โพรไบโอติก *Bacillus subtilis* BP11สำหรับเสริมในอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำเพื่อป้องกัน *Vibrio harveyi*

นางสาวศิริเพ็ญ สังข์ชัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2546

ISBN 974-17-5160-5

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงการณ์มหาวิทยาลัย

T 2148 5914 x

PROBIOTIC *Bacillus subtilis* BP11 FOR SUPPLEMENTATION IN BLACK TIGER SHRIMP FEED FOR PREVENTION FROM *Vibrio harveyi*

Miss Siripen Sangchai

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2003

ISBN 974-17-5160-5

หัวข้อวิทยานิพนธ์	โพรไบโอติก *Bacillus subtilis* BP11สำหรับเสริมในอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำเพื่อป้องกัน *Vibrio harveyi*
โดย	นางสาวศิริเพ็ญ สังข์ชัย
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร.เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ประกิตติ์สิน สีหนนทน์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.หรรษา ปุณณะพยัคฆ์)

ศิริเพ็ญ สังข์ชัย : โพรไบโอติก *Bacillus subtilis* BP11สำหรับเสริมในอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำเพื่อป้องกัน *Vibrio harveyi* (PROBIOTIC *Bacillus subtilis* BP11 FOR SUPPLEMENTATION IN BLACK TIGER SHRIMP FEED FOR PREVENTION FROM *Vibrio harveyi*)

อ. ที่ปรึกษา : รศ. ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ หน้า. 131 ISBN 974-17-5160-5

การแจงนับแบคทีเรียจากทางเดินอาหารของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ พบปริมาณแบคทีเรียรวม $8.5x10^3$ – $5.9x10^7$CFU/กรัมลำไส้ เมื่อใช้อาหารจำเพาะตรวจพบ *Vibrio* sp. 3x10 – $1.31x10^2$CFU/กรัมลำไส้ และ *Bacillus* sp. $8.5x10^3$CFU/กรัมลำไส้ *Bacillus* spp. ทั้ง 3 ไอโซเลตที่แยกได้กล่าวคือ *Bacillus* P1, *Bacillus* P2 และ *Bacillus* P11 สามารถยับยั้งการเจริญของ *Vibrio harveyi* 639 และ *Escherichia coli* เมื่อนำแต่ละไอโซเลตมาผสมในอาหารเลี้ยงกุ้งในอัตราส่วน 2.0 % (น้ำหนัก/น้ำหนัก) และใช้เลี้ยงกุ้งกุลาดำ PL25 ในตู้กระจกขนาด 20 ลิตร เป็นเวลา 100 วันและชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 1526 พบว่ากุ้งในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* P11 มีการเจริญเติบโตและต้านทานโรคได้ดีกว่ากุ้งในกลุ่มอื่นๆ การพิสูจน์เอกลักษณ์ของ *Bacillus* P11 ด้วยวิธีทางชีวเคมีและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA จัดเป็น *Bacillus subtilis* โดยมีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของ *Bacillus subtilis* ที่มีรายงานไว้ใน GenBank 99 เปอร์เซ็นต์ การทดลองเลี้ยงกุ้งกุลาดำ PL25 ด้วยอาหารผสม *Bacillus* P11 ในบ่อปูนซีเมนต์ขนาด 400 ลิตร เป็นเวลา 100 วัน (2 ครั้ง) พบว่ากุ้งในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* P11 มีการเจริญเติบโตดีกว่ากุ้งกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และสามารถพบเซลล์แบคทีเรียรูปแท่งคล้าย Bacillus ที่บริเวณผนังลำไส้ของกุ้งในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* P11 ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด เมื่อนำกุ้งที่เลี้ยงครบ 100 วันมาชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 639 พบว่ากุ้งในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* P11 สามารถต้านทานโรคได้ดีกว่ากุ้งในกลุ่มควบคุม กล่าวคือกุ้งในกลุ่มควบคุมมีการตายสะสมมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์หลังจากชักนำให้เกิดโรคเป็นเวลา 4 และ 5 วันของการทดลองครั้งที่ 1 และ 2 ในขณะที่กุ้งในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหาร *Bacillus* P11 มีการตายสะสมเพียง 28 เปอร์เซ็นต์และ 20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สามารถตรวจพบ *V. harveyi* 639 ในตับกุ้งที่ตายด้วยวิธี Immunohistochemistry ตรวจไม่พบสารปฏิชีวนะในส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยง *Bacillus* P11 ด้วยวิธี Disk assay และ ชุดตรวจสอบสารปฏิชีวนะตกค้าง CM-Test และไม่พบสารปฏิชีวนะตกคางในเนื้อกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* P11 ด้วยชุดตรวจสอบสารปฏิชีวนะตกค้างในอาหาร CM-Test การตรวจหาปริมาณ *Bacillus* P11 ที่ผสมในอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำ พบ *Bacillus* P11 ~10^9 CFU/กรัม หลังจากเก็บอาหารเลี้ยงกุ้งที่ผสม *Bacillus* P11 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 5 เดือน และพบ ~ 10^8CFU/กรัม ในเดือนที่ 6

