รายงานฉบับสมบูรณ์

งบประมาณประจำปี 2543

โครงการวิจัย

การเสริมโพรไบโอติก *Bacillus* สายพันธุ์ S11 ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำในระดับบ่อดิน

(Supplement of Probiotic-*Bacillus* strain S11 in black tiger shrimp, *Penaeus monodon* culture at the earthern pond level)

โดย

ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จฬ
วท 15
010820

รายงานฉบับสมบูรณ์

งบประมาณประจำปี 2543

โครงการวิจัย

การเสริมโพรไบโอติก *Bacillus* สายพันธุ์ S11 ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำในระดับบ่อดิน

(Supplement of Probiotic-*Bacillus* strain S11 in black tiger shrimp, *Penaeus monodon* culture at the earthern pond level)

โดย

ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

16 มี.ค. 2546 I19361403

สารบัญ

	หน้า
แบบเสนอโครงงานวิจัย	ก – ง
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ความเป็นมา	2-6
บทที่ 3 วิธีดำเนินการทดลอง	7-10
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	11-41
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	42
เอกสารอ้างอิง	43-44

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เลขหมู่ จฬ
ดท 15
เลขทะเบียน 010620
วัน.เดือน.ปี 8 มค. 45

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

1.จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด, *Bacillus* S11 และ *Vibrio* spp. ในลำไส้กุ้งกุลาดำระหว่างการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ครั้งที่ 1 12

2.จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด, *Bacillus* S11 และ *Vibrio* spp. ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำระหว่างการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ครั้งที่ 1 13

3.จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด, *Bacillus* S11 และ *Vibrio* spp. ในดินตะกอนในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำระหว่างการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ครั้งที่ 1 14

4.น้ำหนักตัวของกุ้งกุลาดำกลุ่มโพรไบโอติกและกลุ่มควบคุมระหว่างการเลี้ยงกุ้งกุลาดำครั้งที่ 1 15

5.จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด, *Bacillus* S11 และ *Vibrio* spp. ในลำไส้กุ้งกุลาดำระหว่างการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ครั้งที่ 2 18

6.จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด, *Bacillus* S11 และ *Vibrio* spp. ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำระหว่างการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ครั้งที่ 2 19

7.จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด, *Bacillus* S11 และ *Vibrio* spp. ในดินตะกอนในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำระหว่างการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ครั้งที่ 2 20

8.ความยาว(เซนติเมตร) และน้ำหนัก(กรัม) ของกุ้งกุลาดำกลุ่มโพรไบโอติกบ่อที่ 1 และกลุ่มโพรไบโอติกบ่อที่ 2 ระหว่างการเลี้ยงกุ้งกุลาดำครั้งที่ 2 21

9.ปริมาณ *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 ในลำไส้กุ้งกุลาดำระหว่างการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 เป็นเวลา 8 วัน 22

10.ปริมาณ *Bacillus* S11 ในลำไส้กุ้งกุลาดำระหว่างการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 เป็นเวลา 8 วัน 22

11.ปริมาณ *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำระหว่างการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 เป็นเวลา 8 วัน 23

12.ปริมาณ *Bacillus* S11 ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำระหว่างการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 เป็นเวลา 8 วัน 23

13.การตายสะสม (cumulative mortality) ของกุ้งกุลาดำระหว่างการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 เป็นเวลา 8 วัน 24

14.จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด, *Bacillus* S11 และ *Vibrio* spp. ในลำไส้กุ้งกุลาดำระหว่าง 27

การเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ครั้งที่ 3
15.จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด, *Bacillus* S11 และ *Vibrio* spp. ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำระหว่าง การเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ครั้งที่ 3 28
16.จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด, *Bacillus* S11 และ *Vibrio* spp. ในดินตะกอนในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำระหว่างการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ครั้งที่ 3 29
17.ความยาว(เซนติเมตร) และน้ำหนัก(กรัม) ของกุ้งกุลาดำกลุ่มควบคุม และกลุ่มโพรไบโอติก ระหว่างการเลี้ยงกุ้งกุลาดำครั้งที่ 3 30
18.จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด, *Bacillus* S11 และ *Vibrio* spp. ในลำไส้กุ้งกุลาดำระหว่าง การเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ครั้งที่ 4 33
19.จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด, *Bacillus* S11 และ *Vibrio* spp. ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำระหว่าง การเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ครั้งที่ 4 34
20.จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด, *Bacillus* S11 และ *Vibrio* spp. ในดินตะกอนในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำระหว่างการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ครั้งที่ 4 35
21.ความยาว(เซนติเมตร) และน้ำหนัก(กรัม) ของกุ้งกุลาดำกลุ่มควบคุม และกลุ่มโพรไบโอติก ระหว่างการเลี้ยงกุ้งกุลาดำครั้งที่ 4 36
22.อัตราการรอด (Survival Rate (%)) ภายหลังจากการเลี้ยงกุ้งกุลาดำเป็นระยะเวลา 100 วัน ของการเลี้ยงกุ้งกุลาดำครั้งที่ 4 37
23. ปริมาณ *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 ในลำไส้กุ้งกุลาดำระหว่างการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 เป็นเวลา 10 วัน 38
24.ปริมาณ *Bacillus* S11 ในลำไส้กุ้งกุลาดำระหว่างการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 เป็นเวลา 10 วัน 38
25.ปริมาณ *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำระหว่างการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 เป็นเวลา 10 วัน 39
26.ปริมาณ *Bacillus* S11 ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำระหว่างการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 เป็นเวลา 10 วัน 39
27. การตายสะสม (cumulative mortality) ของกุ้งกุลาดำระหว่างการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 เป็นเวลา 10 วัน 40

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. คุณภาพน้ำตลอดระยะเวลาการเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 1	16
2. คุณภาพน้ำตลอดระยะเวลาการเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 2	25
3. คุณภาพน้ำตลอดระยะเวลาการเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 3	31
4. คุณภาพน้ำตลอดระยะเวลาการเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 4	41

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ แบบ ว-1

แบบเสนอโครงการวิจัย

ประกอบการของงบประมาณประจำปี 2543

ส่วนที่ 1 โครงการวิจัย

1. ชื่อโครงการ การให้โพรไบโอติก *Bacillus* สายพันธุ์ S11 เลี้ยงกุ้งกุลาดำในบ่อดิน
   Probiotic-*Bacillus* strain S11 feeding for black tiper shrimp, *Penaeus monodon* in the earthern pond culture.
2. หน่วยงานที่รับผิดชอบงานวิจัย ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
3. ผู้วิจัยหลัก รศ. ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ และผู้ช่วยวิจัย
   สัดส่วนการทำงาน ผู้วิจัยหลัก 35% และผู้ช่วยวิจัย 65%
4. โครงการนี้เป็นโครงการส่วนหนึ่งในโครงการใหญ่เรื่อง การใช้โพรไบโอติกเสริมในอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ
   หัวหน้าโครงการ รศ. ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์
   หัวหน้าโครงการร่วม 1. ศ.ดร.เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต
   2. ศ. ดร.สมศักดิ์ ดำรงเลิศ
   ผู้วิจัยร่วม รศ. ดร. สมเกียรติ ปิยะธีระฐิติวรกุล
5. หน่วยงานวิจัยร่วม - สถาบันทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
   - หน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีทางทะเล ศูนย์พันธุวิศวกรรมแห่งชาติ
   - ภาควิชาเคมีเทคนิค จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
6. ประเภทของงานวิจัย งานประยุกต์
7. สาขาวิชาการที่ทำการวิจัย จุลชีววิทยา, วิทยาศาสตร์ทางทะเล
8. คำสำคัญของเรื่องที่ทำการวิจัย Probiotics, *Bacillus* strain S11, black tiper shrimp, *Penaeus monodon*
9. ความสำคัญที่มาของปัญหา และการทบทวนเอกสาร

อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำมีความสำคัญมากต่อประเทศไทย เนื่องจากในช่วงปี 2538-2539 ประเทศไทยเป็นผู้ผลิตกุ้งรายใหญ่เป็นอันดับหนึ่งของโลก โดยมีปริมาณการส่งออกกุ้งกุลาดำแช่แข็งคิดเป็นมูลค่าถึงประมาณ 5,000 ล้านบาทต่อปี แต่ต่อมาผลผลิตเริ่มลดลง ทั้งนี้เกิดจากความหายนะทางธรรมชาติ เช่น น้ำท่วม, ฝนตก มลพิษจากชุมชนและอุตสาหกรรม และการเกิดโรค เช่น การติดเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* spp. ได้แก่ *V. parahaemolyticus*,

V. harveyi การติดเชื้อไวรัส เช่น ไวรัสหัวเหลือง (Yellow head virus, YHV) ไวรัสตัวแดงจุดขาว (Systemic Ectodermal Mesodermal Baculovirus, SEMBV) ไวรัสเอ็มบีวี (Monodon Baculovirus, MBV) การติดเชื้อราและปาราสิตอื่น ๆ ซึ่งทำให้เกิดความเสียหายต่อเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้ง

ในการรักษาหรือป้องกันโรคในกุ้งกุลาดำ โดยเฉพาะการติดเชื้อไวรัส ยังไม่มียาหรือสารเคมีใด ๆ ใช้รักษาได้ ส่วนในโรคติดเชื้อแบคทีเรียสามารถใช้สารปฏิชีวนะในการรักษาแต่จะมีปัญหาของการตกค้างของสารปฏิชีวนะในเนื้อกุ้ง ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อการส่งออก เนื่องจากตามกฎของ USDA (United State Department of Agriculture, US) ได้กำหนดให้มาตรฐานตกค้างของสารปฏิชีวนะออกซีเตตราซัยคลินตกค้างในเนื้อสัตว์ได้สูงสุดไม่เกิน 0.1 ส่วนในล้านส่วน (ppm) ที่สำคัญอีกก็คือการติดเชื้อในกุ้งกุลาดำต้องการวินิจฉัยโรคที่ถูกต้อง โดยผู้เชี่ยวชาญ เพื่อเลือกใช้สารปฏิชีวนะที่เหมาะสม ไม่เหลือตกค้างในเนื้อกุ้ง และไม่ทำให้เกิดปัญหาการดื้อยาตามมาภายหลังอีก และผลจากการใช้สารปฏิชีวนะในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำติดต่อกันเป็นเวลานาน ๆ กอปรกับใช้ไม่ถูกวิธี จะส่งผลให้การรักษาไม่ได้ผล ยังเป็นการทำลายแบคทีเรีย/ที่เป็น/เชื้อประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหาร/ทำหน้าที่ช่วยย่อยอาหารที่มีประโยชน์ต่อตัวกุ้ง ส่วนผลให้กุ้งย่อยและได้มีการสะสมตกค้างสารปฏิชีวนะในเนื้อกุ้งที่ให้ผลอันตรายโดยตรงต่อผู้บริโภค

แนวทางการป้องกันโรคติดเชื้อในกุ้งกุลาดำ ในปัจจุบันได้เกิดการเสริมสร้างความแข็งแรงและเสริมความต้านทานให้แก่กุ้ง เช่น การให้วัคซีน การให้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และอีกแนวทางหนึ่งคือการสร้างสมดุลย์แบคทีเรียประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำ โดยมีการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีสมบัติโพรไบโอติกเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

การใช้แบคทีเรียสมบัติโพรไบโอติกแทนการใช้สารปฏิชีวนะ เริ่มขึ้นเมื่อปี ค.ศ.1977 Baird ได้ใช้ *Lactobacillus* spp. เสริมในอาหารหมู และได้ผลน้ำหนักตัวหมูเพิ่มขึ้น และยังมีการศึกษาใช้แบคทีเรียกลุ่มโพรไบโอติกในอุตสาหกรรมไก่ ซึ่งได้ผลดีเช่นกัน

ในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ มีผู้ทำการวิจัยเกี่ยวกับการใช้โพรไบโอติกน้อยมาก แต่ในปี ค.ศ.1995 กลุ่มวิจัย Rengpipat et al.(1998) ให้คัดเลือกดำเนินการวิจัย *Bacillus* สายพันธุ์ S11 จากทางเดินอาหารของแม่กุ้งกุลาดำจากอ่าวไทยที่มีสมบัติโพรไบโอติก และได้ทำการทดลองเลี้ยงกุ้งกุลาดำในระดับบ่อปูนซีเมนต์ ขนาดบรรจุน้ำ 0.5 ตัน ได้สำเร็จ กล่าวคือกุ้งกุลาดำมีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น, มีความสามารถในการต้านทานต่อการเกิดโรคเรืองแสงได้ 100% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับโพรไบโอติก ดังนั้นงานวิจัยที่จะดำเนินการต่อนี้จะขยายระดับการเลี้ยงกุ้งกุลาดำเป็นระดับการเลี้ยงในบ่อดินเลียนแบบการเลี้ยงของเกษตรกร เพื่อติดตามผลการใช้

Bacillus สายพันธุ์ S11 โดยจะติดตามการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ และตรวจดูสภาพของกุ้งกุลาดำ แล้วนำผลไปประยุกต์ใช้จริงในเชิงพาณิชย์

10. วัตถุประสงค์โครงการ

ทดสอบศักยภาพการใช้ *Bacillus* สายพันธุ์ S11 ที่มีสมบัติโพรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำระดับบ่อดิน

11. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

กุ้งกุลาดำมีสุขภาพแข็งแรง สามารถต้านต่อการติดเชื้อ มีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น ผลทางอ้อม คือ การลดปัญหาการใช้และการตกค้างของสารปฏิชีวนะ

12. หน่วยงานวิจัยที่นำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

อุตสาหการการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

13. การวิจัยที่เกี่ยวข้องและคล้ายคลึงกับงานวิจัยที่ทำ

14. เอกสารอ้างอิง

15. ระเบียบวิธีวิจัย

1. เตรียม *Bacillus* สายพันธุ์ S11 จำนวนมาก

ให้ความร่วมมือจาก ศ.ดร.สมศักดิ์ ดำรงเลิศ ในการออกแบบและลงทุนสร้าง Batch fermenter ขนาด 30 ลิตร เพื่อเลี้ยงแบคทีเรียจำนวนมาก ทั้งนี้จากข้อมูลที่เคยศึกษามาก่อนถึงชนิดและสมบัติทางสรีระแบคทีเรียดังกล่าว ทำให้มีการออกแบบอุปกรณ์ให้ถูกต้อง ทั้งนี้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแบบราคาต้นทุนประหยัดในการเลี้ยงแบคทีเรียดังกล่าว เซลล์แบคทีเรียได้รับการเก็บเกี่ยวและปั่นแยกส่วนน้ำใสทิ้งและเก็บเซลล์ไว้ที่ –20 องศาเซลเซียส ก่อนใช้

2. เตรียมอาหารกุ้ง

นำเซลล์แบคทีเรียที่ได้มาผสมรวมกับอาหารกุ้งให้เป็นเนื้อเดียวกันและนำไปอัดเม็ด และเก็บไว้ที่ -20°C ก่อนนำมาใช้ ปรับวัดให้แบคทีเรียมีในอาหารกุ้ง ประมาณ 10^{10} CFU/กรัม

