* S11 (-■-) และ *Vibrio* spp. (-▲-) ในน้ำเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำระหว่างการเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 5
แต่ละจุดเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 9 ซ้ำ



กลุ่มควบคุม (ก) กลุ่มโพรไบโอติก (ข)

รูปที่ 27. จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (-◆-) *Bacillus* S11 (-■-) และ *Vibrio* spp. (-▲-) ในตะกอนดินในบ่อกุ้งกุลาดำระหว่างการเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 5
แต่ละจุดเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 9 ซ้ำ



กลุ่มควบคุม (ก) กลุ่มโพรไบโอติก (ข)

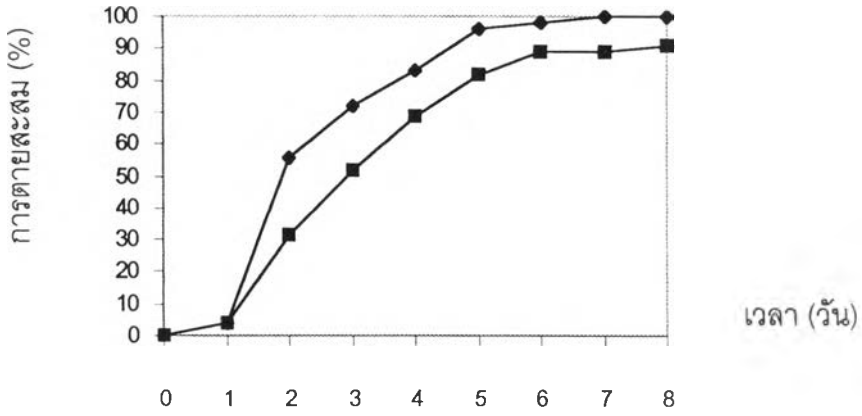
รูปที่ 28. จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (-◆-) *Bacillus* S11 (-■-) และ *Vibrio* spp. (-▲-) ในลำไส้กุ้งกุลาดำระหว่างการเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 5
แต่ละจุดเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 9 ซ้ำ

5.2 การทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค

รวบรวมกุ้งที่เหลือจากการเพาะเลี้ยง 100 วัน ในแต่ละกระชัง นำมาทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค ด้วยการใช้ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 1526 เป็นเชื้อก่อโรคโดยเติมเชื้อก่อโรคนี้ลงในน้ำเลี้ยงกุ้งจำนวน 2.83×10^7 CFU/ml เมื่อครบ 8 วันของการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค พบว่ากุ้งกลุ่มที่ให้อาหารผสมโพรไบโอติกมีการตายสะสม 90.74 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งน้อยกว่ากุ้งกลุ่มควบคุมที่มีการตายสะสม 100 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 29)