ภาควิชา จุลชีววิทยา.....	ลายมือชื่อนิสิต.....
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ปีการศึกษา 2546	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4472425423 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORDS: BACILLUS/PROBIOTICS/BLACK TIGER SHRIMP/FEED SUPPLEMENT / *Vibrio harveyi* 639

SIRIPEN SANGCHAI : PROBIOTIC *Bacillus subtilis* BP11 FOR SUPPLEMENTATION IN BLACK TIGER SHRIMP FEED FOR PREVENTION FROM *Vibrio harveyi*. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. SIRIRAT RENGPIPAT, Ph.D.,pp. 131 ISBN 974-17-5160-5

Total bacterial counts of Black tiger shrimp broodstocks's gastrointestinal tracts between $8.5X10^3$ – $5.9X10^7$ CFU/g were enumerated. Based on their growth on the selective media *Vibrio* spp. (3X10-$1.31X10^2$ CFU/g) and *Bacillus* spp. ($8.5X10^3$ CFU/g) were identified. *Bacillus* spp., designated as *Bacillus* P1 (BP1), *Bacillus* P2 (BP2) and *Bacillus* P11 (BP11) inhibited the growth of *Escherichia coli* and *Vibrio harveyi in vitro* were selected for shrimp culture tests. Each strain of the Bacillus was mixed into shrimp diet (2.0%w/w) and feeding shrimp three times a day in 20 litres aquarium. Starting from PL-25 for 2 months better growth of shrimps were detected in BP11 group with high survival of BP11 shrimp after being challenged with *V. harveyi* 1526 (10^7CFU/ml) by immersion technique. Larger scale of shrimp culture with BP11 were twice performed in 400 litres cement tanks for 100 days. It was found that growth and survival of shrimp fed with BP11 were higher than those of the control groups significantly at $p<0.05$. After 100 day all shrimp were challenged with 10^7CFU/ml of *V. harveyi* 639 by immersion technique, fifty percent of shrimp mortality was detected in the control groups in 4 and 5 days from first trial and second trial, respectively. Whereas 28% and 20% of moribund BP11-shrimp were found in first and second trial, consecutively. Confirmation of *V. harveyi* 639 infection on shrimp was performed by microbiological examination and immunohistochemical technique. Under scanning electron microscopic examination BP11 showed the adhesion on gastrointestinal tract's surface of BP11 shrimp. BP11 was identified as *Bacillus subtilis* by biochemical tests and 16S rDNA sequencing (99% homology with 16S rDNA of *B. subtilis*, Gen Bank). No detection of antibiotic in supernatant of BP11 36 h -culture by Disk assay and CM-test. No antibiotic residue in BP11 shrimp by CM-test were assayed. BP11 viability in shrimp diet remained at ~10^9CFU/g for 5 months after storage at 4°C and room temperature and decreased to ~10^8CFU/g after 6 months.

Department Microbiology	Student's signature.....
Field of study Industrial Microbiology	Advisor's signature.....
Academic year 2003	Co-advisor's signature.....