3. เตรียมบ่อกุ้ง

ได้รับความอนุเคราะห์เรื่องสถานที่จากคณะวิจัยของ ศ.ดร.เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต และ รศ. ดร. สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล ในการเตรียมบ่อดินขนาดประมาณ 1,000 ตร.ม. ต่อบ่อ จำนวน 2 บ่อ และปรับจัดน้ำให้มีความเค็มประมาณ 4 ส่วนในพันส่วน (ppt)

4.เลี้ยงกุ้งกุลาดำ

ปล่อยกุ้งระยะโพสลาวา (PL) ประมาณ 40,000 ตัวต่อบ่อ ให้อาหาร 3 เวลาต่อวันในอัตรา 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว และทำการเลี้ยงเป็นระยะเวลาประมาณ 100 วัน

5. ติดตามการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ ปริมาณจุลินทรีย์และคุณภาพน้ำบางประการ ในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

ทุก 20 วันของการเลี้ยงกุ้ง จนครบกำหนด 100 วันของการเลี้ยง จะทำการ

สุ่มเก็บตัวอย่างกุ้ง ชั่งน้ำหนัก ตรวจหาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด และ *Bacillus* สายพันธุ์ S11

ในลำไส้กุ้งกุลาดำ

เก็บตัวอย่างน้ำ เพื่อตรวจหาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด *Bacillus* สายพันธุ์ S11 และคุณภาพน้ำบางประการ เช่น pH, Dissolved Oxygen, salinity, temperature, Phosphate, Nitrite, Ammonium เป็นต้น

เก็บตัวอย่างดินตะกอน เพื่อตรวจหาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด *Bacillus* สายพันธุ์ S11

6.การทดสอบ การเหนี่ยวนำให้เกิดโรค (Challenge Test)

นำกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในการทดลองบางส่วน จากทั้ง 2 กลุ่มการทดลอง มาทำการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคเรืองแสง โดยการแช่ในเซลล์แขวนลอย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 1526 เข้มข้น 10^7 CFU/ml ระดับห้องปฏิบัติการ ติดตามอัตราการรอด และตรวจหาปริมาณจุลินทรีย์ในลำไส้กุ้งกุลาดำ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

อุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งนับเป็นอุตสาหกรรมที่มีความสำคัญมากประเภทหนึ่งในบรรดาอุสาหกรรมสัตว์น้ำเศรษฐกิจซึ่งเป็นที่นิยมเลี้ยงกันทั่วโลก และกุ้งกุลาดำเป็นกุ้งที่นิยมเลี้ยงกันมากที่สุดในโลก โดยมีส่วนแบ่งการเลี้ยง 52% จากกุ้งทุกชนิด ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีการส่งออกกุ้งแช่แข็งมากที่สุดเป็นอันดับ1 ของโลก ด้วยเหตุที่การเลี้ยงกุ้งให้ค่าตอบแทนที่สูงมากในระยะเวลาอันสั้นทำให้มีการขยายพื้นที่เพาะเลี้ยงจากชายฝั่งทะเลที่มีพื้นที่จำกัดสู่เขตพื้นที่น้ำจืดอย่างแพร่หลาย ซึ่งปัจจุบันเริ่มนิยมนำระบบการเลี้ยงกุ้งแบบใช้ระบบหมุนเวียนน้ำแบบปิดที่ไม่ส่งผลต่อสิ่งแวดล้อมมาใช้ อย่างไรก็ตามปัญหาสำคัญปัญหาหนึ่งในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำคือ การเกิดโรคติดเชื้อแบคทีเรีย เช่น โรคเรืองแสง ซึ่งเกิดจาก *Vibrio harveyi* ผู้เลี้ยงกุ้งจึงใช้สารปฏิชีวนะ เพื่อป้องกันการเกิดโรค แต่ปัญหาที่เกิดตามมาคือ สารปฏิชีวนะเกิดการตกค้างในเนื้อกุ้ง การใช้จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงกุ้ง เพื่อทำให้กุ้งแข็งแรง น้ำหนักเพิ่มขึ้น และป้องกันโรคจึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะช่วยแก้ปัญหาการใช้สารปฏิชีวนะในการเพาะเลี้ยงกุ้งได้ ในปัจจุบันมีรายงานการใช้โพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำน้อยมาก งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาผลของโพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำในระดับบ่อดิน โดยติดตามการเจริญเติบโตและอัตราการรอดชีวิตของกุ้งกุลาดำ ตรวจหาปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำและดินในบ่อที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้ง

วัตถุประสงค์โครงการ

ทดสอบศักยภาพการใช้ *Bacillus* สายพันธุ์ S11 (*Bacillus* S11) ที่มีสมบัติโพรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำระดับบ่อดิน

ระเบียบวิธีวิจัย

1. เตรียมอาหารกุ้งกุลาดำผสม *Bacillus* S11 ที่มีสมบัติเป็นโพรไบโอติก
2. เตรียมบ่อเลี้ยงกุ้ง
3. เลี้ยงกุ้งในบ่อดินที่เตรียมไว้ ติดตามการเจริญเติบโต รวมทั้งอัตราการรอดชีวิตของกุ้งกุลาดำเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มให้อาหารผสมโพรไบโอติกกับกลุ่มควบคุม
4. ทดสอบความต้านทานการเกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* โดยทดสอบการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค (Challenge Test)
5. วิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูลแต่ละการทดลอง

บทที่ 2

ความเป็นมา

อุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งนับเป็นอุตสาหกรรมเกษตรที่สำคัญมากประเภทหนึ่งในอุตสาหกรรมสัตว์น้ำเศรษฐกิจ ที่นิยมเลี้ยงกันทั่วโลกได้แก่ อุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ในปี พ.ศ. 2541 ประมาณว่าผู้เลี้ยงกุ้งทั่วโลกผลิตกุ้ง ทุกชนิดรวมได้ 737,200 เมตริกตัน เพิ่มขึ้น 12% จากปี พ.ศ. 2540 ที่ผลิตได้ 660,200 เมตริกตัน ส่วนชนิดของกุ้งที่เลี้ยงในปี พ.ศ. 2541 พบว่ากุ้งกุลาดำยังคงเป็นที่นิยมเลี้ยงมากที่สุดของทั่วโลก คือ 52% ตามด้วยกุ้งขาว(ตะวันตก) 24% กุ้งขาว(เอเชีย) 12% กุ้งขาว(จีน) 8% กุ้งน้ำเงิน(ตะวันตก) 3% และกุ้งคุรุมา(ญี่ปุ่น) น้อยกว่า 1% (ทีมงานข่าวกุ้ง, 2542)

อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำมีความสำคัญมากต่อประเทศไทย เนื่องจากประเทศไทยสามารถผลิตกุ้งส่งออกได้มากเป็นอันดับ 1 ของโลก โดยในปี พ.ศ. 2541 มีปริมาณการส่งออก 156,176 เมตริกตัน คิดเป็นมูลค่าการส่งออกประมาณ 58,353.32 ล้านบาท (กรมเศรษฐกิจการพาณิชย์, 2542a) แต่ต่อมาผลผลิตเริ่มลดลง ทั้งนี้เกิดจากความหายนะทางธรรมชาติ เช่น น้ำท่วม, ฝนตก มลพิษจากชุมชนและอุตสาหกรรม และการเกิดโรค เช่น การติดเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* spp ได้แก่ *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi* การติดเชื้อไวรัส เช่น ไวรัสหัวเหลือง (Yellow head virus, YHV) ไวรัสตัวแดงจุดขาว (Systemic Ectodermal Mesodermal Baculovirus, SEMBV) ไวรัสเอ็มบีวี (Monodon Baculovirus, MBV) การติดเชื้อราและปาราสิตอื่น ๆ ซึ่งทำให้เกิดความเสียหายต่อเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้ง

การเลี้ยงกุ้ง

การเลี้ยงกุ้งในช่วงแรกๆ มักเลี้ยงกันในเขตชายฝั่งทะเลเท่านั้นแต่เนื่องจากพื้นที่ชายฝั่งมีจำกัด ประกอบกับผลตอบแทนในการเลี้ยงกุ้งที่สูงในระยะเวลาอันสั้น ทำให้เกษตรกรในพื้นที่น้ำจืดหันมาเลี้ยงกันมากขึ้นตั้งแต่ปี ค.ศ. 1994 (Limsuwan และ Chanratchakool, 1998) การเลี้ยงในระบบความเค็มต่ำมีข้อดีของการเลี้ยงในระบบนี้คือ จะประสบปัญหาโรคต่างๆน้อยกว่าการเลี้ยงตามแนวชายฝั่งทะเลที่มีความเค็มสูง (พรเลิศ จันทร์รัชชกูล, 2541) และพบว่าความเค็มที่ใช้ในการเลี้ยงกุ้งจะสะสมอยู่ที่พื้นดินชั้นบนระยะ 0-15 เซนติเมตร และในบางบ่อ ความเค็มสามารถฝังตัวได้ลึกถึง 100 เซนติเมตร แต่ก็นับว่าเป็นระยะทางที่น้อยมาก (Musig และ Boonnom, 1998) นอกจากนี้การเลี้ยงกุ้งโดยใช้ระบบหมุนเวียนน้ำแบบปิด (Closed Recirculating System) ซึ่งใช้หลัก

การในการสูบน้ำเข้าระบบเพียงครั้งเดียว ปรับคุณภาพน้ำทั้งระบบ และระหว่างการเลี้ยงกุ้งสามารถสูบถ่ายน้ำได้ตามความจำเป็น โดยใช้น้ำหมุนเวียนในระบบตลอดรอบการผลิต ระบบดังกล่าวยังเหมาะสำหรับการเลี้ยงกุ้งในพื้นที่น้ำจืด เพราะสามารถควบคุมโรคได้ดี ใช้น้ำน้อย และคุณภาพน้ำดีขึ้น (Fast และ Menasveta, 1998; Limsuwan and Chanratchakool, 1998)

การเกิดโรคในกุ้งกุลาดำ

ปัญหาสำคัญปัญหาหนึ่งในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ คือ การเกิดโรคติดเชื้อแบคทีเรีย สกุล วิบริโอ ซึ่งได้แก่ *V harveyi*, *V parahaemolyticus* และ *Vibrio* spp. อื่นๆ เป็นต้น โดยเรียกโรคที่เกิดจากแบคทีเรียสกุล วิบริโอนี้ว่า วิบริโอซีส (Vibriosis) (Flegel และคณะ, 1992) วิบริโอซีสที่เป็นปัญหามากที่สุดในขณะนี้ คือ โรคเรืองแสง โดยเกิดจาก *V harveyi* และกุ้งที่เป็นโรคนี้จะมีอาการเชื่องช้าลอยหัวว่ายน้ำบริเวณผิวน้ำ ท้องและตับจะเรืองแสงได้เมื่อสังเกตในเวลากลางคืน และมีการตายในปริมาณมาก (Spaargaren, 1996)

ในการรักษาหรือป้องกันโรคในกุ้งกุลาดำ โดยเฉพาะการติดเชื้อไวรัส ยังไม่มียาหรือสารเคมีใดๆ ใช้รักษาได้ ส่วนในโรคติดเชื้อแบคทีเรียสามารถใช้สารปฏิชีวนะในการรักษาแต่จะมีปัญหาของการตกค้างของสารปฏิชีวนะในเนื้อกุ้ง ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อการส่งออก เนื่องจากตามกฎของ USDA (United State Department of Agriculture, US) ได้กำหนดให้มาตรฐานตกค้างของสารปฏิชีวนะออกซีเตตราซัยคลินตกค้างในเนื้อสัตว์ได้สูงสุดไม่เกิน 0.1 ส่วนในล้านส่วน (ppm) ที่สำคัญอีกก็คือการติดเชื้อในกุ้งกุลาดำต้องการวินิจฉัยโรคที่ถูกต้องโดยผู้เชี่ยวชาญ เพื่อเลือกใช้สารปฏิชีวนะที่เหมาะสม ไม่มีสารดังกล่าวเหลือตกค้างในเนื้อกุ้ง และไม่ทำให้เกิดปัญหาการดื้อยาตามมาภายหลังอีก และผลจากการใช้สารปฏิชีวนะในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำติดต่อกันเป็นเวลานาน ๆ กอปรกับใช้ไม่ถูกวิธี จะส่งผลให้การรักษาไม่ได้ผล ยังเป็นการทำลายแบคทีเรียที่เป็นเชื้อประจำถิ่น ในระบบทางเดินอาหารที่ทำหน้าที่ช่วยย่อยอาหารที่มีประโยชน์ต่อตัวกุ้ง ส่งผลให้กุ้งอ่อนแอลง มีการสะสมและการตกค้างของสารปฏิชีวนะในเนื้อกุ้งที่ให้ผลอันตรายโดยตรงต่อผู้บริโภค และยังทำให้เกิดปัญหาการตกค้างของสารปฏิชีวนะในสิ่งแวดล้อม โดยรวมจะส่งผลกระทบต่อการส่งออก เพราะประเทศนำเข้ากุ้งแช่แข็งรายใหญ่ของไทยคือ สหรัฐอเมริกาและญี่ปุ่น มีเกณฑ์ที่เข้มงวดในการควบคุมการใช้สารปฏิชีวนะและยินยอมให้สารปฏิชีวนะตกค้างในเนื้อกุ้งในปริมาณที่กำหนดไว้ กล่าวคือ ออกซีเตตราซัยคลิน ไม่ควรเกิน 0.1 ส่วนในล้านส่วน (ppm) ในเนื้อกุ้ง (กรมเศรษฐกิจการพาณิชย์, 2542b)

การป้องกันโรคติดเชื้อในกุ้งกุลาดำ

แนวทางการป้องกันโรคติดเชื้อในกุ้งกุลาดำ ในปัจจุบันมุ่งเน้นการเสริมสร้างความแข็งแรงและเสริมความต้านทานให้แก่กุ้ง เช่น การให้วัคซีน การให้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และอีกแนวทางหนึ่งคือการใช้แบคทีเรียที่มีสมบัติเป็นโพรไบโอติกเพื่อสร้างสมดุลย์แบคทีเรียประจำถิ่นในทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำ

การใช้แบคทีเรียสมบัติโพรไบโอติกแทนการใช้สารปฏิชีวนะ เริ่มขึ้นเมื่อปี ค.ศ.1977 Baird ได้ใช้ *Lactobacillus* spp. เสริมในอาหารหมู และได้ผลน้ำหนักตัวหมูเพิ่มขึ้น และยังมีการศึกษาใช้แบคทีเรียกลุ่มโพรไบโอติกในอุตสาหกรรมไก่ ซึ่งได้ผลดีเช่นกัน

ในปัจจุบันยังมีการศึกษาและทำวิจัยหาสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีสมบัติเป็นโพรไบโอติกในกุ้งน้อยมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งการนำโพรไบโอติกไปใช้จริงในระดับอุตสาหกรรมการผลิตกุ้ง ผลการศึกษาที่ตีพิมพ์ในขณะนี้ได้สรุป โดยย่อดังต่อไปนี้คือ

