บทที่ 4

ผลการทดลอง

การแยกแบคทีเรียประจำถิ่นจากทางเดินอาหารกุ้งกุลาดำ

การทดลองแยกแบคทีเรียจากทางเดินอาหารของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำจากทะเลฝั่งอันดามันและอ่าวไทยจำนวน 35 ตัว พบว่ามีปริมาณแบคทีเรียรวม $8.5 \times 10^3 - 5.9 \times 10^7$ CFU/กรัมลำไส้ ประกอบด้วยแบคทีเรีย *Vibrio* $3 \times 10 - 1.31 \times 10^2$ CFU/กรัมลำไส้ และ *Bacillus* 8.5×10^3 CFU/กรัมลำไส้ ทั้งหมด 3 ไอโซเลต เมื่อนำแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* spp. มาตรวจสอบพบว่าสามารถแยกออกได้ตามรูปร่าง 3 ไอโซเลต จากนั้นนำมาขีดแยกให้ได้โคโลนีแบคทีเรียบริสุทธิ์และทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *V. harveyi*, *V. vulnificus*, *V. flurialis*, *V. parahaemolyticus* และ *E. coli* ตามการทดลองข้อที่ 2 ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบโดยแบคทีเรียที่แยกจากทางเดินอาหารกุ้งกุลาดำ

แบคทีเรียที่แยกได้จากทางเดินอาหารกุ้งกุลาดำ	บริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้นกับเชื้อทดสอบ (ซม.)				
	V. harveyi สายพันธุ์ 639	*V. vulnificus*	*V. flurialis*	*V. parahaemolyticus*	*E. coli*
BP1	2.1	-	-	3.0	2.0
BP11	3.0	-	-	-	1.15
BP2	2.1	-	-	3.8	1.2

หมายเหตุ เส้นผ่านศูนย์กลางขนาดหลุม 0.5 ซม.

ผลการทดลองการผสมแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆที่แยกได้จากแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำกับอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำในอัตราส่วนต่าง ๆ

เมื่อนำ Bacillus แต่ละไอโซเลตทั้ง 3 ไอโซเลตมาผสมกับอาหารกุ้งในอัตราส่วนต่างๆกัน กล่าวคือ 1:3, 1:4 และ 1:5 (น้ำหนักเซลล์เปียก:น้ำหนักอาหารกุ้ง) ให้เข้ากันจากนั้นตรวจหา BP1, BP2และ BP11 ต่อกรัมอาหารกุ้ง ดังแสดงผลในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 แสดงจำนวนแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆที่แยกได้จากแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำเมื่อผสมในอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำในอัตราส่วนต่างๆ

อัตราส่วนแบคทีเรีย (กรัม) : อาหารเลี้ยงกุ้ง (กรัม)	จำนวนแบคทีเรีย/กรัมอาการเลี้ยงกุ้ง (CFU/g)		
	BP1	BP11	BP2
1 : 3	2.31×10^{10}	2.87×10^{10}	2.56×10^{10}
1 : 4	1.87×10^{10}	2.29×10^{10}	2.09×10^{10}
1 : 5	3.35×10^{9}	3.61×10^{9}	3.57×10^{9}

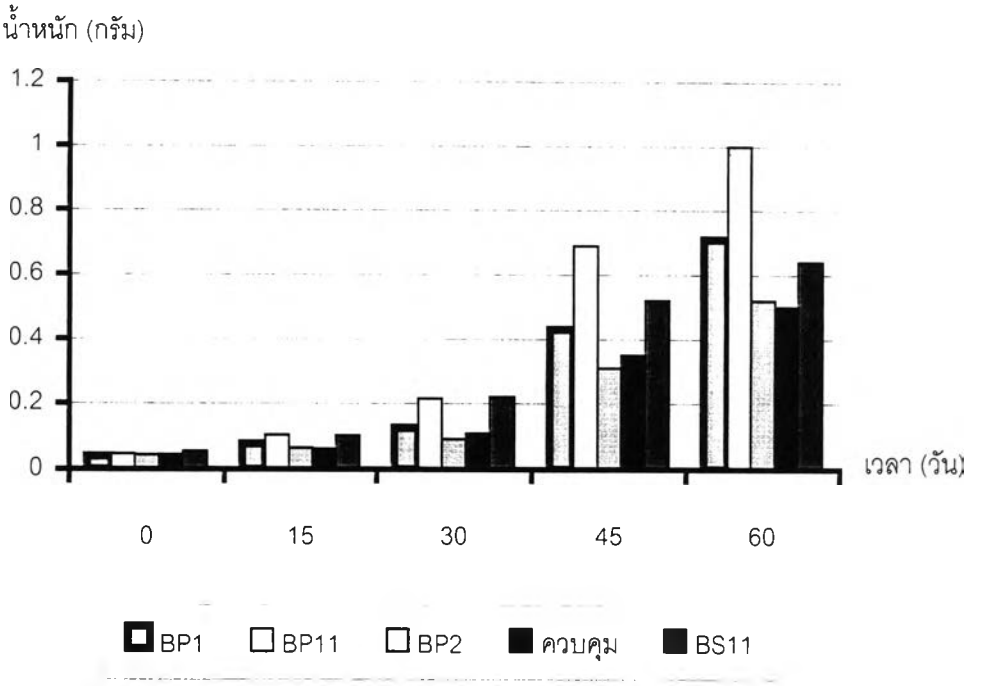
หมายเหตุ * น้ำหนักเซลล์เปียก

จากผลตารางที่ 4.2 เลือกอัตราส่วนที่เหมาะสมคือ แบคทีเรีย : อาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำในอัตราส่วน 1: 4 เพื่อให้มีจำนวนแบคทีเรียในอาหารประมาณ 10^{10} CFU/กรัม (วรรนิภา เพี้ยนภักตร์, 2539) นำมาเลี้ยงกุ้งกุลาดำเป็นเวลานาน 60 วัน เพื่อเป็นการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการเพิ่มการเจริญเติบโตและการต้านทานโรคที่เกิดจาก *Vibio harveyi*