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ลงได้โดยได้รับความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษา รศ. ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ ที่ได้ให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็น ตลอดจนช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ รศ. ดร.ประกิตติ์สิน สีหนนทน์ ที่กรุณาเป็นประธานในการสอบและแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ รศ. ดร.สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล และ ผศ. ดร.หรรษา ปุณณะพยัคฆ์ ที่กรุณาเป็นคณะกรรมการในการสอบและแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณหัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รวมทั้งเพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆที่ให้ความช่วยเหลือให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ลงได้ด้วยดี

ขอขอบคุณหน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่หน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ลงได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ รศ. ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทร์วิโรฒ ประสานมิตร ที่กรุณาเอื้อเฟื้อสถานที่และให้ความรู้เรื่อง Immunohistochemistry รวมทั้งพี่ๆทุกคนที่ห้องปฏิบัติการ Immunohistochemistry ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทร์วิโรฒ ประสานมิตร ที่ให้ความช่วยเหลือให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ลงได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา พี่น้อง ที่ให้กำลังใจช่วยเหลือสนับสนุน ตั้งแต่เริ่มต้นจนเสร็จสมบูรณ์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ
กิตติกรรมประกาศ..... ฉ
สารบัญ..... ช
สารบัญตาราง.....ฌ
สารบัญรูป.....ญ
บทที่
1. บทนำ
1.1 ความเป็นมา..... 1
1.2 วัตถุประสงค์งานวิจัย.....3
2. วารสารปริทัศน์
2.1 กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) 4
2.2 โรคกุ้งและการรักษา.....9
2.3 โพรไบโอติก (Probiotics).....15
2.4 แบคเทอริโอซิน.....18
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....22
3. อุปกรณ์และวิธีการทดลอง
3.1 อุปกรณ์ที่สำคัญ.....25
3.2 เคมีภัณฑ์.....25
3.3 สารเคมีสำหรับ Immunohistochemistry.....26
3.4 สารเคมีสำหรับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA.....27
3.5 วิธีดำเนินการทดลอง.....27
4. ผลการทดลอง.....44
5. อภิปรายผลการทดลอง.....92

รายการอ้างอิง.....100
ภาคผนวก 106
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....131

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1.1 การส่งออกกุ้งของไทยเดือน ม.ค – ก.ย 2544-2545.....2

2.1 สมบัติและกลไกการออกฤทธิ์ของโพรไบโอติกและสารปฏิชีวนะ.....16

2.2 แบคทีเรียโพรไบโอติกที่ใช้ในการเลี้ยงสัตว์น้ำและทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรค.....18

2.3 ความแตกต่างระหว่างแบคเทอริโอซินและสารปฏิชีวนะ.....19

3.1 นิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับหาลำดับเบส 16S rDNA.....41

4.1 ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบโดยแบคทีเรียที่แยกได้จากทางเดินอาหารกุ้งกุลาดำ.....44

4.2 จำนวนแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆที่แยกได้จากทางเดินอาหารกุ้งกุลาดำเมื่อผสมในอาหารเลี้ยงกุ้งในอัตราส่วนต่างๆ.....45

4.3 อัตราการรอดชีวิตและน้ำหนักรวมของกุ้งกุลาดำในแต่ละกลุ่มการทดลอง.....56

4.4 อัตราการรอดชีวิตและน้ำหนักรวมของกุ้งกุลาดำในแต่ละกลุ่มการทดลอง.....70

4.5 ผลการจัดจำแนก *Bacillus* P11ด้วยชุดจัดจำแนก API50CHB.....86

4.6 ผลการตรวจหาสารปฏิชีวนะในกลุ่มต่างๆด้วยเครื่อง HPLC.....90

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

1 ผลน้ำหนักกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆที่แยกจากทางดินอาหารกุ้งกุลาดำ โดยเลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน 46

2 ผลความยาวกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆที่แยกจากทางดินอาหารกุ้งกุลาดำ โดยเลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน 46

3 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ, ความเค็ม, ปริมาณไนเตรท, ปริมาณฟอสเฟต, ค่าความเป็นกรด-ด่างในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำในกลุ่มควบคุมเป็นระยะเวลา 60 วัน.....47