ในปี ค.ศ.1998 Moriarty ใช้ *Bacillus* spp. ในการเลี้ยงกุ้งตระกูลพีเนียส โดยให้มี *Bacillus* spp. ในน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งปริมาณ 10^4-10^5 CFU/ml ตลอดระยะเวลาการเลี้ยง พบว่า กุ้งในบ่อที่ไม่ได้ใส่ *Bacillus* spp. ประสบปัญหาการตายด้วยโรคเรืองแสงก่อน 80 วันของการเลี้ยง ในขณะที่กุ้งบ่อที่ใช้ *Bacillus* spp. ซึ่งเป็นโพรไบโอติกในการเลี้ยง สามารถเลี้ยงได้มากกว่า 160 วันโดยไม่มีปัญหาโรคเรืองแสง นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำของบ่อกุ้งที่ผสมโพรไบโอติกในการเลี้ยงจะมีปริมาณวิบริโอและวิบริโอเรืองแสงในปริมาณที่ต่ำและดินในบ่อจะตรวจพบวิบริโอต่ำและไม่พบวิบริโอเรืองแสงเลย

Rengpipat และคณะ (1998a) ใช้ *Bacillus* S11 ที่แยกได้จากทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำจากอ่าวไทย เป็นโพรไบโอติกผสมอาหารสำหรับเลี้ยงกุ้งกุลาดำระยะโพสลาวา 15 (PL15) เป็นระยะเวลา 100 วัน โดยทำการทดลองเลี้ยงกุ้งกุลาดำในระดับบ่อปูนซีเมนต์ ขนาดบรรจุน้ำ 0.5 ตัน จากการศึกษาพบว่า กุ้งกุลาดำมีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) และมีความสามารถในการต้านทานได้ 100% หลังการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับ *Bacillus* S11 ซึ่งมีอัตราการรอดเพียง 26%

Rengpipat และคณะ (1998b) แสดงการส่งผ่านอาหารกุ้งกุลาดำด้วยวิธี Bioencapsulation ได้สำเร็จโดย ใช้ *Bacillus* S11 ซึ่งเป็นโพรไบโอติกผ่านทางอาร์ทีเมีย ที่ใช้เป็นอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำ หลังจากเลี้ยงกุ้งระยะโพสลาวา 10 (PL10) เป็นระยะเวลา 14 วัน พบว่ากุ้งกุลาดำที่กินอาร์ทีเมียที่มีโพรไบโอติกอยู่ โตเร็วและมีปัญหาการเกิดโรคน้อยกว่ากุ้งกุลาดำกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

Rengpipat และคณะ (2000) ติดตาม Immunity Indexes จากเลือดกุ้งกุลาดำ พบว่ากุ้งกุลาดำที่เสริมด้วยโพรไบโอติก *Bacillus* S11 มีค่าของ Immunity Indexes โดยรวมมากกว่าค่าต่างๆ ที่ตรวจพบจากกุ้งกุลาดำกลุ่มควบคุม โดยเพาะ Phagocytosis และ Phagocytic Indexes จากเลือดกุ้งกุลาดำ และ Immunity Indexes เพิ่มขึ้นตามอายุของกุ้งที่เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเจน เมื่อทำการเหนี่ยวนำให้กุ้งกุลาดำทั้ง 2 กลุ่มเกิดโรคเรืองแสง ค่า Phagocytic Indexes อัตราการรอดชีวิต และน้ำหนักตัวของกุ้งกุลาดำในกลุ่มที่เสริมโพรไบโอติกสูงกว่าที่ตรวจพบในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ $P<0.05$

David และคณะ (1998) ใช้โพรไบโอติก WUNAPUO-15 ในการเลี้ยงกุ้ง จากการทดลองทั้งหมด 29 บ่อ พบว่าสามารถควบคุมจำนวนวิบริโอไม่ให้เพิ่มสูงขึ้นตลอดระยะเวลาการเลี้ยง 130 วัน ซึ่งต่างกับบ่อควบคุมคือวิบริโอเพิ่มสูงมากหลังจากการเลี้ยงกุ้ง 65 วัน ถ้าอาหารกุ้งที่ถูกสะสมกับสารอินทรีย์ในบ่อไม่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ โพรไบโอติก WUNAPUO-15 ยังสามารถควบคุมวิบริโอเรืองแสงได้อย่างมีประสิทธิผลหลังจากการเลี้ยงกุ้ง 75 วันอีกด้วย

Ketut และ Tsumura (1998) ใช้โพรไบโอติก By-9 ในปริมาณ 10^6 cfu/ml ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำระยะโพสลาวา10 (PL10) ในบ่อขนาด 18 ตัน พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของวิบริโอก่อโรคโดยเฉพาะ *V. harveyi* โดยทำให้ปริมาณวิบริโอมีความหนาแน่นต่ำ กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในบ่อใช้โพรไบโอติกและบ่อควบคุมมีอัตราการรอด 46.11% และ 10.57% ตามลำดับ

ในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ มีผู้ทำการวิจัยเกี่ยวกับการใช้โพรไบโอติกน้อยมาก แต่ในปี ค.ศ.1995 กลุ่มวิจัย Rengpipat et al.(1998) ได้คัดเลือกดำเนินการวิจัย *Bacillus* strain S11 จากทางเดินอาหารของแม่กุ้งกุลาดำจากอ่าวไทย มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกสำหรับกุ้งกุลาดำ และได้ทำการทดลองใช้โพรไบโอติกนี้ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำในระดับบ่อปูนซีเมนต์ ขนาดบรรจุน้ำ 0.5 ตัน ได้สำเร็จ กล่าวคือกุ้งกุลาดำมีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น, มีความสามารถในการต้านทานต่อการเกิดโรคเรื่องแล้วได้ 100% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับโพรไบโอติก ดังนั้นงานวิจัยที่จะดำเนินการต่อไปนี้จะขยายระดับการเลี้ยงกุ้งกุลาดำเป็นระดับการเลี้ยงในบ่อดินที่มีสภาพตามธรรมชาติที่ใช้จริงเพื่อเลียนแบบการเลี้ยงของเกษตรกร เพื่อติดตามผลการใช้ *Bacillus* S11

ขอสงวนลิขสิทธิ์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โพรไบโอติกสายพันธุ์ไทยในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ โดยจะติดตามการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ และตรวจดูสภาพของกุ้งกุลาดำ ก่อนนำผลไปประยุกต์ใช้จริงในเชิงพาณิชย์

ความสำคัญหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถนำ *Bacillus* S11 ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกเสริมในอาหารและเลี้ยงกุ้งกุลาดำในระดับบ่อดิน เพื่อให้กุ้งมีสุขภาพแข็งแรง สามารถต้านทานต่อการติดเชื้อ มีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น รวมทั้งลดปัญหาการใช้และการตกค้างของสารปฏิชีวนะในสิ่งแวดล้อม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการ

1. <u>เตรียมอาหารกุ้งกุลาดำผสม *Bacillus* S11 ที่มีสมบัติเป็นโพรไบโอติก</u>

เลี้ยง *Bacillus* S11 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ทริปติกซอย (Tryptic soy broth) บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วแยกเซลล์โดยการตกตะกอนด้วยแคลเซียมคลอไรด์ (Calcium chloride) แล้วนำมากรอง เก็บเซลล์สดและนำมาผสมกับอาหารกุ้งในอัตราส่วน 1:3 โดยน้ำหนักเพื่อให้ได้โพรไบโอติก 10^{10} CFUต่อกรัม ของอาหารกุ้ง วิธีการเตรียมดัดแปรจากวิธีของวรรณิภา เพี้ยนภักตร์, 2539

แหล่งอาหารกุ้ง ซื้อจาก บริษัท Grobest Corporation Ltd.,Thailand

การให้อาหารกุ้งผสมโพรไบโอติกให้หนึ่งมื้อต่อวัน

2. <u>เตรียมบ่อเลี้ยงกุ้ง</u>

เตรียมบ่อดินขนาด ประมาณ1,000 ตารางเมตรต่อบ่อ จำนวน 2 บ่อ ปรับน้ำให้มีความเค็มประมาณ 4 ส่วนใน พันส่วน (ppt) ความลึกของน้ำประมาณ 1 เมตร ติดตั้งเครื่องตีน้ำเพื่อเพิ่มปริมาณออกซิเจนในน้ำและใช้ระบบการเลี้ยงแบบระบบหมุนเวียนน้ำแบบปิด (Fast และ Menasveta, 1998)

3.<u>เลี้ยงกุ้งในบ่อดินที่เตรียมไว้และติดตามการเจริญเติบโต อัตราการรอดชีวิตของกุ้งกุลาดำเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มให้อาหารผสมโพรไบโอติกกับกลุ่มควบคุม</u>

3.1 การเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำครั้งที่ 1

กุ้งกุลาดำระยะ postlarvae 24 (PL24) จากบ่อเลี้ยงกุ้งจังหวัดฉะเชิงเทรา นำมาเลี้ยงในบ่อดินที่เตรียมไว้ บรรจุน้ำเค็ม 4 ส่วนในพันส่วน ปล่อยกุ้งในอัตรา 40,000 ตัวต่อบ่อ ให้อากาศด้วยเครื่องตีน้ำแบบใบพัด ทำการเลี้ยงกุ้งโดยใช้ระบบปิดและให้อาหาร 3 เวลาต่อวัน ในปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว การทดลองแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ

1. กลุ่มควบคุม (Control) คือกลุ่มที่ให้อาหารกุ้งสำเร็จรูปโดยไม่ผสมเซลล์ *Bacillus* S11 สามมื้อต่อวัน

2. กลุ่มที่ให้อาหารกุ้งสำเร็จรูปผสมเซลล์สด *Bacillus* S11 โดยให้อาหารกุ้งสำเร็จรูปผสมเซลล์สด *Bacillus* S11 หนึ่งมื้อ และอาหารเม็ดปกติสองมื้อ ต่อวัน

3.2 การเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำครั้งที่ 2

กุ้งกุลาดำระยะ postlarvae 24 (PL24) จากบ่อเลี้ยงกุ้งจังหวัดฉะเชิงเทรา นำมาเลี้ยงในบ่อดินที่เตรียมไว้ บรรจุน้ำเค็ม 4 ส่วนในพันส่วน ปล่อยกุ้ง 30,000 ตัวต่อบ่อ ให้อากาศด้วยเครื่องตีน้ำแบบใบพัด ทำการเลี้ยงกุ้งโดยใช้ระบบปิดและให้อาหาร 3 เวลาต่อวันในปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว การทดลองใช้บ่อดิน 2 บ่อโดยทั้ง 2 บ่อให้อาหารกุ้งสำเร็จรูปผสมเซลล์สด *Bacillus* S11 หนึ่งมื้อ และอาหารเม็ดปกติสองมื้อ ต่อวัน

3.3 การเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำครั้งที่ 3

กุ้งกุลาดำระยะ postlarvae 25 (PL25) จากบ่อเลี้ยงกุ้งจังหวัดฉะเชิงเทรา นำมาเลี้ยงในบ่อดินที่เตรียมไว้ บรรจุน้ำเค็ม 4 ส่วนในพันส่วน ปล่อยกุ้ง 40,000 ตัวต่อบ่อ ให้อากาศด้วยเครื่องตีน้ำแบบใบพัด ทำการเลี้ยงกุ้งโดยใช้ระบบปิดและให้อาหาร 3 เวลาต่อวัน ในปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว การทดลองแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ

1. กลุ่มควบคุม (Control) คือกลุ่มที่ให้อาหารกุ้งสำเร็จรูปโดยไม่ผสมเซลล์ *Bacillus* S11 สามมื้อต่อวัน

2. กลุ่มที่ให้อาหารกุ้งสำเร็จรูปผสมเซลล์สด *Bacillus* S11 โดยให้อาหารกุ้งสำเร็จรูปผสมเซลล์สด *Bacillus* S11 หนึ่งมื้อ และอาหารเม็ดปกติสองมื้อ ต่อวัน

3.4 การเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำครั้งที่ 4

กุ้งกุลาดำระยะ postlarvae 24 (PL24) จากบ่อเลี้ยงกุ้งจังหวัดฉะเชิงเทรา จำนวน 1,440 ตัว นำมาเลี้ยงในกระชังขนาด 2 ตร.ม. ในบ่อดินเดียวกันที่มีขนาดประมาณ 600 ตร.ม. บรรจุน้ำเค็ม 4 ส่วนในพันส่วน ปล่อยกุ้ง 80 ตัวต่อกระชัง ให้อากาศด้วยหัวทรายตลอดเวลา ทำการเลี้ยงกุ้งโดยใช้ระบบปิดและให้อาหาร 3 เวลาต่อวัน ในปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว การทดลองแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ

1. กลุ่มควบคุม (Control) คือกลุ่มที่ให้อาหารกุ้งสำเร็จรูปโดยไม่ผสมเซลล์ *Bacillus* S11 สามมื้อต่อวัน ทำการทดลองในกระชังรวม 12 กระชัง (12 ซ้ำ)

2. กลุ่มที่ให้อาหารกุ้งสำเร็จรูปผสมเซลล์สด *Bacillus* S11 โดยให้อาหารกุ้งสำเร็จรูปผสมเซลล์สด *Bacillus* S11 หนึ่งมื้อ และอาหารเม็ดปกติสองมื้อ ต่อวัน ทำการทดลองในกระชังรวม 12 กระชัง (12 ซ้ำ)

ติดตามอัตราการเจริญเติบโต โดยวัดน้ำหนักตัวเฉลี่ยต่อเวลา ปริมาณจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารของกุ้ง ปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำและดินจากบ่อเลี้ยงกุ้งและคุณภาพน้ำในบ่อดิน ด้วยวิธี Total Plate Count บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทริปติกซอย เพื่อเปรียบเทียบจุลินทรีย์ประจำถิ่นและตรวจหา *Bacillus* S11 เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมโดยเก็บตัวอย่างทุก 20 วันเป็นเวลา 100 วัน และอัตราการรอดชีวิตซึ่งจะทำการวัดหลังจากเลี้ยงกุ้งกุลาดำครบตามกำหนดเป็นเวลา 100 วัน

ตรวจคุณภาพน้ำบางประการทุก 20 วันเป็นเวลา 100 วัน โดยติดตามตรวจ ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ พีเอช อุณหภูมิ ปริมาณไนไตรท์ ฟอตเฟต แอมโมเนียม โดยใช้ DO meter pH meter ปรอทวัดอุณหภูมิ ชุดตรวจสอบ Nitrite-Test Phosphate-Test Ammonium-Test ตามลำดับ

4. ทดสอบความต้านทานการเกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* โดยทดสอบการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค (Challenge Test)

รวบรวมกุ้งในบ่อดินที่ให้โพรไบโอติกและบ่อควบคุมจากข้อ 3 บางส่วน ทำการทดสอบสุขภาพของกุ้ง โดยการทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วยสารแขวนลอยของเซลล์ *V. harveyi* ที่มี ความเข้มข้น 10^7 CFUต่อมิลลิลิตร โดยวิธีการแช่ (Immersion) การทดลองจะทำในบ่อปูนซีเมนต์ขนาด 80x74x87 ลูกบาศก์เซนติเมตร (สมบัติ รักประทานพร, 2542) โดยใช้กุ้ง 15-20 ตัวต่อบ่อ จำนวน 3 บ่อต่อการทดลอง ติดตามอัตราการรอดชีวิต และตรวจหาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด *Bacillus* S11 และ *V. harveyi* ในทางเดินอาหาร ของกุ้งกุลาดำทุกๆ 3 วัน ในเวลา 12 วัน นำผลที่ได้มาประเมินประสิทธิภาพการป้องกันโรคในกุ้งกลุ่มที่ได้รับโพรไบโอติก

5. วิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูลแต่ละการทดลอง

ค่าที่แสดงได้จากการเก็บตัวอย่างแบบสุ่ม 5 ตัวอย่างและนำมาทดสอบแบบทำซ้ำ 5 ครั้งต่อหนึ่งตัวอย่าง ค่าที่ได้นำมาวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยวิธี Duncan's multiple range tests ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

6. การแจงนับ แบคทีเรียรวม ,*Bacillus* S 11 และ *Vibrio* spp.