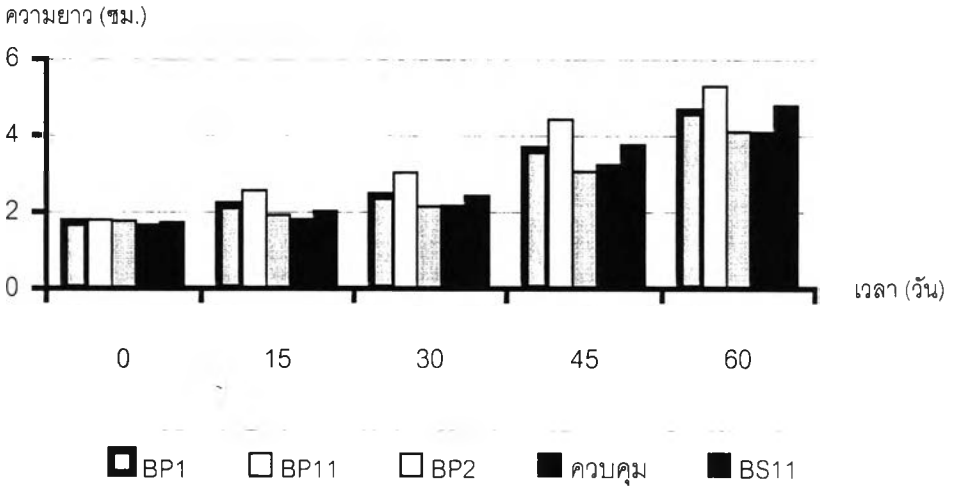
ผลการทดลองเลี้ยงกุ้งกุลาดำในตู้กระจกขนาด 20 ลิตร

หลังจากคัดแยกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติสามารถยับยั้งการเจริญของ *Vibrio harveyi* และนำแบคทีเรียดังกล่าวมาผสมในอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำและนำไปใช้เลี้ยงกุ้งกุลาดำในระยะโพสลาวา 25 โดยทำการเลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน ผลการทดลองพบว่ากุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม

แบคทีเรีย *Bacillus* P11 มีน้ำหนักและความยาวมากกว่ากุ้งในกลุ่มการทดลองอื่นๆ แสดงดังรูปที่ 1 และรูปที่ 2



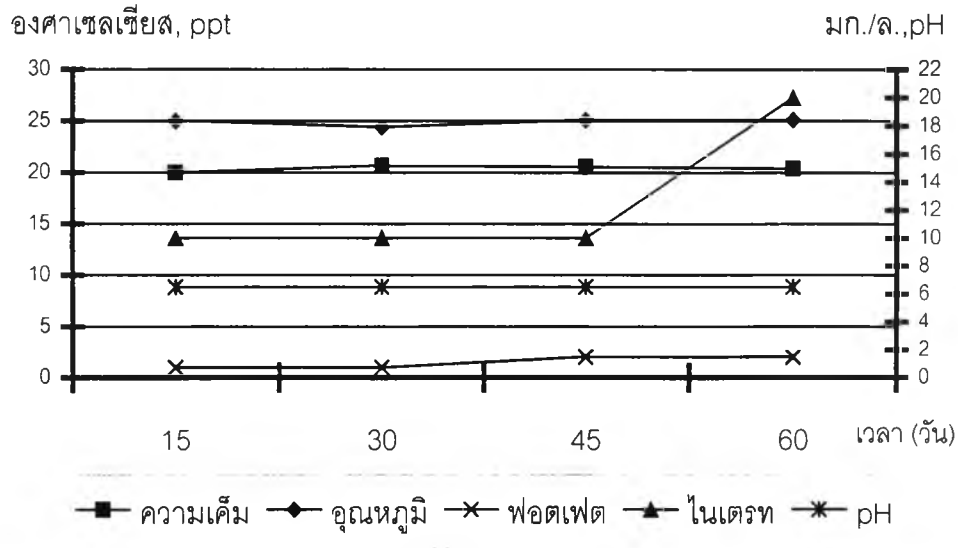
รูปที่ 1 แสดงผลของน้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆที่แยกจากทางเดินอาหารแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ โดยเลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน



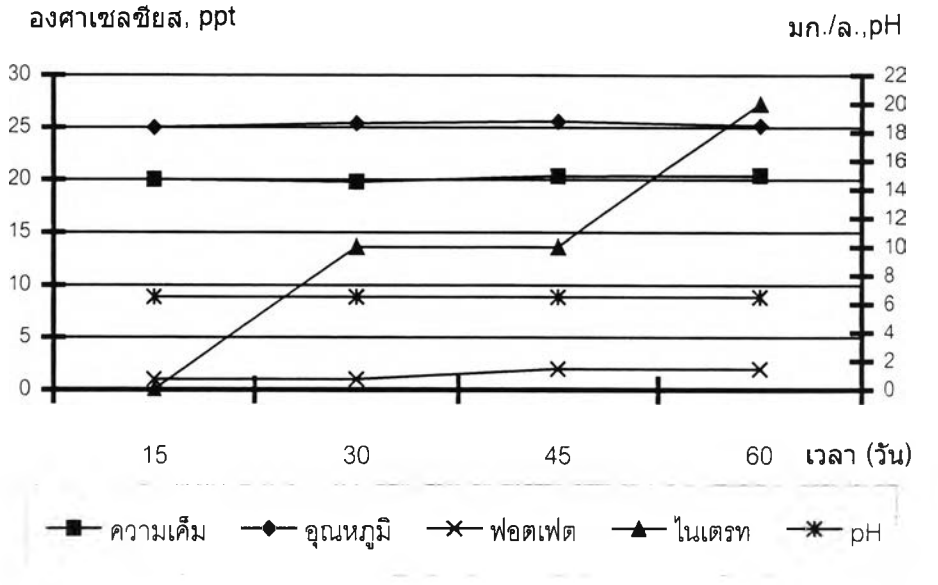
รูปที่ 2 แสดงผลความยาวเฉลี่ยของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆที่แยกจากทางเดินอาหารแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำโดยเลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน

ผลคุณภาพน้ำระหว่างการเลี้ยงกุ้งกุลาดำเป็นระยะเวลา 60 วันในตู้กระจกขนาด 20 ลิตร

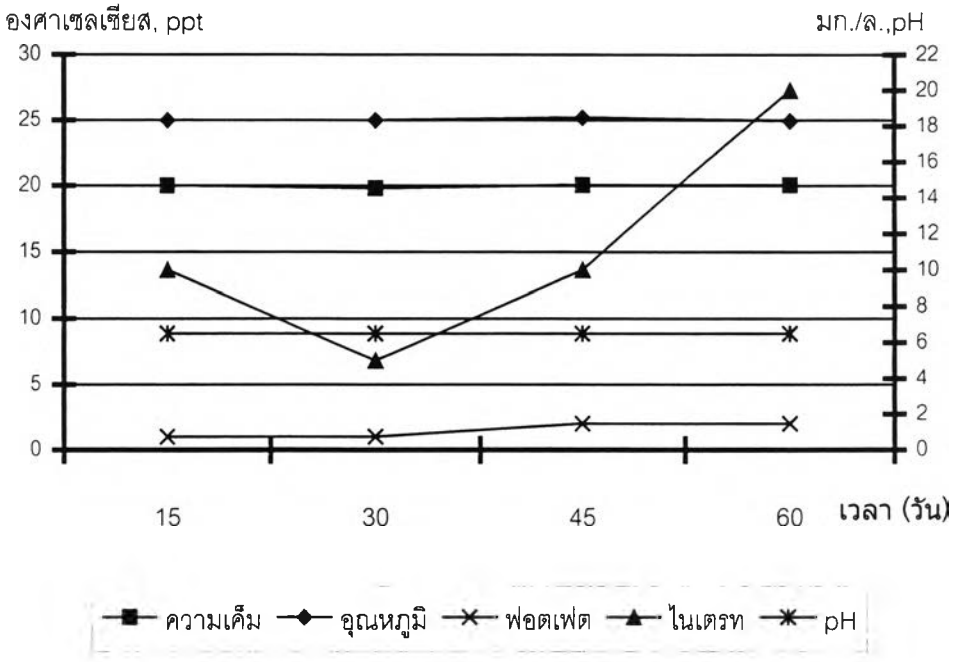
คุณภาพน้ำระหว่างการเลี้ยงกุ้งในระดับตู้กระจกในแต่ละกลุ่มการทดลองพบว่า ค่าของปัจจัยต่างๆมีค่าค่อนข้างคงที่ตลอดเวลาการทดลอง ได้แก่ ความเค็ม 20 ppt ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) อยู่ในช่วง 6.5-7.0 ปริมาณฟอสเฟตอยู่ในช่วง 0.1-2.0 มก./ล. อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส สำหรับปริมาณไนเตรทพบว่าในแต่ละกลุ่มทดลองมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเนื่องจากเกิดการสะสมของอาหารที่เหลือค้างรวมทั้งของเสียที่กุ้งขับถ่ายออกมา แต่ทั้งนี้ปริมาณที่เพิ่มขึ้นยังคงอยู่ในช่วงที่ปลอดภัยต่อกุ้งคือ น้อยกว่า 200 มก./ล. ดังแสดงในรูปที่ 3-7



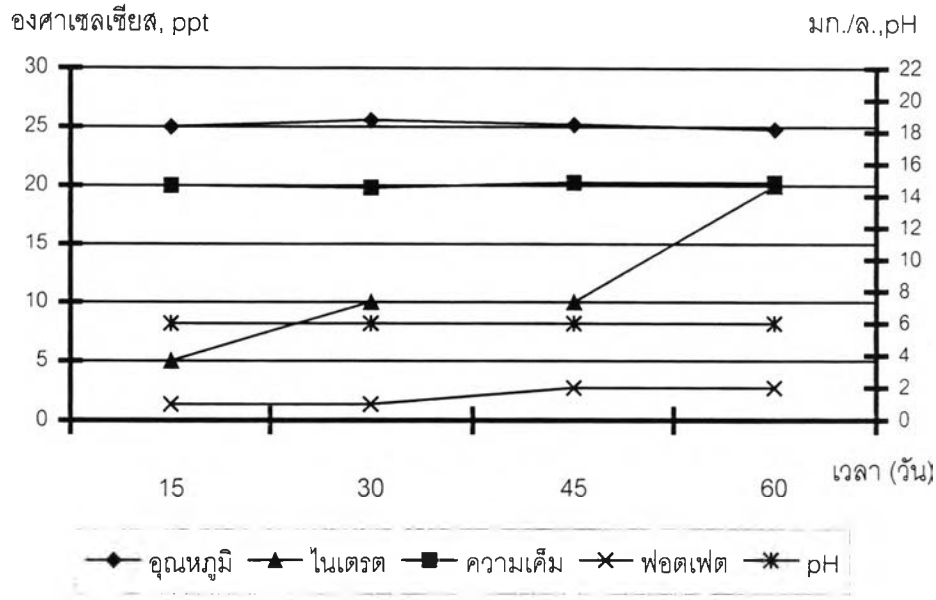
รูปที่ 3 แสดงการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ, ความเค็ม, ปริมาณไนเตรท, ปริมาณฟอสเฟตและค่าความเป็นกรด - ด่างในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำในกลุ่มควบคุมเป็นระยะเวลา 60 วัน