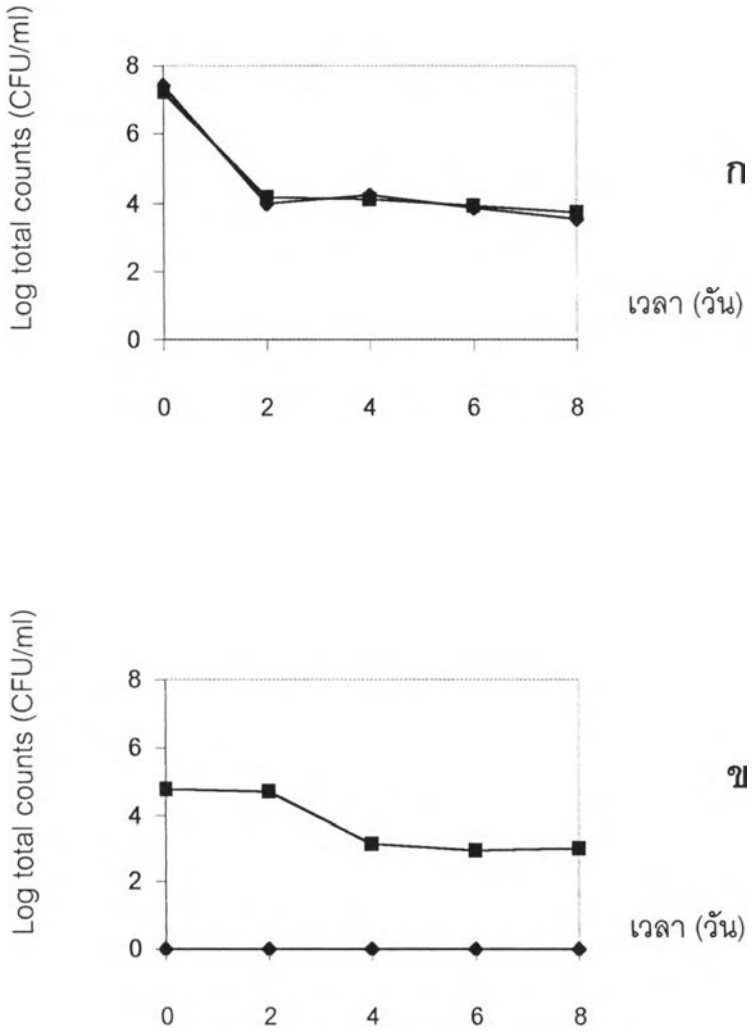
ติดตามจำนวน *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 1526 และ *Bacillus* S11 ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (รูปที่ 30) และในลำไส้กุ้งกุลาดำ (รูปที่ 31) ระหว่างการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 1526 เป็นเวลา 8 วัน พบว่าจำนวน *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 1526 ของทั้ง 2 กลุ่มการทดลองมีค่าใกล้เคียงกันทั้งในน้ำเลี้ยง (รูปที่ 30) และในลำไส้ (รูปที่ 31) ส่วน *Bacillus* S11 สามารถตรวจพบได้ทั้งในน้ำเลี้ยง (รูปที่ 30) และในลำไส้ของกุ้งกลุ่มโพรไบโอติก (รูปที่ 31) และตรวจไม่พบ *Bacillus* S11 ทั้งในน้ำเลี้ยงและในลำไส้ของกุ้งกลุ่มควบคุม

นำเฮปพาโตแพนเครียส (hepatopancrease) และลำไส้ของกุ้งที่ตายมาเพาะแยกเชื้อสาเหตุการเกิดโรค และแยกเชื้อ *Vibrio* spp. โคโลนีสีเขียวที่พบในน้ำเลี้ยง ลำไส้และในเฮปพาโตแพนเครียสของกุ้ง ในระหว่างการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค ไปทดสอบลักษณะทางชีวเคมี พบว่าเชื้อที่เป็นสาเหตุการตายของกุ้งและเชื้อที่พบในน้ำและลำไส้กุ้งระหว่างการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค มีลักษณะทางชีวเคมีเหมือน *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 1526 ที่ใช้ในการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคทุกประการ ดังแสดงผลในตารางที่ 11