การแจงนับ แบคทีเรียรวมและ *Bacillus* S11โดยการทำเจือจาง ตัวอย่างด้วยระบบการเจือจางเป็นลำดับส่วนสิบเท่า และนำตัวอย่างไปผ่านลงบน อาหารวุ้นแข็งทริปติกซอย และใช้อาหารวุ้นแข็ง TCBS เป็นอาหารสำหรับติดตามการเจริญของ *Vibrio* spp. บ่มจานอาหารที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลเป็น CFU/กรัม หรือ CFU/มล.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

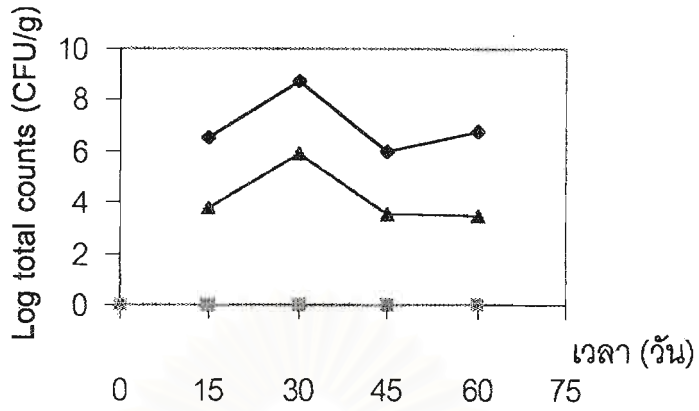
การทดลองสี่ครั้ง จะทำการเลี้ยงกุ้งกุลาดำระยะ PL10-PL15 ด้วยอาหารปกติเป็นเวลา10-15 วัน เพื่อให้กุ้งกุลาดำปรับตัวเข้ากับสภาพบ่อดินโดยจะเริ่มการทดลอง ในกุ้งระยะ PL25 หลังการเสริมอาหารผสมโพรไบโอติก *Bacillus* S 11 จำนวน 1 มื้อต่อวันได้มีการชั่งน้ำหนักกุ้งตรวจหา ปริมาณจุลินทรีย์ในลำไส้กุ้ง น้ำเลี้ยงกุ้ง และตะกอนดินในบ่อเลี้ยงกุ้ง และติดตามคุณภาพน้ำบางประการทุก 15-20 วัน เป็นเวลาประมาณ 100 วัน ผลที่ได้นำไปวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยวิธี Duncan' s multiple range tests ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

การทดลองครั้งที่ 1

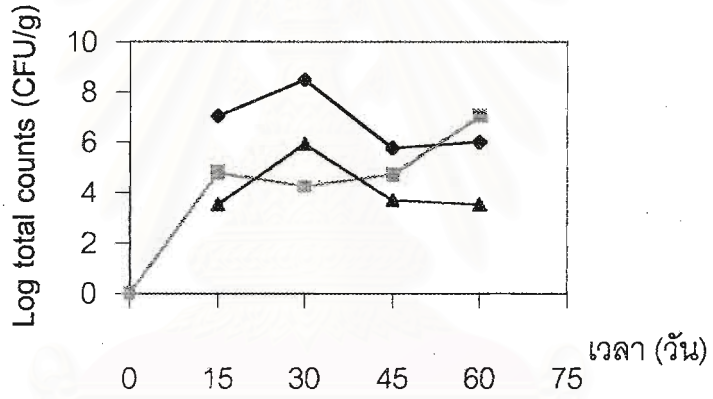
ปล่อยกุ้งประมาณ 40,000 ตัวต่อบ่อ ผลการติดตามปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดและ *Vibrio* spp ในลำไส้ น้ำเลี้ยงกุ้ง และตะกอนดิน ไม่พบความแตกต่าง ระหว่างบ่อเสริมด้วยโพรไบโอติกและบ่อควบคุม ปริมาณที่ตรวจพบจุลินทรีย์ทั้งหมดประมาณ 10^6- 10^9 CFU/กรัม ในลำไส้ (รูปที่ 1), ประมาณ 10^4- 10^5CFU/มล. ในน้ำ (รูปที่2) และประมาณ 10^6- 10^8CFU/กรัม ในดิน (รูปที่3) ในขณะที่ตรวจพบ *Bacillus* S11 หลังจากเลี้ยงกุ้งได้ 15 วัน ในบ่อที่เสริมโพรไบโอติก เท่านั้น

รูปที่ 4 แสดงความแตกต่างของน้ำหนักตัวของกุ้งกุลาดำ กลุ่มได้รับการเสริมด้วยโพรไบโอติกที่มีน้ำหนักมากกว่ากุ้งควบคุมหลังการเพาะเลี้ยง 30 วัน จนกระทั่งครบ 60 วัน หลังจากนั้นกุ้งกุลาดำในบ่อควบคุมเริ่มตายด้วยโรคจุดแดงตัวขาวจากไวรัส จนหมดบ่อ ส่วนในบ่อที่เสริมด้วยโพรไบโอติกพบการตายหลังจากนั้นประมาณ 10 วัน และค่อยๆ ทะยอยตายไปเรื่อย ๆ จนหมดบ่อภายใน 5 วัน ในการทดลองครั้งที่ 1 ประสบปัญหาเรื่องการเตรียมเซลล์ เนื่องจาก ในขณะนั้นเครื่องปั่นเหวี่ยงของภาควิชาชำรุดทำให้เตรียมโพรไบโอติกไม่ทันต่อการนำไปใช้เลี้ยงกุ้ง ตั้งแต่วันที่ 45 ของการเพาะเลี้ยงกุ้ง จากผลการทดลองครั้งที่ 1 ให้ผลการทดลองเบื้องต้นในเชิงบวกของการใช้โพรไบโอติกต่อน้ำหนักตัวของกุ้งและความทนต่อโรคได้นานกว่า เนื่องจากกุ้งตายหมดจึงทำให้ไม่สามารถทราบจำนวนกุ้งที่รอดจากการเพาะเลี้ยงในครั้งนี้

ผลของคุณภาพน้ำบางประการตลอดระยะเวลาการเลี้ยงกุ้ง จากการติดตาม พบว่ามีค่าอยู่ในเกณฑ์ปกติที่ปลอดภัยสำหรับการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ และไม่มีความแตกต่างกันของค่าคุณภาพน้ำในกลุ่มควบคุมและกลุ่มโพรไบโอติก (ตารางที่ 1)



A

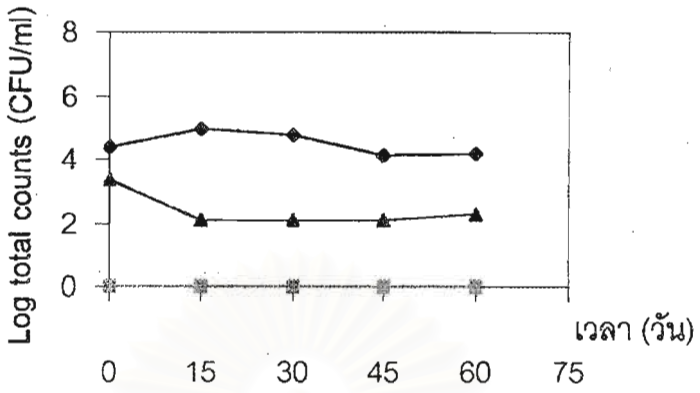


B

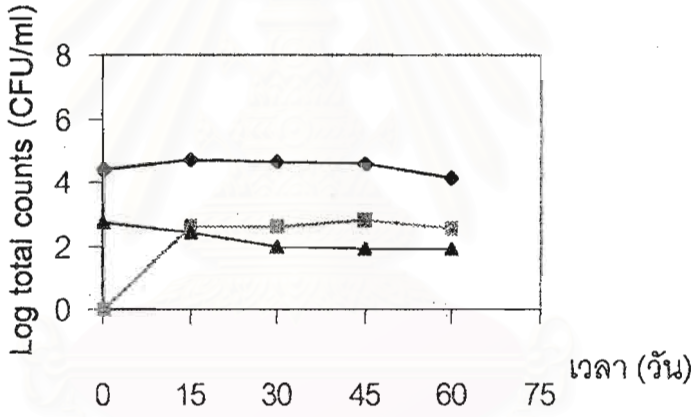
◆ Total Plate Counts ■ *Bacillus* S11 ▲ *Vibrio* spp.

A กลุ่มควบคุม B กลุ่มโพรไบโอติก

รูปที่1 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด, *Bacillus* S11 และ *Vibrio* spp. ในลำไส้กุ้งกุลาดำระหว่างการเลี้ยง กุ้งกุลาดำ ครั้งที่ 1



A

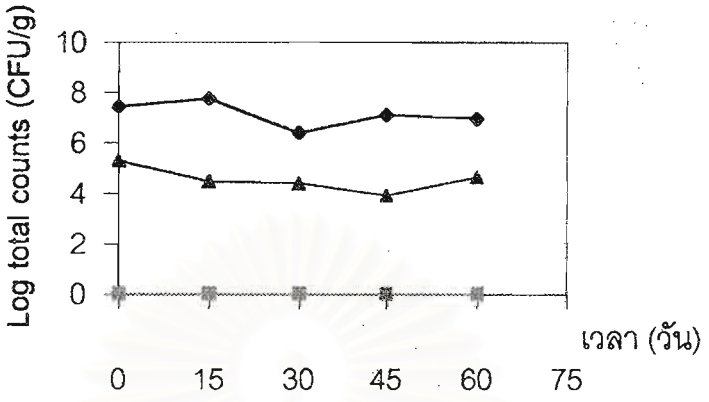


B

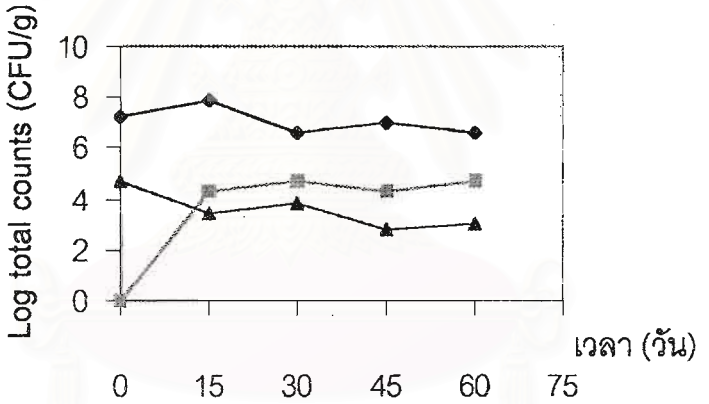
◆ Total Plate Counts ■ *Bacillus* S11 ▲ *Vibrio* spp.

A กลุ่มควบคุม B กลุ่มโพรไบโอติก

รูปที่2 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด, *Bacillus* S11 และ *Vibrio* spp. ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำระหว่างการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ครั้งที่ 1



A

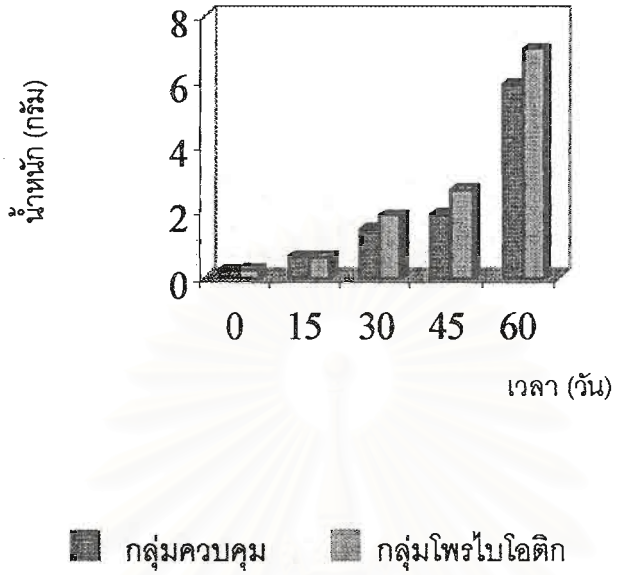


B

◆ Total Plate Counts ■ *Bacillus* S11 ▲ *Vibrio* spp.