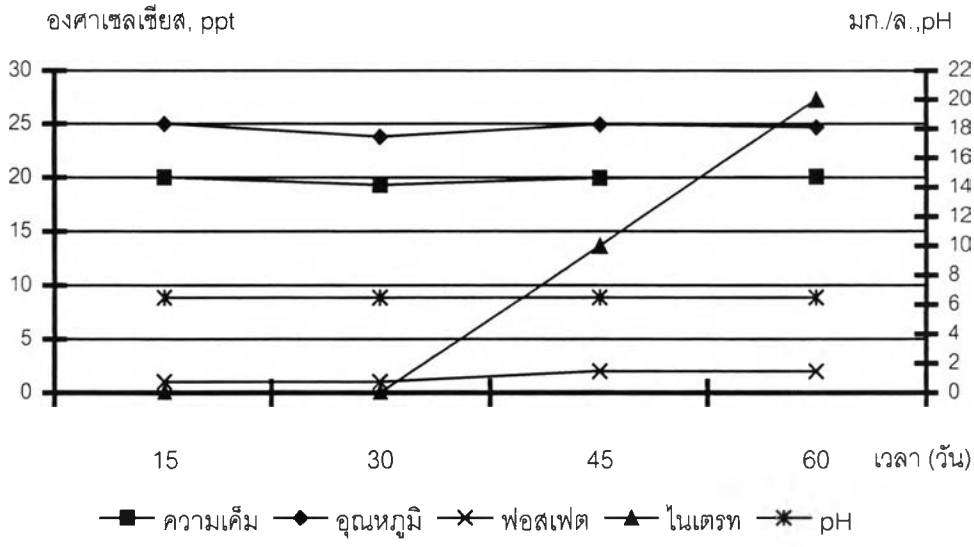
รูปที่ 4 แสดงการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ, ความเค็ม, ปริมาณไนเตรท, ปริมาณฟอสเฟตและค่าความเป็นกรด - ด่างในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำในกลุ่มที่เลี้ยงด้วย BP1 เป็นระยะเวลา 60 วัน



รูปที่ 5 แสดงการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ, ความเค็ม, ปริมาณไนเตรท, ปริมาณฟอสเฟตและค่าความเป็นกรด - ด่างในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำในกลุ่มที่เลี้ยงด้วย BP2 เป็นระยะเวลา 60 วัน



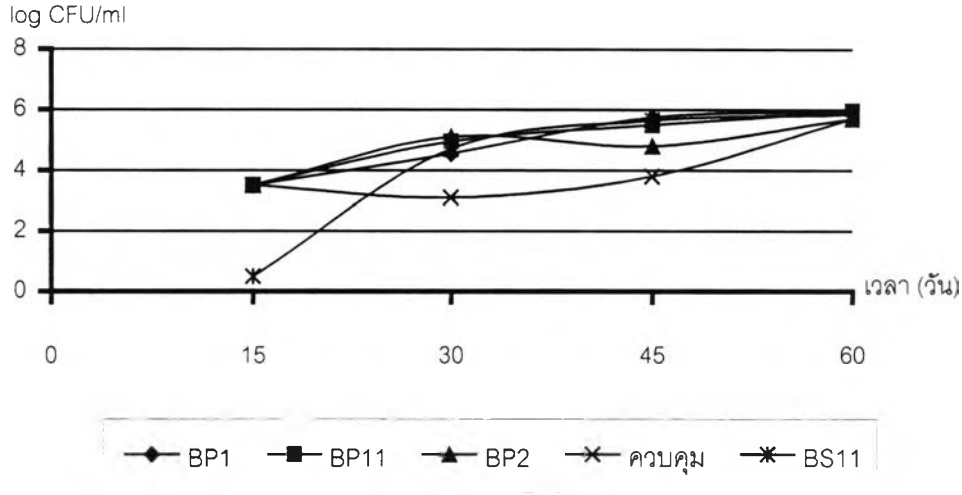
รูปที่ 6 แสดงการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ, ความเค็ม, ปริมาณไนเตรท, ปริมาณฟอสเฟตและค่าความเป็นกรด - ด่างในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำในกลุ่มที่เลี้ยงด้วย BP11 เป็นระยะเวลา 60 วัน



รูปที่ 7 แสดงการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ, ความเค็ม, ปริมาณไนเตรท,ปริมาณฟอสเฟตและค่าความเป็นกรด - ด่างในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำในกลุ่มที่เลี้ยงด้วย BS11 เป็นระยะเวลา 60 วัน