4 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ, ความเค็ม, ปริมาณไนเตรท, ปริมาณฟอสเฟต, ค่าความเป็นกรด-ด่างในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำในกลุ่ม BP1 เป็นระยะเวลา 60 วัน.....48

5 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ, ความเค็ม, ปริมาณไนเตรท, ปริมาณฟอสเฟต, ค่าความเป็นกรด-ด่างในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำในกลุ่ม BP2 เป็นระยะเวลา 60 วัน.....48

6 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ, ความเค็ม, ปริมาณไนเตรท, ปริมาณฟอสเฟต, ค่าความเป็นกรด-ด่างในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำในกลุ่ม BP11 เป็นระยะเวลา 60 วัน.....49

7 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ, ความเค็ม, ปริมาณไนเตรท, ปริมาณฟอสเฟต, ค่าความเป็นกรด-ด่างในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำในกลุ่ม BS11 เป็นระยะเวลา 60 วัน.....49

8 ปริมาณแบคทีเรียรวมในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำในบ่อขนาด 20 ลิตร เป็นเวลา 60 วัน... .50

9 ปริมาณแบคทีเรีย *Bacillus* sp.ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำในบ่อขนาด 20 ลิตร เป็นเวลา 60 วัน..... 51

10 ปริมาณสปอร์ *Bacillus* sp.ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำในบ่อขนาด 20 ลิตร เป็นเวลา 60 วัน..... 51

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

11 ปริมาณแบคทีเรียรวมในตะกอนและอุจจาระในบ่อขนาด 20 ลิตร เป็นเวลา 60 วัน..52
12 ปริมาณ *Bacillus* sp.ในตะกอนและอุจจาระในบ่อขนาด 20 ลิตร เป็นเวลา 60 วัน.. 53
13 ปริมาณสปอร์ *Bacillus* sp.ในตะกอนและอุจจาระในบ่อขนาด 20 ลิตร เป็นเวลา 60 วัน.....53
14 การตายสะสมของกุ้งกุลาดำที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 1526..... 54
15 ผลของน้ำหนักกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยแบคทีเรีย BP11 ที่แยกจากทางเดินอาหารกุ้งกุลาดำ โดยเลี้ยงเป็นเวลา 100 วัน.....55
16 ผลของความยาวกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยแบคทีเรีย BP11 ที่แยกจากทางเดินอาหารกุ้งกุลาดำ โดยเลี้ยงเป็นเวลา 100 วัน.....55
17 การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ, ความเค็ม, ปริมาณไนเตรท, ปริมาณไนไตรท์, ปริมาณแอมโมเนีย, ปริมาณฟอตเฟต, ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (DO) และค่าความเป็นกรด - ด่างในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำในกลุ่มควบคุม เป็นระยะเวลา 100 วัน..... 57
18 การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ, ความเค็ม, ปริมาณไนเตรท, ปริมาณไนไตรท์, ปริมาณแอมโมเนีย, ปริมาณฟอตเฟต, ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (DO) และค่าความเป็นกรด – ด่างในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำในกลุ่ม BP11 เป็นระยะเวลา 100 วัน..... 57
19 ปริมาณแบคทีเรียรวมในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำในบ่อปูนขนาด 400 ลิตร เป็นระยะเวลา 100 วัน..... 58
20 ปริมาณ *Bacillus* P11ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำในบ่อปูนขนาด 400 ลิตร เป็นระยะเวลา 100 วัน..... 59
21 ปริมาณสปอร์ของ *Bacillus* P11ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำในบ่อปูนขนาด 400 ลิตร เป็นระยะเวลา 100 วัน.....59
22 แสดงปริมาณ *Vibrio* sp.ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำในบ่อปูนขนาด 400 ลิตร เป็นระยะเวลา 100 วัน..... .60

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

23 ปริมาณแบคทีเรียรวมในอุจจาระและตะกอนในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำขนาด 400 ลิตร เป็นระยะเวลา 100 วัน.....61

24 ปริมาณ *Bacillus* P11ในอุจจาระและตะกอนในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำขนาด 400 ลิตร เป็นระยะเวลา 100 วัน.....61

25 ปริมาณสปอร์ของ *Bacillus* P11ในอุจจาระและตะกอนในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำขนาด 400ลิตร เป็นระยะเวลา 100 วัน.....62