A กลุ่มควบคุม B กลุ่มโพรไบโอติก

รูปที่3 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด, *Bacillus* S11 และ *Vibrio* spp. ในดินตะกอนในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ระหว่างการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ครั้งที่ 1



รูปที่4 น้ำหนักตัวของกุ้งกุลาดำกลุ่มโพรไบโอติกและกลุ่มควบคุมระหว่างการเลี้ยงกุ้งกุลาดำครั้งที่ 1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 คุณภาพน้ำตลอดระยะเวลาการเลี้ยงกุ้งกุลาดำครั้งที่ 1

คุณภาพน้ำ	ช่วงค่าคุณภาพน้ำ (ต่ำสุด-สูงสุด)	
	บ่อควบคุม	บ่อโพรไบโอติก
แอมโมเนียม (มก/ลิตร)	0 - 0.25	0 – 0.16
ไนไตรท์ (มก/ลิตร)	0	0 – 0.02
ฟอตเฟต (มก/ลิตร)	0 - 0.25	0 – 0.25
อุณหภูมิ (^{0}ซ)	29.5 - 30.5	29.8 – 30.5
พีเอช	7.48 - 8.02	7.68 – 8.20
ความเค็ม (ส่วนในพันส่วน)	3 - 4	3 - 4
ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (มก/ลิตร)	5.5 – 7.0	5.3 – 7.2

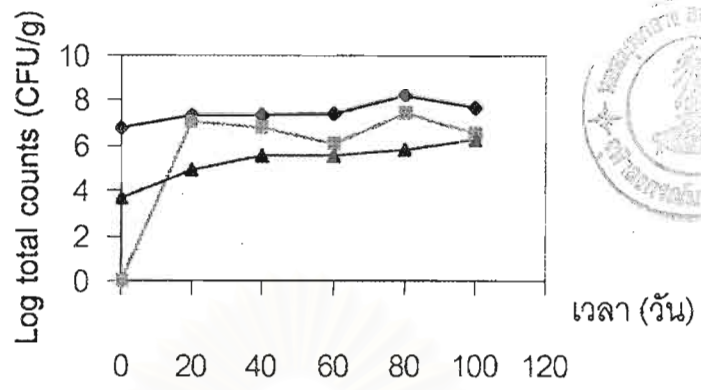
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การทดลองครั้งที่ 2

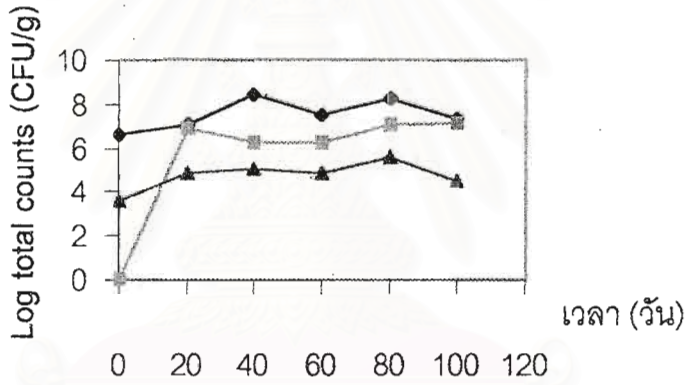
จากการสังเกตการเพาะเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 1 บ่อทดลองทั้งสองบ่อคุณภาพน้ำไม่มีความแตกต่างกันซึ่งแสดงให้เห็นว่าโพรไบโอติกไม่ได้ส่งผลเชิงลบต่อคุณภาพน้ำ ในการทดลองครั้งที่ 2 จึงเลี้ยงกุ้งกุลาดำโดยการเสริมโพรไบโอติกทั้งสองบ่อ ในครั้งนี้ลงกุ้งประมาณ 30,000 ตัวต่อบ่อ เพื่อดูผลจากระบบนิเวศน์ที่แตกต่างกันของทั้งสองบ่อรวมปัจจัยการเสริมด้วยโพรไบโอติกว่าเป็นเช่นไร จากการทดลองพบว่าปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด *Bacillus* S11 และ *Vibrio* spp. ในทั้งสองกลุ่มไม่แตกต่างกัน (รูปที่ 5-7) คุณภาพน้ำจากตารางที่ 2 อยู่ในค่าปกติที่กุ้งกุลาดำเจริญเติบโตได้และไม่แตกต่างกัน กุ้งกุลาดำกลุ่มที่เสริมโพรไบโอติกบ่อที่ 2 (รูปที่ 8) มีน้ำหนักตัวมากกว่ากลุ่มที่เสริมโพรไบโอติกบ่อที่ 1 โดยแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ และเป็นกุ้งจากบ่อเดิมที่เคยใช้เป็นบ่อทดลองเสริมด้วยโพรไบโอติกจากการทดลองครั้งที่ 1

ในการทดลองการเหนี่ยวนำทำให้เกิดโรค จากการทดลองครั้งนี้ได้รวบรวมกุ้งที่ยังมีชีวิตอยู่จากแต่ละบ่อมาจำนวนหนึ่งแล้วนำมาทดลองการเหนี่ยวนำทำให้เกิดโรคเรืองแสงจาก *V. harveyi* โดยใช้กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในสภาพปกติจากบ่อกุ้งบริเวณที่ใกล้เคียงกันที่มีอายุเท่ากันคือ PL-125 มาเป็นกลุ่มควบคุมหลังจากทำการแช่กุ้งกุลาดำในบ่อปูนที่มี *V. harveyi* ประมาณ 10^7-10^8 CFU/มล. จากการติดตามปริมาณ *Bacillus* S11 และ *V. harveyi* ไม่พบความแตกต่างในเชิงปริมาณจากตัวอย่างลำไส้และน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำจากทั้งสองกลุ่มการทดลอง (รูปที่ 9 –รูปที่ 12) หลังการเหนี่ยวนำทำให้เกิดโรค พบว่ากุ้งจากทั้งสามกลุ่มการทดลองตายหมดภายใน 7 – 8 วัน ซึ่งใกล้เคียงกันแต่อัตราการตายสะสมต่อเวลาของกลุ่มกุ้งที่เสริมโพรไบโอติกจะตายที่ช้ากว่ากลุ่มกุ้งควบคุม (รูปที่ 13)

ผลของคุณภาพน้ำบางประการตลอดระยะเวลาการเลี้ยงกุ้ง จากการติดตาม พบว่ามีค่าอยู่ในเกณฑ์ปกติที่ปลอดภัยสำหรับกุ้งกุลาดำ และไม่มีความแตกต่างกันในกลุ่มโพรไบโอติกทั้ง 2 กลุ่ม (ตารางที่ 2)



A

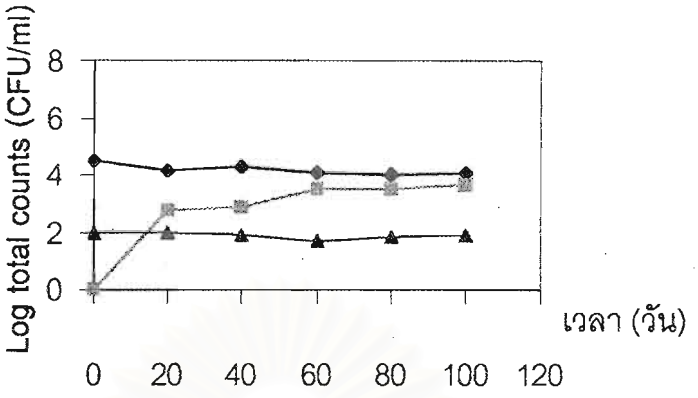


B

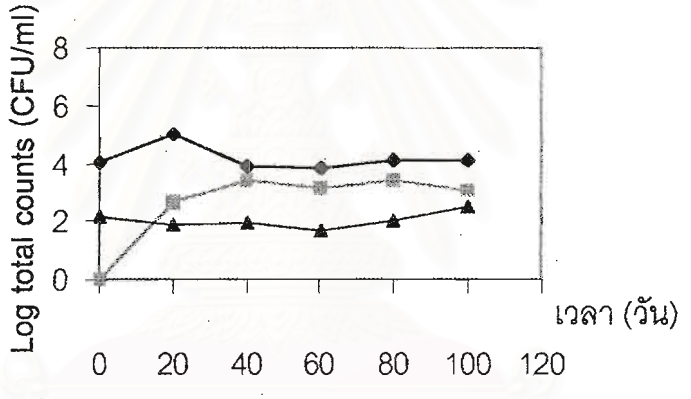
◆ Total Plate Counts ■ *Bacillus* S11 ▲ *Vibrio* spp.

A บ่อโพรไบโอติกที่ 1 B บ่อโพรไบโอติกที่ 2

รูปที่5 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด, *Bacillus* S11 และ *Vibrio* spp. ในลำไส้กุ้งกุลาดำระหว่างการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ครั้งที่ 2



A

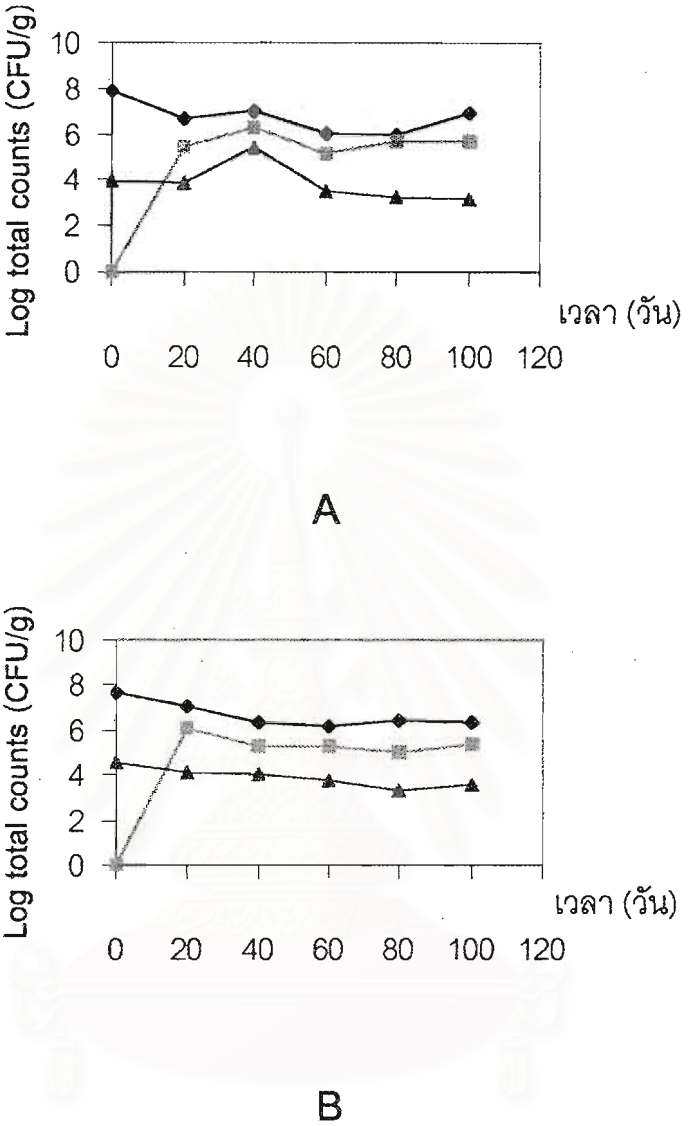


B

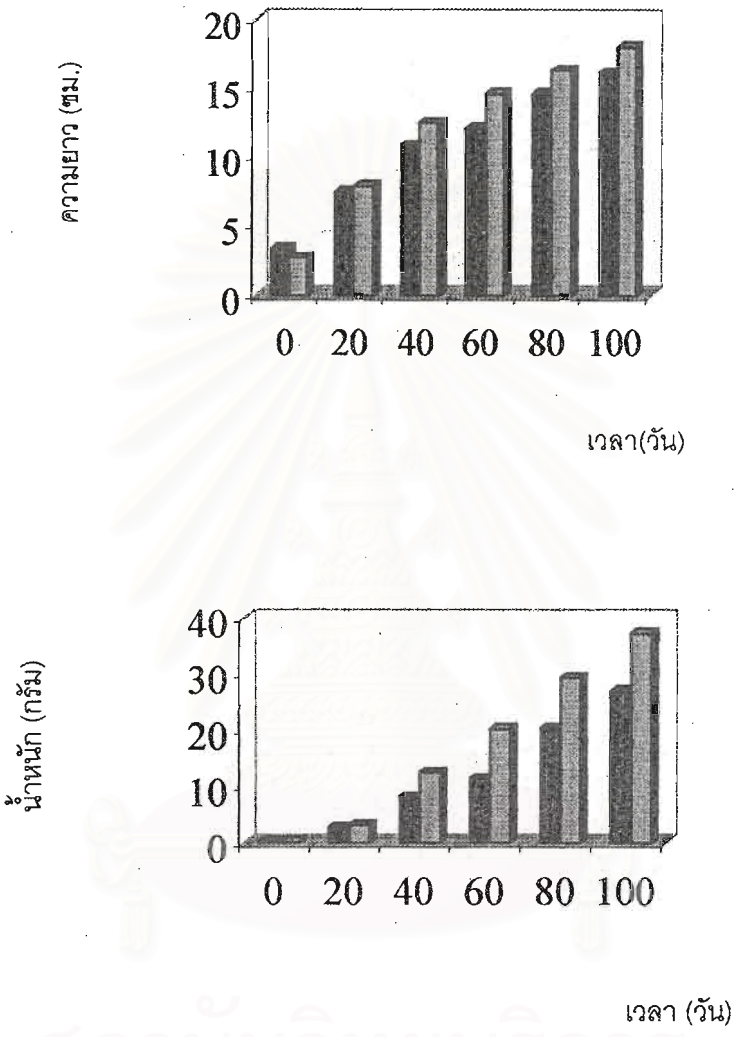
◆ Total Plate Counts ■ *Bacillus* S11 ▲ *Vibrio* spp.

A บ่อโพรไบโอติกที่ 1 B บ่อโพรไบโอติกที่ 2

รูปที่6 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด, *Bacillus* S11 และ *Vibrio* spp. ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำระหว่างการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ครั้งที่ 2

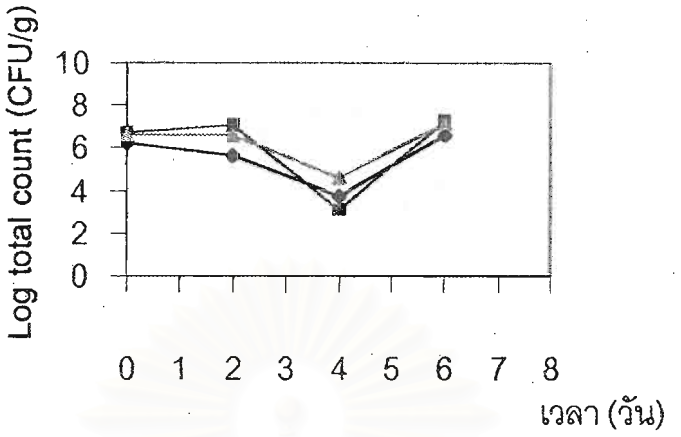


รูปที่7 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด, *Bacillus* S11 และ *Vibrio* spp. ในดินตะกอนในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ระหว่างการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ครั้งที่ 2

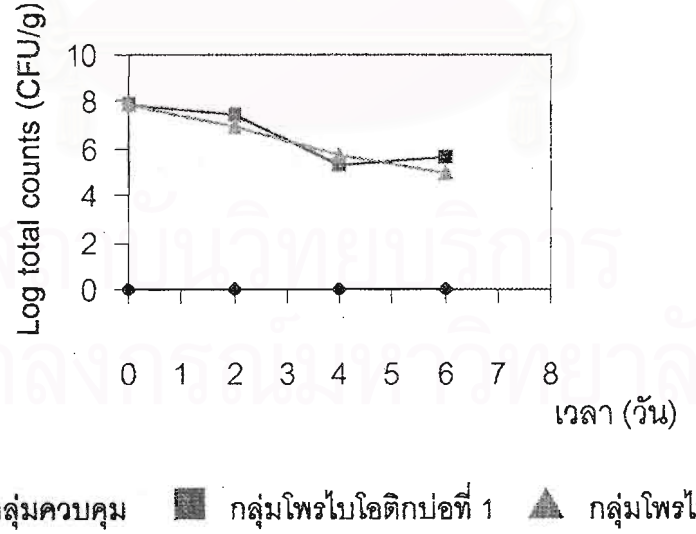


รูปที่8 ความยาว (เซนติเมตร) และน้ำหนัก (กรัม) ของกุ้งกุลาดำกลุ่มโพรไบโอติกบ่อที่ 1 และกลุ่มโพรไบโอติกบ่อที่ 2 ระหว่างการเลี้ยงกุ้งกุลาดำครั้งที่ 2

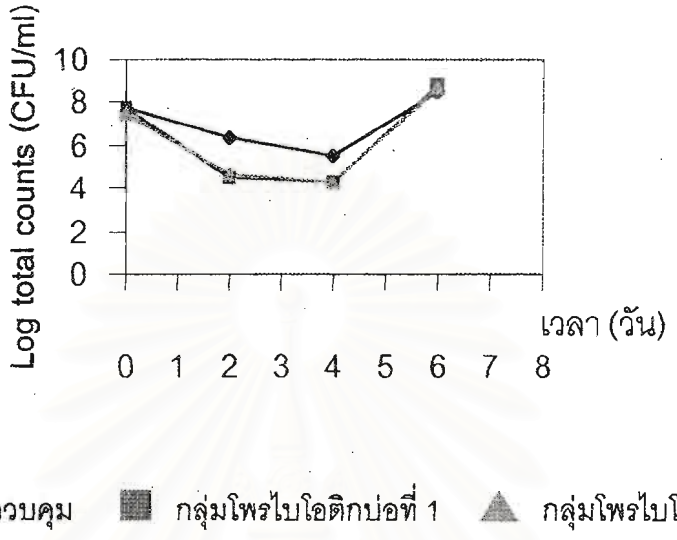
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