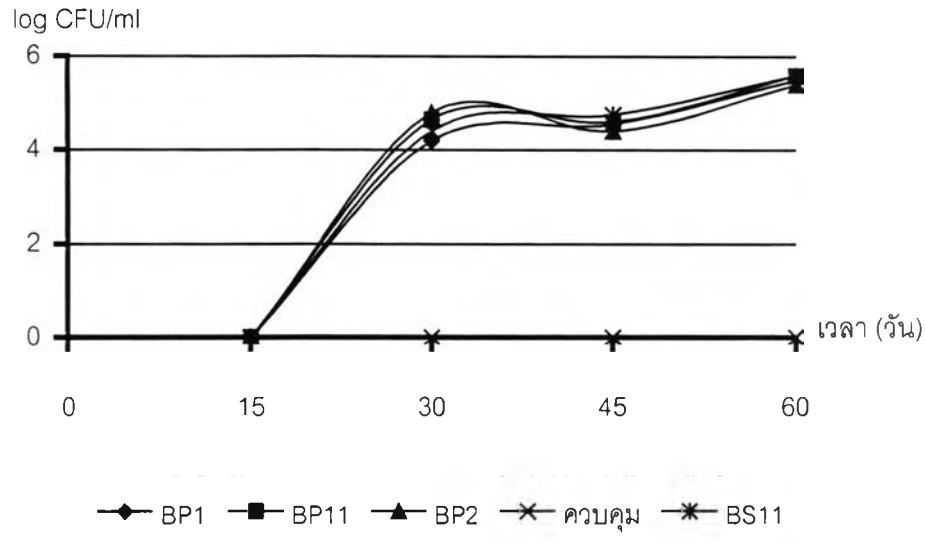
ผลปริมาณแบคทีเรียรวมและ *Bacillus* spp. ในน้ำเลี้ยงกุ้งในบ่อขนาด 20 ลิตร

การทดลองหาปริมาณแบคทีเรียรวมในน้ำระหว่างการเลี้ยงกุ้งพบว่าปริมาณแบคทีเรียรวมในน้ำกลุ่มควบคุมอยู่ในช่วง 10^3 – 10^5 CFU/ml สำหรับในน้ำของกลุ่มการเลี้ยงที่มีการผสมอาหารด้วย *Bacillus* spp. มีปริมาณแบคทีเรียรวมอยู่ในช่วง 10^4 – 10^6 CFU/ml ดังแสดงในรูปที่ 8

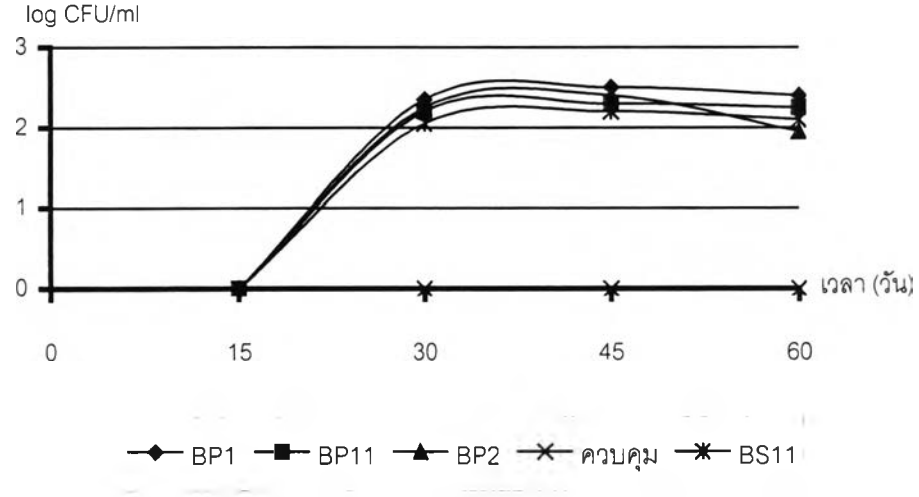


รูปที่ 8 แสดงปริมาณแบคทีเรียรวมในน้ำเลี้ยงกุ้งในบ่อขนาด 20 ลิตร เป็นระยะเวลา 60 วัน

การทดลองหาปริมาณ *Bacillus* spp. และสปอร์ในน้ำระหว่างการเลี้ยงกุ้ง ไม่พบ *Bacillus* sp. และสปอร์ในน้ำกลุ่มควบคุม สำหรับในน้ำของกลุ่มการเลี้ยงที่มีการผสมอาหารด้วย *Bacillus* spp. มีปริมาณ *Bacillus* spp. อยู่ในช่วง 10 – 10^5 CFU/ml และปริมาณสปอร์ในช่วง 10 – 10^3 CFU/ml ดังแสดงในรูปที่ 9 และ 10 ตามลำดับ



รูปที่ 9 แสดงปริมาณแบคทีเรีย *Bacillus* spp.ในน้ำเลี้ยงกุ้งในบ่อขนาด 20 ลิตร เป็นระยะเวลา 60 วัน