26 ปริมาณ *Vibrio* sp.ในอุจจาระและตะกอนในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำขนาด 400 ลิตร เป็นระยะเวลา 100 วัน.....62

27 ปริมาณแบคทีเรียรวม, ปริมาณ *Bacillus* P11 (BP11) และปริมาณ *Vibrio* sp. ในลำไส้กุ้งกุลาดำในกลุ่มควบคุมหลังการเลี้ยงเป็นเวลานาน 100 วัน.....63

28 ปริมาณแบคทีเรียรวม, ปริมาณ *Bacillus* P11 (BP11) และปริมาณ *Vibrio* sp. ในลำไส้กุ้งกุลาดำในกลุ่มที่เลี้ยงด้วย *Bacillus* P11 (BP11) หลังการเลี้ยงเป็นเวลานาน 100 วัน..... .63

29 เปอร์เซ็นต์การตายสะสมของกุ้งกุลาดำระหว่างการชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 639..... 64

30 ปริมาณแบคทีเรียรวมในน้ำเลี้ยงกุ้งระหว่างการชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 639.....65

31 ปริมาณ *Bacillus* P11 ในน้ำเลี้ยงกุ้งระหว่างการชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 639.....65

32 ปริมาณ *Vibrio* sp. ในน้ำเลี้ยงกุ้งระหว่างการชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 639.....66

33 ปริมาณแบคทีเรียรวม, ปริมาณ *Bacillus* P11 (BP11) และปริมาณ *Vibrio* sp. ในลำไส้กุ้งกุลาดำในกลุ่มควบคุมหลังการเลี้ยงเป็นเวลานาน 100 วันและชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 639..... 67

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

34 ปริมาณแบคทีเรียรวม, ปริมาณ *Bacillus* P11 (BP11) และปริมาณ *Vibrio* sp. ในลำไส้กุ้งกุลาดำในกลุ่มที่เลี้ยงด้วย *Bacillus* P11 (BP11) หลังการเลี้ยงเป็นเวลานาน 100 วันและชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 639..... 67

35 ปริมาณ *V. harveyi* 639 ตับกุ้งที่ตายเนื่องจากชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 639..... 68

36 ผลของน้ำหนักกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยแบคทีเรีย BP11 ที่แยกจากทางเดินอาหารแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ โดยเลี้ยงเป็นระยะเวลา 100 วัน.....69

37 ผลของความยาวกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยแบคทีเรีย BP11 ที่แยกจากทางเดินอาหารแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำโดยเลี้ยงเป็นระยะเวลา 100 วัน..... 69

38 การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ, ความเค็ม, ปริมาณไนเตรท, ปริมาณไนไตรท์, ปริมาณแอมโมเนีย, ปริมาณฟอตเฟต, ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (DO) และค่าความเป็นกรด - ด่างในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำในกลุ่มควบคุมเป็นระยะเวลา 100 วัน..... 71

39 แสดงการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ, ความเค็ม, ปริมาณไนเตรท, ปริมาณไนไตรท์, ปริมาณแอมโมเนีย, ปริมาณฟอตเฟต, ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (DO) และค่าความเป็นกรด – ด่างในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำในกลุ่ม BP11 เป็นระยะเวลา 100 วัน..... 71

40 ปริมาณแบคทีเรียรวมในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำในบ่อปูนขนาด 400 ลิตร เป็นระยะเวลา 100 วัน..... 72

41 ปริมาณ *Bacillus* P11ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำในบ่อปูนขนาด 400 ลิตร เป็นระยะเวลา 100 วัน..... 73

42 ปริมาณสปอร์ของ *Bacillus* P11ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำในบ่อปูนขนาด 400 ลิตร เป็นระยะเวลา 100 วัน..... 73

43 ปริมาณ *Vibrio* sp. ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำในบ่อปูนขนาด 400 ลิตร เป็นระยะเวลา 100 วัน..... 74

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

44 ปริมาณแบคทีเรียรวมในอุจจาระและตะกอนในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำในบ่อปูน ขนาด 400 ลิตร เป็นระยะเวลา 100 วัน.....75