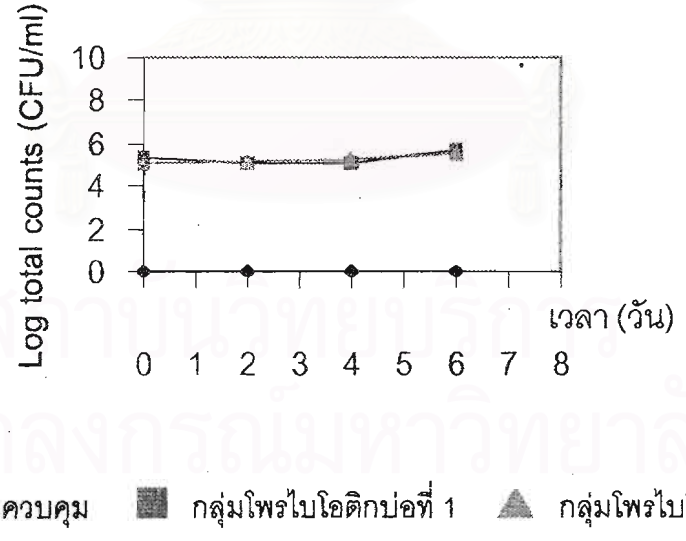
รูปที่ 9 ปริมาณจำนวน *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 ในลำไส้กุ้งกุลาดำระหว่างการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 เป็นเวลา 8 วัน



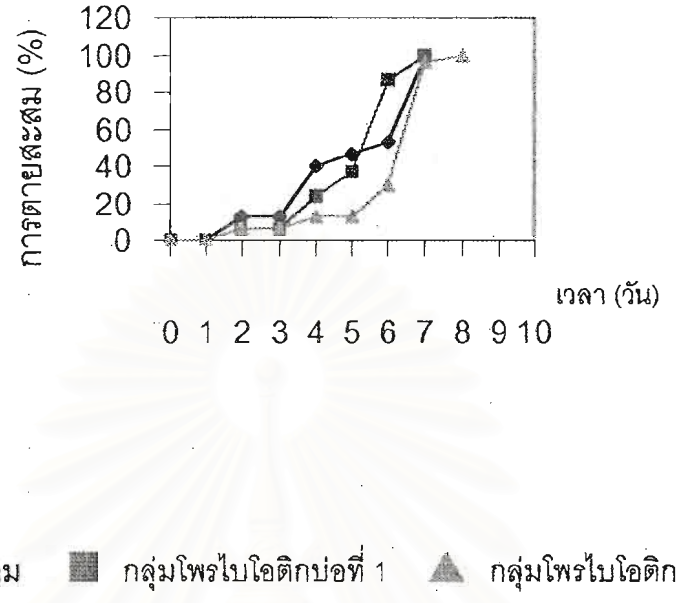
รูปที่ 10 ปริมาณจำนวน *Bacillus* S11 ในลำไส้กุ้งกุลาดำระหว่างการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 เป็นเวลา 8 วัน



รูปที่ 11 ปริมาณจำนวน *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำระหว่างการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 เป็นเวลา 8 วัน



รูปที่ 12 แสดงจำนวน *Bacillus* S11 ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำระหว่างการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 เป็นเวลา 8 วัน



รูปที่ 13 การตายสะสม (cumulative mortality) ของกุ้งกุลาดำระหว่างการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 เป็นเวลา 8 วัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 คุณภาพน้ำตลอดระยะเวลาการเลี้ยงกุ้งกุลาดำครั้งที่ 2

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
ฟอตเฟต (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)	5.3 – 7.0	5.3 – 7.3

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I19761403

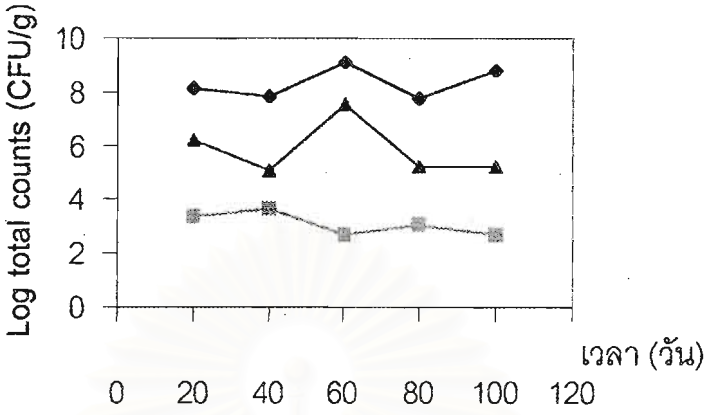
การทดลองครั้งที่ 3

จากการติดตามจุลินทรีย์ พบว่าสามารถตรวจพบ *Bacillus* S11 ในลำไส้กุ้งกุลาดำ, น้ำเลี้ยง และดินตะกอนจากบ่อควบคุมและบ่อที่เสริมโพรไบโอติก (รูปที่ 14–16) เนื่องจากแต่เดิมบ่อควบคุมในการทดลองครั้งนี้เคยใช้เป็นบ่อที่เสริมโพรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 2 ส่วนความยาวและน้ำหนักของกุ้งกุลาดำในกลุ่มที่ได้รับโพรไบโอติก ในระยะเวลา 40 วันแรกของการเลี้ยงมากกว่ากุ้งกุลาดำในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ที่ $P<0.05$ (รูปที่ 17) ในวันที่ 50 ของการเลี้ยงผู้วิจัยตัดสินใจจับกุ้งในบ่อนี้ขึ้นทั้งหมด เนื่องจากพบว่ากุ้งมีอาการของโรคตัวแดงดวงขาวปรากฏและเริ่มทยอยตายเป็นจำนวนมาก ทั้งนี้เพื่อเป็นการยับยั้งการแพร่ระบาดของโรคไปยังบ่อที่ใกล้เคียง ทำให้ผลการทดลองในกุ้งกุลาดำบ่อที่ให้โพรไบโอติกนี้มีผลรายงานเพียง 40 วันแรกของการเลี้ยงเท่านั้น ส่วนในกลุ่มควบคุมพบว่ากุ้งเริ่มป่วยในวันที่ 50 ของการเลี้ยงเช่นกันแต่มิได้เกิดจากโรคตัวแดงดวงขาวและได้ทยอยตายไปบางส่วนจึงทำการเก็บตัวที่ตายออก แต่ส่วนที่เหลือก็ได้รับการดูแลจนครบ 100 วัน

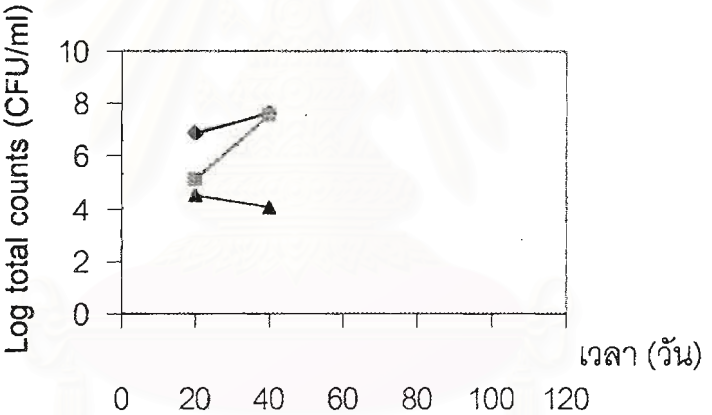
สาเหตุการตายด้วยโรคตัวแดงดวงขาวของกุ้งในบ่อที่เสริมโพรไบโอติกนั้น ได้ทราบภายหลังจากโรงอนุบาลกุ้งว่า กุ้งที่นำมาเลี้ยงในกลุ่มควบคุมกับกลุ่มเสริมโพรไบโอติกมาจากแม่พันธุ์ต่างตัวกัน มีขนาดไข่แตกต่างกันตั้งแต่ระยะแรกของการฟักตัว และลูกกุ้งชุดเดียวกันนี้ก็ได้มีเกษตรกรนำไปเลี้ยงเช่นเดียวกันและก็ประสบปัญหาของโรคตัวแดงจุดขาวตั้งแต่ 2สัปดาห์แรกของการเลี้ยง ดังนั้นการเสริมโพรไบโอติกไม่สามารถนำมาใช้รักษาโรคได้ แต่ช่วยยืดเวลาการแสดงอาการของโรคได้ในระยะเวลาหนึ่งเท่านั้น

ผลของคุณภาพน้ำบางประการตลอดระยะเวลาการเลี้ยงกุ้ง จากการติดตาม พบว่ามีค่าอยู่ในเกณฑ์ปกติที่ปลอดภัยสำหรับกุ้งกุลาดำ และไม่มีความแตกต่างกันในกลุ่มควบคุมและกลุ่มโพรไบโอติก (ตารางที่3)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



A

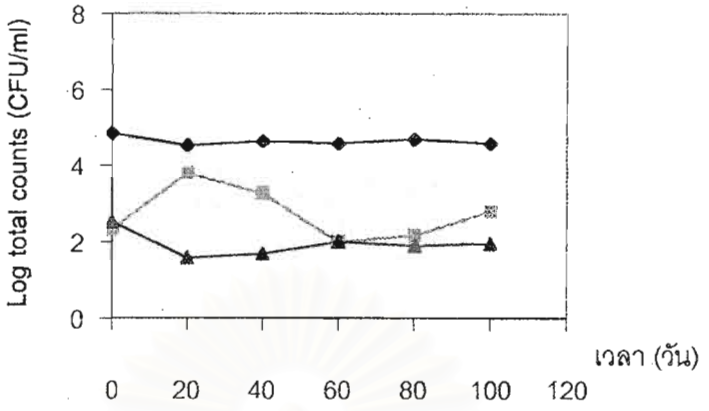


B

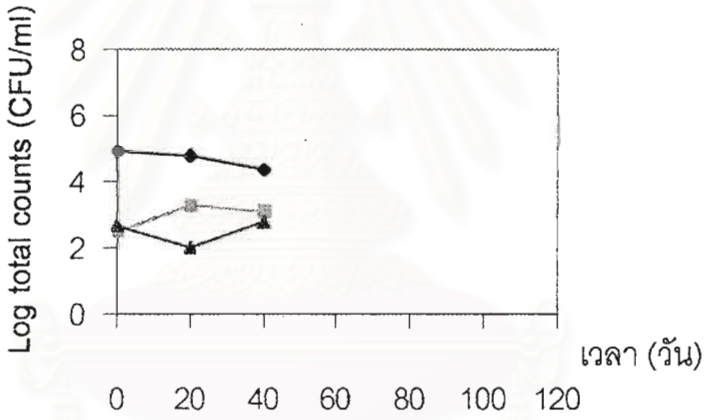
◆ Total Plate Counts ■ *Bacillus* S11 ▲ *Vibrio* spp.

A กลุ่มควบคุม B กลุ่มโพรไบโอติก

รูปที่ 14 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด, *Bacillus* S11 และ *Vibrio* spp.ในลำไส้กุ้งกุลาดำตลอดระยะเวลาการเลี้ยงกุ้งกุลาดำครั้งที่ 3