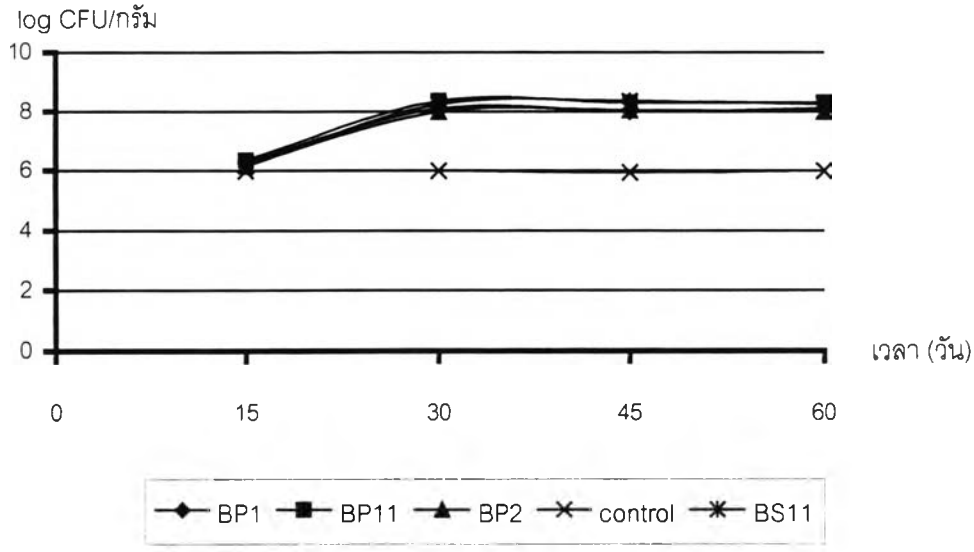


รูปที่ 10 แสดงปริมาณสปอร์ *Bacillus* spp.ในน้ำเลี้ยงกุ้งในบ่อขนาด 20 ลิตร เป็นระยะเวลา 60 วัน

ผลปริมาณแบคทีเรียรวมและ *Bacillus* spp. ในตะกอนและอุจจาระกุ้งในบ่อขนาด 20 ลิตร

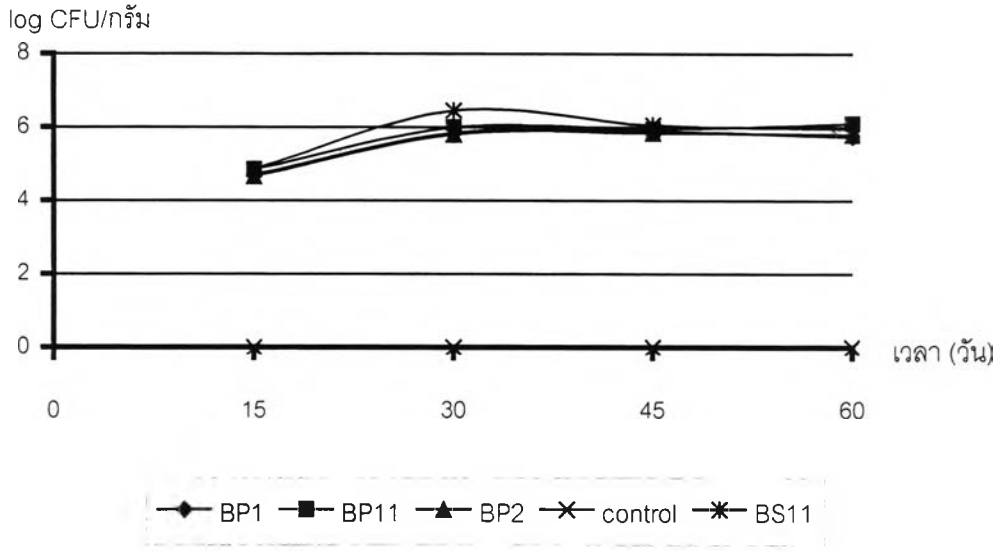
การทดลองหาปริมาณแบคทีเรียรวมในตะกอนและอุจจาระในบ่อระหว่างการเลี้ยงกุ้งพบว่า ปริมาณแบคทีเรียรวมในตะกอนกลุ่มควบคุมประมาณ 10^6 CFU/ml สำหรับในตะกอนของกลุ่มการ

เลี้ยงที่มีการผสมอาหารด้วย *Bacillus* spp. มีปริมาณแบคทีเรียรวมอยู่ในช่วง 10^6 – 10^8 CFU/ml ดังแสดงในรูปที่ 11

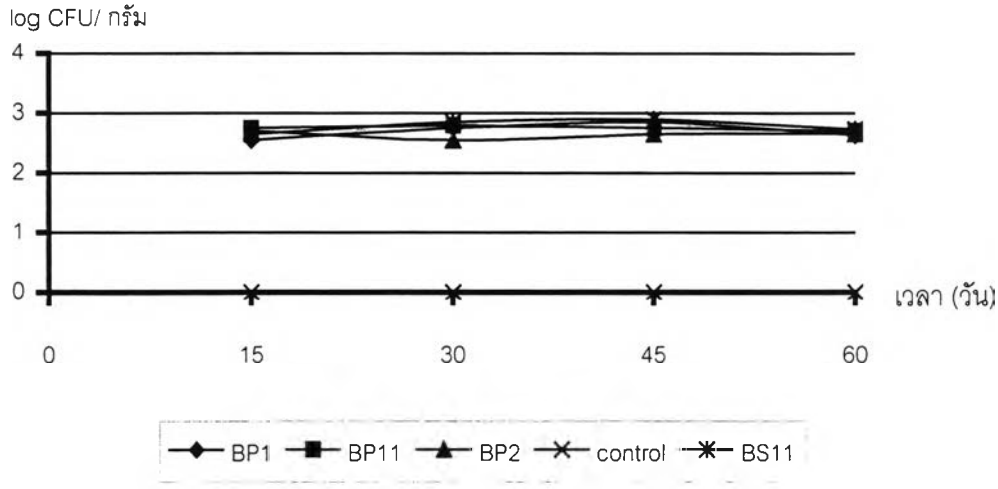


รูปที่ 11 แสดงปริมาณแบคทีเรียรวมในตะกอนและอุจจาระกุ้งในบ่อขนาด 20 ลิตรเป็นระยะเวลา 60วัน