45 ปริมาณ *Bacillus* P11ในอุจจาระและตะกอนในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำในบ่อปูน ขนาด 400 ลิตร เป็นระยะเวลา 100 วัน..... 75

46 ปริมาณสปอร์ของ *Bacillus* P11ในอุจจาระและตะกอนในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ในบ่อปูนขนาด 400 ลิตร เป็นระยะเวลา 100 วัน.....76

47 ปริมาณ *Vibrio* sp. ในอุจจาระและตะกอนในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำในบ่อปูน ขนาด 400 ลิตร เป็นระยะเวลา 100 วัน.....76

48 ปริมาณแบคทีเรียรวม, ปริมาณ *Bacillus* P11 (BP11) และปริมาณ *Vibrio* sp. ในลำไส้กุ้งกุลาดำในกลุ่มควบคุมหลังการเลี้ยงเป็นเวลานาน 100 วัน.....77

49 ปริมาณแบคทีเรียรวม, ปริมาณ *Bacillus* P11 (BP11) และปริมาณ *Vibrio* sp. ในลำไส้กุ้งกุลาดำในกลุ่ม BP11หลังการเลี้ยงเป็นเวลานาน 100 วัน.....77

50 เปอร์เซ็นต์การตายสะสมของกุ้งกุลาดำระหว่างการชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 639..... 78

51 ปริมาณแบคทีเรียรวมในน้ำเลี้ยงกุ้งระหว่างการชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 639..... 79

52 ปริมาณ *Bacillus* P11ในน้ำเลี้ยงกุ้งระหว่างการชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 639..... 80

53 ปริมาณ *Vibrio* sp.ในน้ำเลี้ยงกุ้งระหว่างการชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 639..... 80

54 ปริมาณแบคทีเรียรวม, ปริมาณ *Bacillus* P11 (BP11) และปริมาณ *Vibrio* sp. ในลำไส้กุ้งกุลาดำในกลุ่มควบคุมหลังการเลี้ยงเป็นเวลานาน 100 วันและชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 639..... 81

55 ปริมาณแบคทีเรียรวม, ปริมาณ *Bacillus* P11 (BP11) และปริมาณ *Vibrio* sp. ในลำไส้กุ้งกุลาดำในกลุ่ม BP11 หลังการเลี้ยงเป็นเวลานาน 100 วันและชักนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* 639.....82

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

56 ปริมาณ *V. harveyi* 639 ตับกุ้งที่ตายเนื่องจากชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 639..... 82

57 เนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลืองกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ *V. harveyi* 639 โดยสังเกตจากตำแหน่งที่ลูกศรชี้เป็นบริเวณเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อ *V. harveyi* 639 (ด้านขวา) หลังจากการย้อมด้วยสีฮีมาทอกซิลินและอิโอซิน เปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลืองในตำแหน่งเดียวกัน (ด้านซ้าย)..... 83

58 เนื้อเยื่อลำไส้ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* P11 เป็นเวลานาน 100 วัน โดยสังเกตเห็นเซลล์แบคทีเรียที่ยึดเกาะกับผนังลำไส้ (ก และ ข) เปรียบเทียบกับลำไส้ของกุ้งในกลุ่มควบคุมซึ่งไม่พบเซลล์แบคทีเรียที่ผนังลำไส้ (ค)..... 84

59 ปริมาณ BP11 และสปอร์ของ BP11 เมื่อผสมในอาหารเลี้ยงกุ้งและเก็บที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลานาน 6 เดือน..... 85

60 ปริมาณ BP11 และสปอร์ของ BP11 เมื่อผสมในอาหารเลี้ยงกุ้งและเก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 6 เดือน..... 85

61 ลักษณะเซลล์ *Bacillus* P11 (ก) และสปอร์ (ข)..... 86

62 การตรวจหาสารปฏิชีวนะที่สร้างจาก *Bacillus* P11 กับเชื้อทดสอบ *B. subtilis* 1163 (ก) และ *M. luteus* (ข) 89

63 ผลการตรวจหาสารปฏิชีวนะในเนื้อกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* P11 เป็นเวลานาน 100 วัน..... 91