A

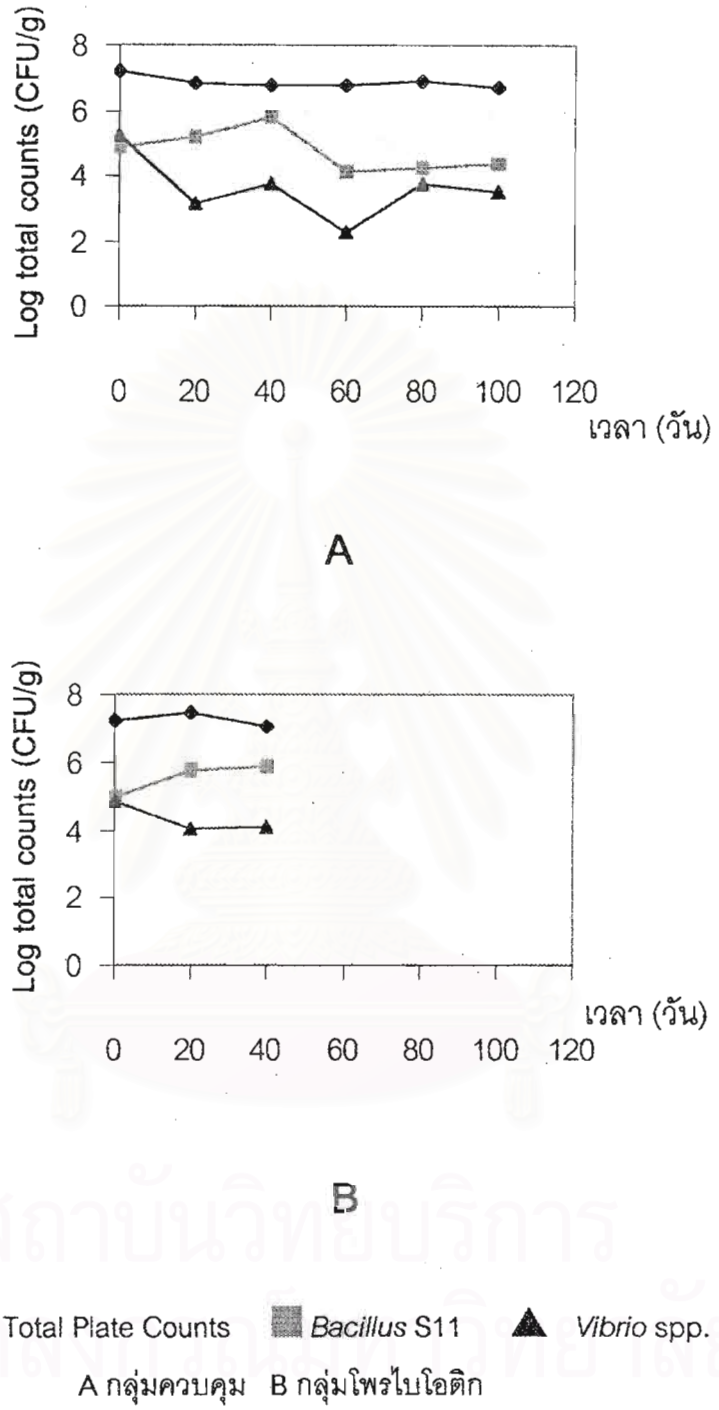


B

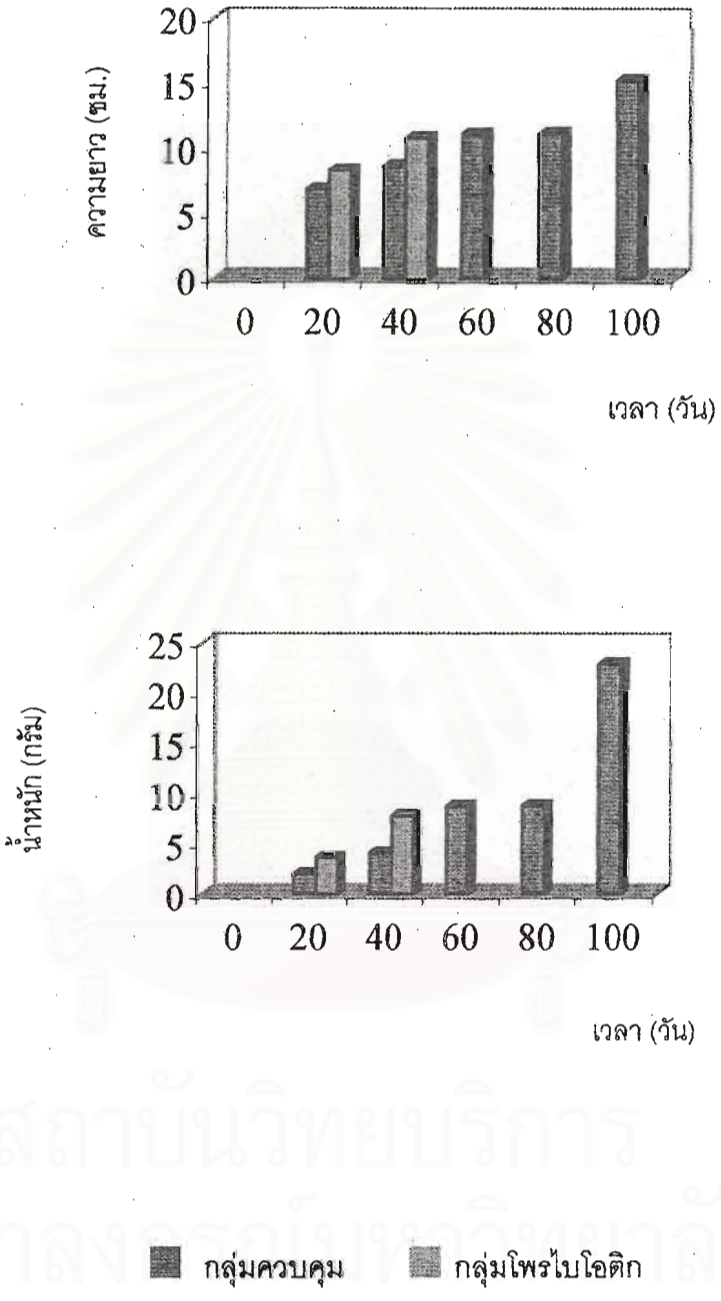
◆ Total Plate Counts ■ *Bacillus* S11 ▲ *Vibrio* spp.

A กลุ่มควบคุม B กลุ่มโพรไบโอติก

รูปที่ 15 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด, *Bacillus* S11 และ *Vibrio* spp. ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำตลอดระยะเวลาการเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 3



รูปที่ 16 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด, *Bacillus* S11 และ *Vibrio* spp.ในดินตะกอนในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 3



รูปที่ 17 ความยาว (เซนติเมตร) และน้ำหนัก (กรัม) ของกุ้งกุลาดำกลุ่มกลุ่มควบคุมและกลุ่มโพรไบโอติก ระหว่างการเลี้ยงกุ้งกุลาดำครั้งที่ 3

ตารางที่ 3 คุณภาพน้ำตลอดระยะเวลาการเลี้ยงกุ้งกุลาดำครั้งที่ 3

คุณภาพน้ำ	ช่วงค่าคุณภาพน้ำ (ต่ำสุด-สูงสุด)	
	บ่อควบคุม	บ่อโพรไบโอติกที่ 2
แอมโมเนียม (มก/ลิตร)	0 – 0.5	0
ไนไตรท์ (มก/ลิตร)	0 – 0.25	0 – 0.25
ฟอตเฟต (มก/ลิตร)	0 – 0.13	0
อุณหภูมิ (°ซ)	29.5 – 30.5	29.5 – 30.5
พีเอช	7.11 – 7.9	7.12 – 7.41
ความเค็ม (ส่วนในพันส่วน)	3 - 4	3 – 4
อัลคาลินิตี้ (มก/ลิตร)	111 - 160	125 - 142
ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (มก/ลิตร)	5.5 – 7.2	5.3 – 7.5

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การทดลองครั้งที่ 4

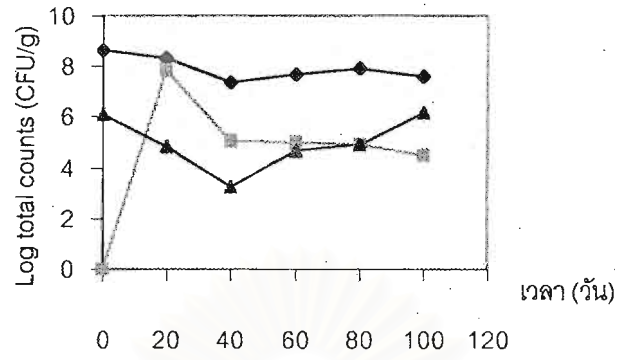
จากการติดตาม ตรวจหาแบคทีเรียทั้งหมดในลำไส้กุ้ง น้ำเลี้ยงกุ้ง และดินตะกอนพบว่ามีค่าประมาณ 10^8, 10^4 และ10^6 CFU/กรัมหรือมล.ตามลำดับ โดยที่ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มโพรไบติก และตรวจพบ *Bacillus* S11 ในกลุ่มควบคุมได้ปริมาณหนึ่งแต่ก็ยังน้อยกว่ากลุ่มที่เสริมโพรไบโอติก ส่วนปริมาณ *Vibrio* spp. มีแนวโน้มที่คล้ายคลึงกัน ในน้ำเลี้ยงกุ้ง กับดินตะกอนแต่มีแนวโน้มลดลงในลำไส้กุ้งที่เสริมโพรไบโอติกในระยะ 60 วันแรกของการเลี้ยง (รูปที่18-20)

ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงกุ้ง 100 วันของการเลี้ยงพบว่า กุ้งกุลาดำกลุ่มที่เสริมโพรไบโอติกมีขนาดความยาวและน้ำหนักของตัวกุ้ง มากกว่ากุ้งกลุ่มควบคุมโดยที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ $P<0.05$ (รูปที่21) และมีอัตราการรอดในกุ้งกุลาดำกลุ่มที่เสริมโพรไบโอติก (76.6 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งมากกว่ากลุ่มควบคุม (65 เปอร์เซ็นต์) โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P<0.05$ เช่นกัน (รูปที่22)

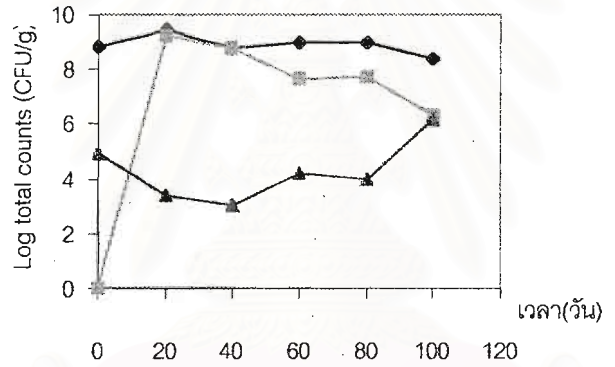
เมื่อรวบรวมกุ้งที่ได้จากการทดลองบางส่วน มาทำการทดสอบการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคเรืองแสงด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 ในบ่อปูน พบว่าสามารถตรวจพบ *V. harveyi* ประมาณ 10^5 CFU/กรัม ในลำไส้กุ้งทั้ง 2 กลุ่มตลอดระยะเวลาการทดลอง แต่พบ *Bacillus* S11 ในลำไส้กุ้งในกลุ่มที่เสริมโพรไบโอติกเท่านั้น (รูปที่ 23-24) ในขณะที่ *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 ในน้ำมีปริมาณลดลงหลังจาก 2 วันแรกของการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค จากประมาณ 10^7เป็น 10^3 CFU/มล. (รูปที่ 25) นอกจากนี้สามมารถตรวจพบ *Bacillus* S11 ในน้ำเลี้ยงกุ้งจากบ่อที่เสริมโพรไบโอติกตลอดระยะเวลาการทดลอง แต่ไม่พบในน้ำเลี้ยงกุ้งของกลุ่มควบคุม (รูปที่ 26) ส่วนเปอร์เซ็นต์การตายสะสม (รูปที่ 27) พบว่ากุ้งกลุ่มควบคุมตายหมดภายในระยะเวลา 6 วันแรกของการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค ส่วนกลุ่มที่เสริมโพรไบโอติกรอดตาย 5 เปอร์เซ็นต์ภายหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคจนครบ 10 วัน

ผลของคุณภาพน้ำบางประการตลอดระยะเวลาการเลี้ยงกุ้ง จากการติดตาม พบว่ามีค่าอยู่ในเกณฑ์ปกติที่ปลอดภัยสำหรับกุ้งกุลาดำ และไม่มีความแตกต่างกันในกลุ่มควบคุมและกลุ่มโพรไบโอติกจึงสรุปได้ว่า โพรไบโอติกที่เสริมในอาหารเลี้ยงกุ้งไม่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งกุลาดำ

จากผลการทดลองในระดับบ่อดินทั้ง 4 ครั้งทำให้สรุปถึงความเป็นไปได้ในการใช้โพรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำแทนการใช้สารปฏิชีวนะและสารเคมีอื่นๆ



A

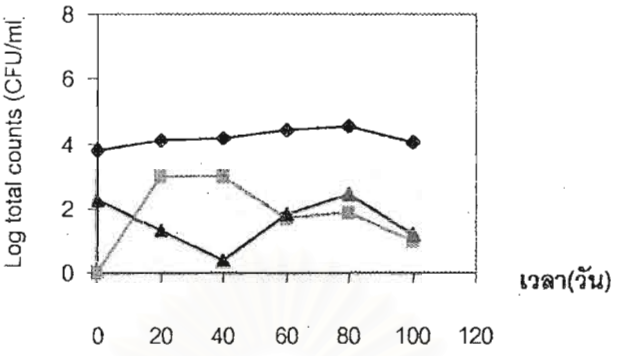


B

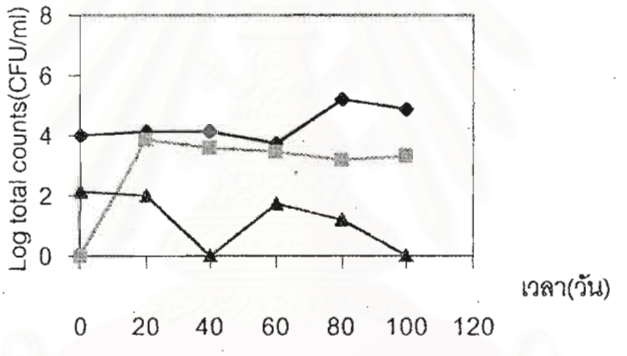
◆ TVC ■ *Bacillus* S11 ▲ *Vibrio* spp.

A กลุ่มควบคุม B กลุ่มโพรไบโอติก

รูปที่ 18 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด, *Bacillus* S11 และ *Vibrio* spp. ในลำไส้กุ้งกุลาดำตลอดระยะเวลาการเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 4



A

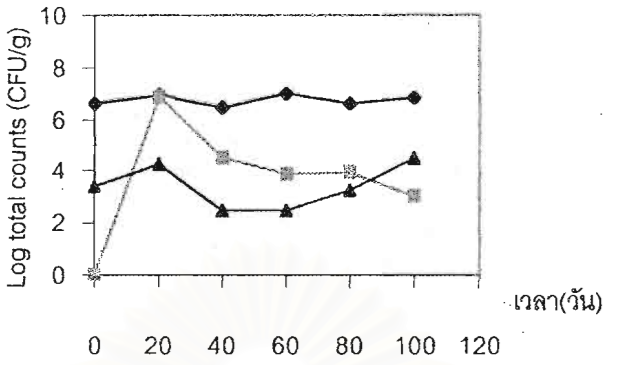


B

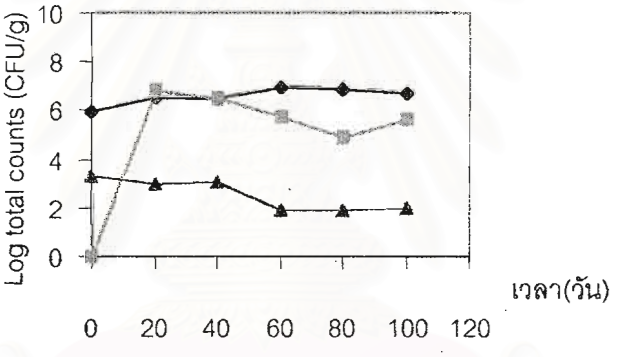
◆ TVC ■ *Bacillus* S11 ▲ *Vibrio* spp.

A กลุ่มควบคุม B กลุ่มโพรไบโอติก

รูปที่ 19 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด, *Bacillus* S11 และ *Vibrio* spp. ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำตลอดระยะเวลาการเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 4



A

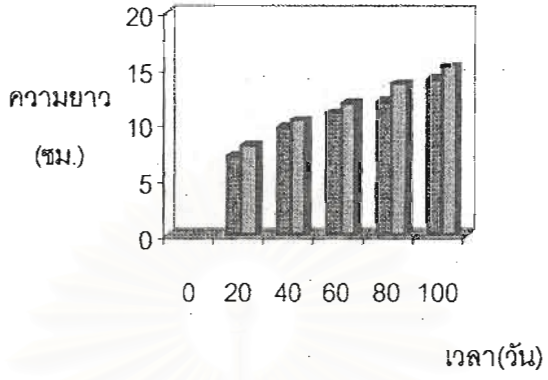


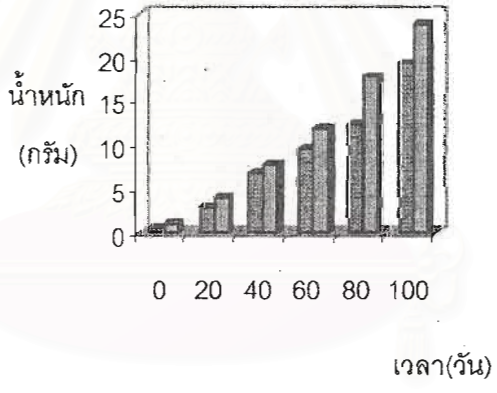
B

◆ TVC ■ *Bacillus* S11 ▲ *Vibrio* spp.