การทดลองหาปริมาณ *Bacillus* sp. และสปอร์ในตะกอนและอุจจาระในบ่อระหว่างการเลี้ยงกุ้ง ไม่พบ *Bacillus* spp. และสปอร์ในตะกอนกลุ่มควบคุม สำหรับในตะกอนของกลุ่มการเลี้ยงที่มีการผสมอาหารด้วย *Bacillus* spp. มีปริมาณ *Bacillus* spp. อยู่ในช่วง 10^4 – 10^6 CFU/ml และปริมาณสปอร์ 10^3 CFU/ml ดังแสดงในรูปที่ 12 และ 13 ตามลำดับ



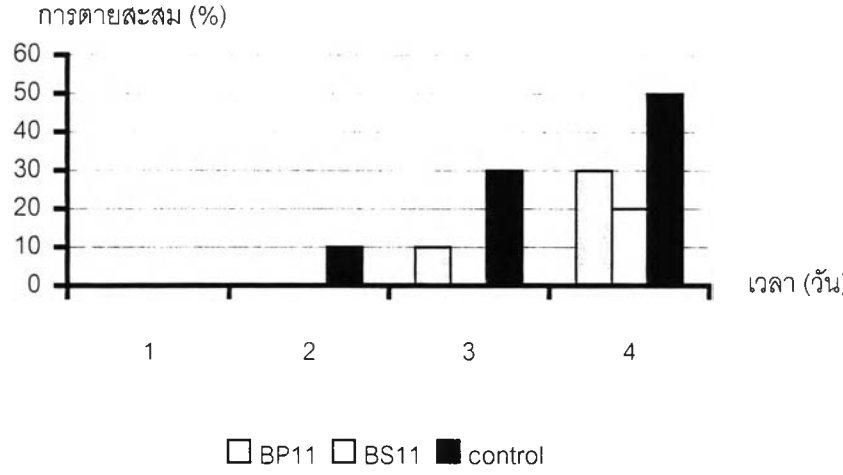
รูปที่ 12 แสดงปริมาณ *Bacillus* spp.ในตะกอนและอุจจาระกุ้งในบ่อขนาด 20 ลิตรเป็นระยะเวลา 60 วัน



รูปที่ 13 แสดงปริมาณสปอร์ *Bacillus* sp.ในตะกอนและอุจจาระกุ้งในบ่อขนาด 20 ลิตร เป็นระยะเวลา 60 วัน

ผลการชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 1526

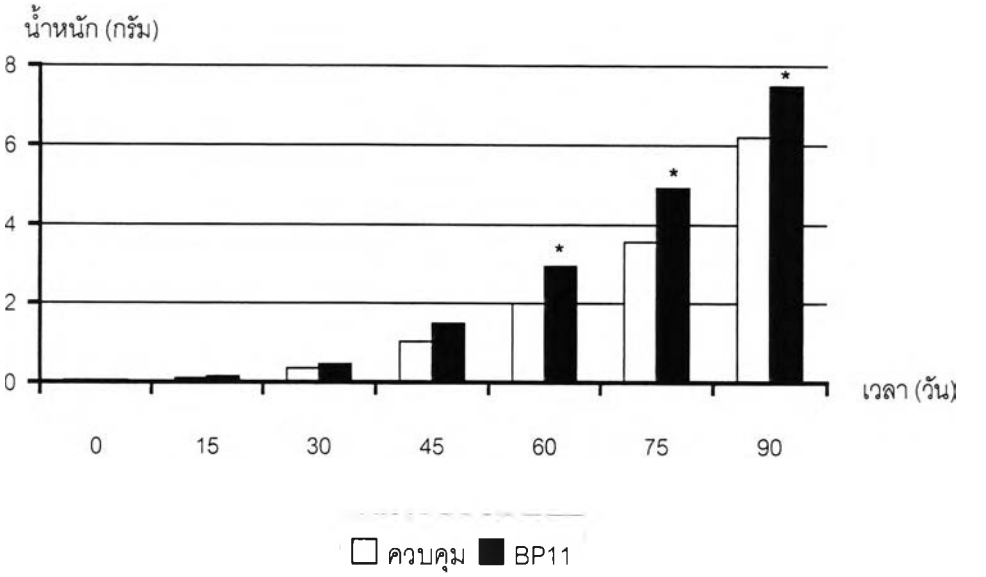
หลังจากเลี้ยงกุ้งกุลาดำด้วยอาหารผสมแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆที่แยกได้จากทางเดินอาหารของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ พบว่ามีเพียงกุ้งในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* P11 เท่านั้นที่ให้อัตราการเจริญดีกว่ากุ้งในกลุ่มควบคุม จึงนำกุ้งในกลุ่มดังกล่าวมาทดลองชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 1526 โดยเปรียบเทียบกับกุ้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* S11 (วรรนิภา เพี้ยนภักตร์, 1997) พบว่า กุ้งในกลุ่มควบคุมมีการตายสะสมประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์หลังการชักนำให้เกิดโรค แต่กุ้งในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* P11 และ *Bacillus* S11 มีการตายสะสมเพียง 30 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 14