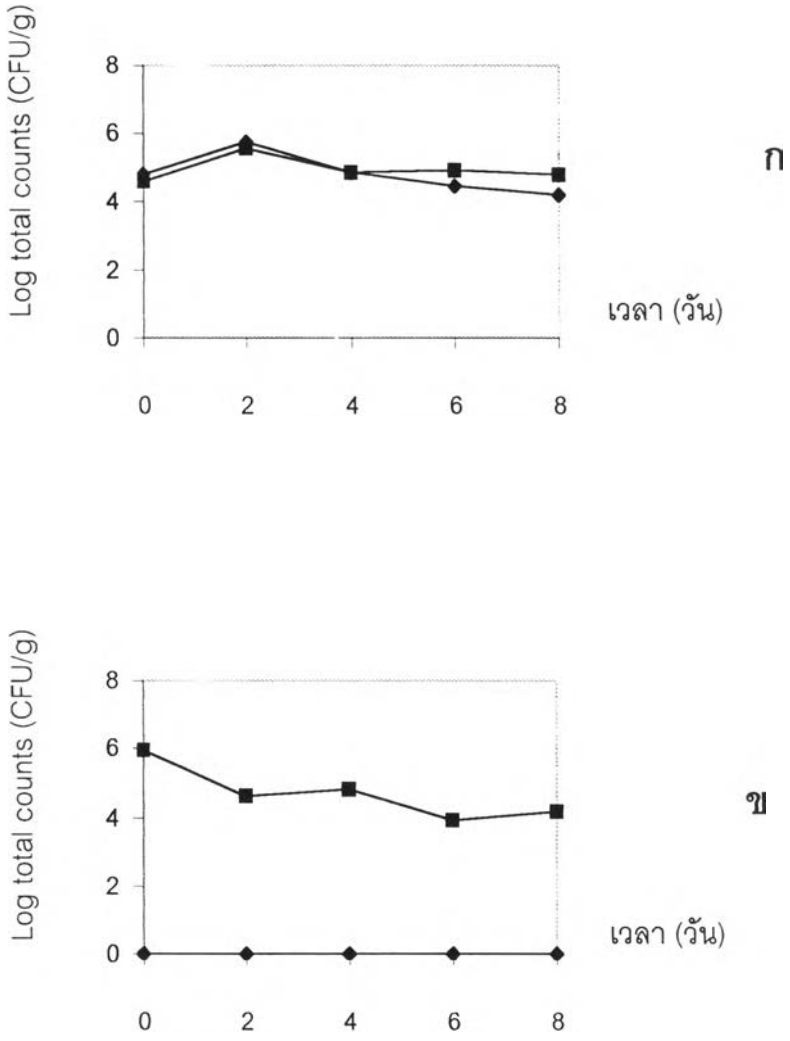
กลุ่มควบคุม (-◆-) กลุ่มโพรไบโอติก (-■-)

รูปที่ 29. การตายสะสม (cumulative mortality) ของกุ้งกุลาดำระหว่างการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 1526 เป็นเวลา 8 วัน
แต่ละจุดเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ
(กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ใส่ *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 มีการตายสะสม 0% ข้อมูลไม่ได้แสดงในรูป)



กลุ่มควบคุม (-◆-) กลุ่มโพรไบโอติก (-■-)

รูปที่ 30. จำนวน *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 1526 (ก) และ *Bacillus* S11 (ข) ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ระหว่างการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 1526 เป็นเวลา 8 วัน
แต่ละจุดเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ



รูปที่ 31. จำนวน *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 1526 (ก) และ *Bacillus* S11 (ข) ในลำไส้กุ้งกุลาดำระหว่างการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 1526 เป็นเวลา 8 วัน แต่ละจุดเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

ตารางที่ 11. ลักษณะการเจริญและการทดสอบทางชีวเคมีของ *Vibrio* spp. ที่แยกได้ระหว่างการทดสอบการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 1526 เทียบกับ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 1526 ของการเลี้ยงกุ้งกุลาดำครั้งที่ 5

ลักษณะที่ทดสอบ	*Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 1526	*Vibrio* spp.
Gram' s stain	Negative, Rod	Negative, Rod
Growth on TCBS	Green	Green
Luminescence	+	+
Pigment production	-	-
Motility	+	+
Indole	+	+
Oxidase	+	+
Catalase	+	+
Gas from D-glucose	-	-
Nitrate test	+	+
Methyl red	+	+
Voges-proskauer	-	-
Oxidative-fermentative test	Fermentative	Fermentative
Citrate utilization	-	-
Growth at:		
$4^{0}C$	-	-
$30^{0}C$	+	+
$37^{0}C$	+	+
$40^{0}C$	-	-
Na^{+} required for growth:		
0 %	-	-
1 %	+	+
3 %	+	+
6 %	+	+
8 %	-	-

ตารางที่ 11. (ต่อ)

10 %	-	-
Utilization of:		
D-glucose	+	+
L-arabinose	-	-
D-mannose	+	+
Sucrose	-	-
Cellobiose	+	+
Lactose	-	-

'+' = positive test, '-' = negative test

อาหารที่ใช้ทดสอบทุกชนิดเติม NaCl 1% (w/v) ยกเว้นการทดสอบ Na^+ required for growth: 0%