A กลุ่มควบคุม B กลุ่มโพรไบโอติก

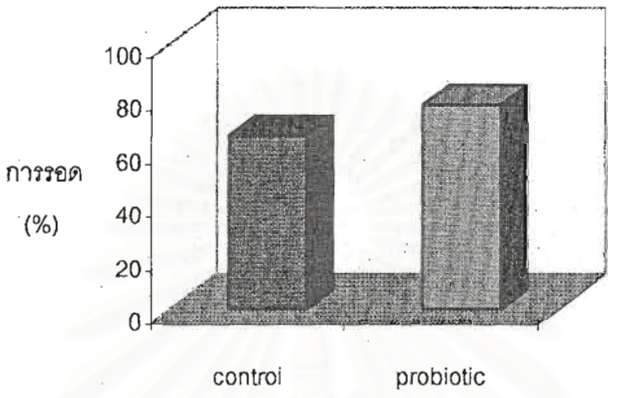
รูปที่ 20 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด, *Bacillus* S11 และ *Vibrio* spp. ในตะกอนดินในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 4





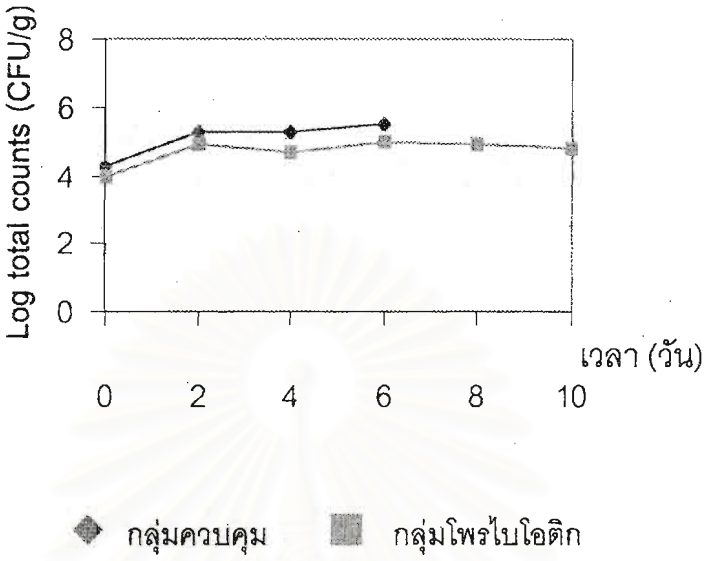
กลุ่มควบคุม กลุ่มโพรไบโอติก

รูปที่ 21 ความยาว (เซนติเมตร) และน้ำหนัก (กรัม) ของกุ้งกุลาดำตลอดระยะเวลาการเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 4

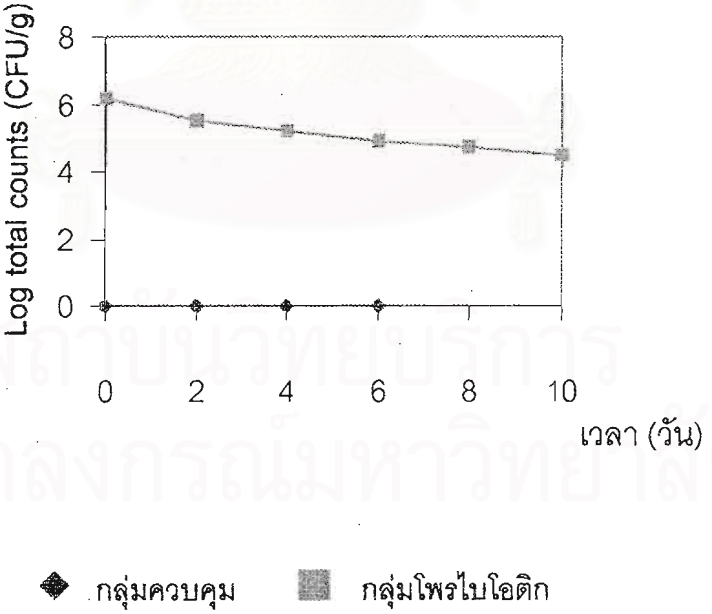


รูปที่ 22 การรอด (%) ของกุ้งกุลาดำในการเลี้ยงครั้งที่ 4 กลุ่มควบคุมและกลุ่มโพรไบโอติก ภายหลังจากทำการเลี้ยงเป็นระยะเวลา 100 วัน

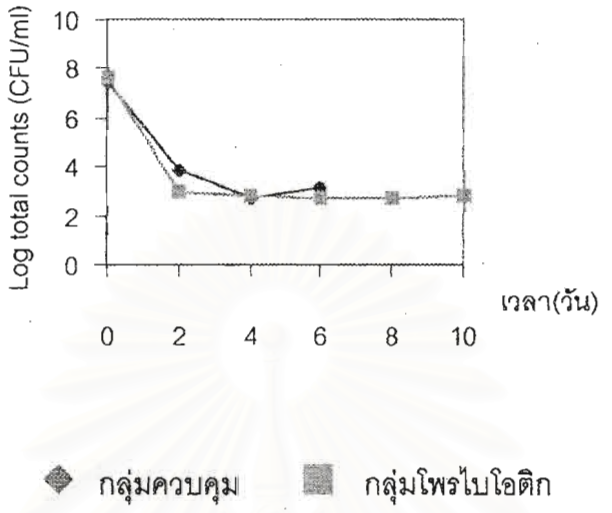
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



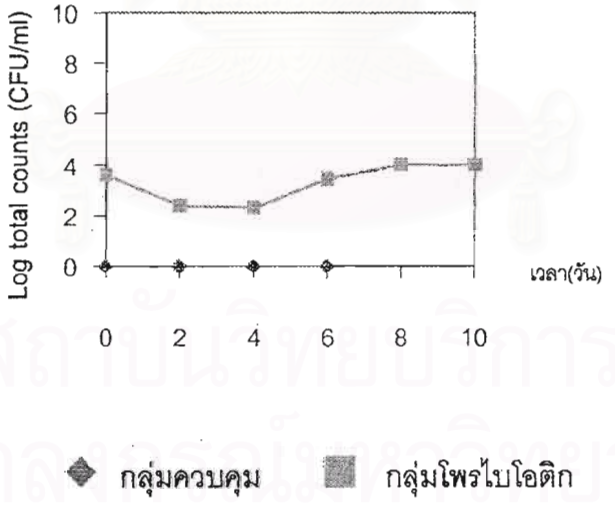
รูปที่23 ปริมาณ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 1526 ในลำไส้กุ้งกุลาดำระหว่างการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 1526 เป็นระยะเวลา 10 วัน



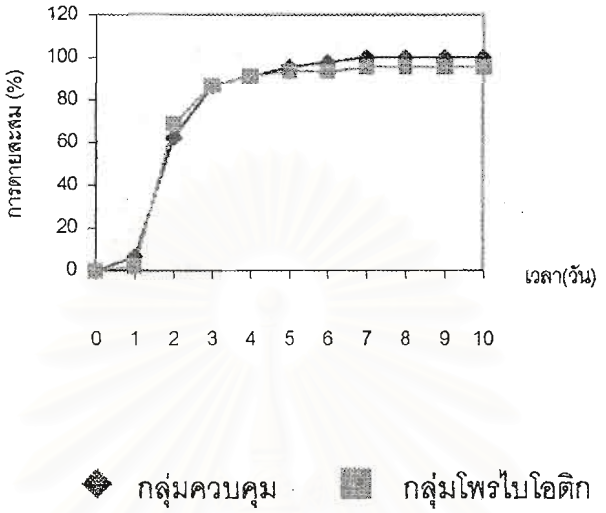
รูปที่ 24 ปริมาณ *Bacillus* S11 ในลำไส้กุ้งกุลาดำระหว่างการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 1526 เป็นระยะเวลา 10 วัน



รูปที่ 25 ปริมาณ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 1526 ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำระหว่างการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 1526 เป็นระยะเวลา 10 วัน



รูปที่ 26 ปริมาณ *Bacillus* S11 ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำระหว่างการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 1526 เป็นระยะเวลา 10 วัน



รูปที่ 27 การตายสะสม (cumulative mortality) ของกุ้งกุลาดำระหว่างการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 1526 เป็นระยะเวลา 10 วัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 คุณภาพน้ำตลอดระยะเวลาการเลี้ยงกุ้งกุลาดำครั้งที่ 4

คุณภาพน้ำ	ช่วงค่าคุณภาพน้ำ (ต่ำสุด-สูงสุด)	
	บ่อควบคุม	บ่อโพรไบโอติกที่ 1
แอมโมเนียม (มก/ลิตร)	0 – 0.5	0 – 0.5
ไนไตรท์ (มก/ลิตร)	0 – 0.25	0 – 0.25
ฟอตเฟต (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)	5.3 – 6.5	5.7 – 6.8

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

การทดลองทั้ง 4 ครั้งเป็นเพียงการทดลองเบื้องต้น เพื่อนำร่องไปสู่โครงการในระดับบ่อดินขนาดใหญ่ที่เกษตรกรไทยปฏิบัติจริงๆในการประกอบการเลี้ยงกุ้งกุลาดำระดับอุตสาหกรรม ผลการทดลองในครั้งนี้ได้ให้แนวทางและประสบการณ์ในการจัดการโครงการวิจัยหลักต่อไป ทั้งนี้สามารถรวบรวมและให้ความคิดเห็น จากผลงานในช่วงระยะ 1 ปี ที่ได้รับการสนับสนุนเพียงบางส่วน จากเงินงบประมาณแผ่นดินปี 2543 ดังนี้คือ

1. การทดลองครั้งที่ 1 พบแนวโน้มในเชิงบวกต่อการเสริมโพรไบโอติก *Bacillus* S11 ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ในระดับบ่อดิน

2. การทดลองครั้งที่ 2 ผลของระบบนิเวศน์ในบ่อแต่ละบ่อและการจัดการเป็นปัจจัยร่วมต่อการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ เนื่องจากกลุ่มที่เสริมโพรไบโอติกทั้ง 2 บ่อยังได้ผลที่แตกต่างของผลิตผลที่ได้รับ

3. การทดลองครั้งที่ 3 โพรไอติกไม่สามารถใช้รักษาโรคได้แต่อาจใช้ยืดระยะเวลาการแสดงอาการของโรคได้ในระยะหนึ่ง ดังนั้นการเสริมโพรไบโอติกแก่กุ้งกุลาดำวัยอ่อนก่อนนำกุ้งมาเลี้ยงน่าจะเป็นแนวทางหนึ่งที่ช่วยเสริมภูมิต้านทานในกุ้งกุลาดำให้ได้ผลดีมากขึ้น

4.การทดลองครั้งที่ 4 ในสภาพระบบนิเวศน์เดียวกัน ผลจากการเสริมโพรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งทำให้เพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของกุ้งได้เร็วกว่ากุ้งที่ไม่ได้รับการเสริมโพรไบโอติก และจากการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค กุ้งกลุ่มเสริมโพรไบโอติกมีความทนต่อการติดเชื้อมากกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับโพรไบโอติก

5. สรุปโดยรวม โพรไบโอติกน่าจะเป็นปัจจัยเสริมให้กุ้ง มีสุขภาพดี เจริญเติบโตได้ไว มีน้ำหนักตัวเพิ่มเร็ว ควรที่เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งจะนำไปใช้ทดแทนการใช้สารเคมีและสารปฏิชีวนะในปัจจุบัน เพื่อลดปัญหากีดกันทางการค้าในธุรกิจการส่งออกกุ้งกุลาดำ และกุ้งมีความทนต่อการติดเชื้อได้ในระดับหนึ่ง การใช้โพรไบโอติกจะเป็นทางเลือกที่ดีอีกทางเลือกหนึ่งในการนำมาใช้เลี้ยงสัตว์เศรษฐกิจในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

ภาษาไทย

กรมเศรษฐกิจการพาณิชย์. 2542a. ปริมาณและมูลค่าการส่งออกกุ้งแช่แข็งของไทยปี 2540-2541. **วารสารเครือเจริญโภคภัณฑ์ ข่าวกุ้ง** 128: 3.

กรมเศรษฐกิจการพาณิชย์. 2542b. สัดส่วนครองตลาดกุ้งไทย ปี 2541. **วารสารเครือเจริญโภคภัณฑ์ ข่าวกุ้ง** 134: 9.

ทีมงานข่าวกุ้ง. 2542. สถานการณ์เลี้ยงกุ้งโลกปี 2541. **วารสารเครือเจริญโภคภัณฑ์ ข่าวกุ้ง** 129: 4.

พรเลิศ จันทร์รัชชกูล. 2541. รูปแบบของการเลี้ยงกุ้งกุลาดำในประเทศไทย. **วารสารข่าวโรคสัตว์น้ำ** 8: 2.

วรรนิภา เพี้ยนภักตร์. 2539. **การใช้แบคทีเรียเป็นโพรไบโอติกเสริมในอาหารกุ้ง**. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สมบัติ รักประทานพร. 2542. **การเสริมภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* ด้วย *Bacillus* สายพันธุ์ S11**. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

David, J. J., Chu, C. T., Krishnan, S. S. 1998. Successful use of bacterial bioremediation to control *Vibrio* populations in shrimp ponds. *In* T. W. Flegel, (ed.), **Advances in shrimp biotechnology**, p. 235., Bangkok: National Center for Genetic Engineering and Biotechnology.

Fast A. W. and Menasveta, P. 1998. Some recent innovations in marine shrimp pond recycling systems. *In* T. W. Flegel, (ed.), **Advances in shrimp biotechnology**, pp. 87-92., Bangkok:National Center for Genetic Engineering and Biotechnology.

Flegel, T. W., Fegan, D. F., Kongsom, S., Vuthikomudomkit, S., Sriuraiatana, S., Boonyarapalin, S., Chantanachookhin, C., Vickers, J. E. and Macdonald, O. D. 1992. Occurence, diagnosis and treatment of shrimp diseases in Thailand. *In* W.

Fulk and K. L. Main(eds.) **Diseases of cultured penaeid shrimp in Asia and the United States**, pp57-112. Hawaii: The Oceanic Institute.

Ketut, S. H. and Tsumura, S. 1998. Use of By-9 as a probiotic agent in the larval rearing of *Penaeus monodon*. *In* T. W. Flegel (ed.), **Advances in shrimp biotechnology**, p183., Bangkok: National Center for Genetic Engineering and Biotechnology.

Limsuwan, C. and Chanratchakool, P. 1998. A closed recycle system for sustainable black tiger shrimp culture in freshwater areas. *In* T. W. Flegel (ed.), **Advances in shrimp biotechnology**, p125., Bangkok: National Center for Genetic Engineering and Biotechnology.

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

Musig,Y. and Boonnom,S. 1998 . Low salinity culture of *Penaeus Monodon* Fabricius and its effect on the enviroment. *In* T.W. Flegel (ed.), **Advances in shrimp biotechnology**, p123.. Bangkok: National Center for Genetic Engineering and Biotechnology.

Rengpipat, S., Phianphak, W., Piyatiratitivorakul, S. and Menasveta, P. 1998a. Effect of probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. **Aquaculture**. 167: 301-313.

Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitivorakul, S. and Menasveta, P. 1998b. Probiotics in aquaculture: a case study of probiotics for larvae of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *In* T. W. Flegel (ed.), **Advances in shrimp biotechnology**, pp. 177-181., Bangkok: National Center for Genetic Engineering and Biotechnology.

Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitivorakul, S. and Menasveta, P., 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by probiont bacterium (*Bacillus* S11). **Aquaculture**. 191: 271-288.

Spaargaren, D. A. 1996. Disease in cultures of tiger prawns, *Penaeus monodon* Fabricius, 1798. **Crustaceana**, 69 (8): 1018-1024.