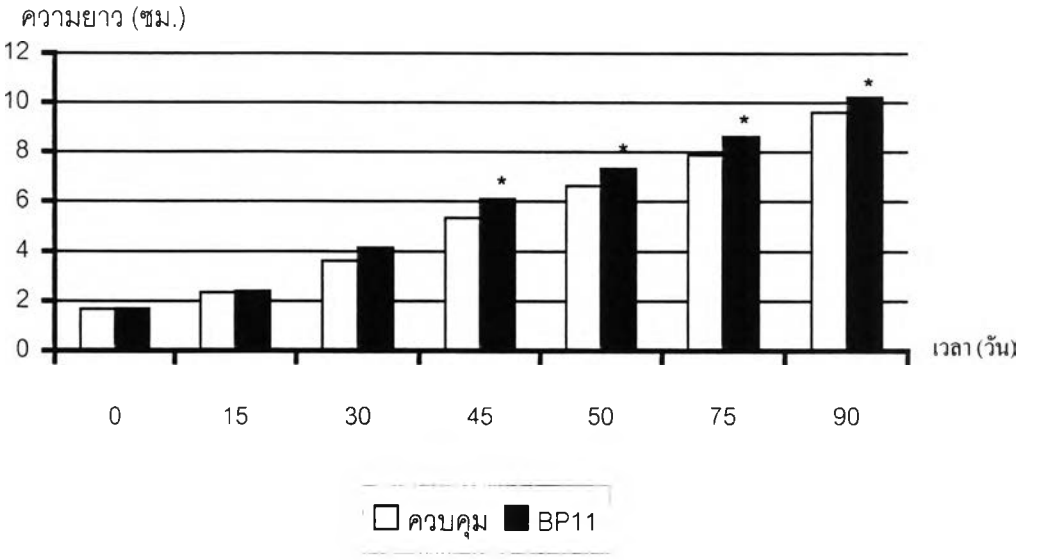
รูปที่ 14 แสดงการตายสะสมของกุ้งกุลาดำที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 1526

ผลการทดลองการเลี้ยงกุ้งกุลาดำในบ่อปูนขนาด 400 ลิตร ครั้งที่ 1

จากผลการทดลองเลี้ยงกุ้งกุลาดำในระดับตู้กระจกขนาด 20 ลิตร พบว่ากุ้งกุลาดำในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* P11 มีน้ำหนักและความยาวมากกว่ากุ้งในกลุ่มอื่นๆ จึงทำการทดลองเลี้ยงกุ้งกุลาดำด้วยอาหารผสม *Bacillus* P11 ในระดับบ่อปูนซีเมนต์ขนาด 400 ลิตร เป็นเวลา 100 วัน โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่ากุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* P11 มีน้ำหนัก, ความยาวและอัตราการรอดชีวิตมากกว่ากุ้งในกลุ่มควบคุมดังแสดงในรูปที่ 15 และ 16 ตามลำดับ



รูปที่ 15 แสดงผลน้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยแบคทีเรีย BP11 ที่แยกจากทางเดินอาหารแม่พันธุ์ กุ้งกุลาดำ โดยเลี้ยงเป็นระยะเวลา 100 วัน (* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p<0.05$)



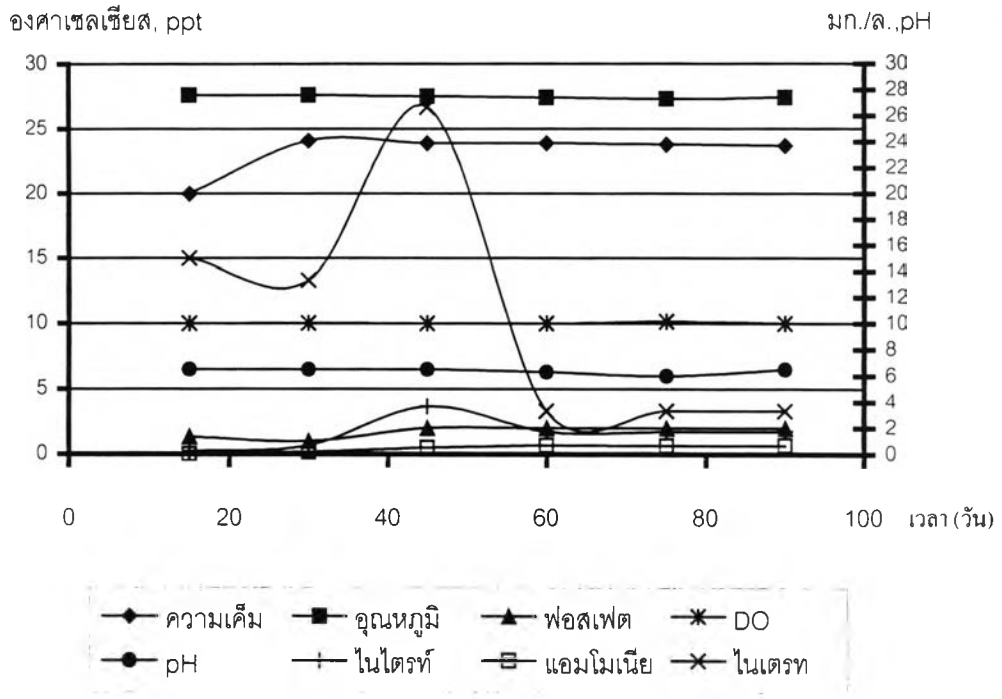
รูปที่ 16 แสดงผลของความยาวกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยแบคทีเรีย BP11 ที่แยกจากทางเดินอาหารแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ โดยเลี้ยงเป็นระยะเวลา 100 วัน (* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p<0.05$)

ตารางที่ 4.3 แสดงอัตราการรอดชีวิตและน้ำหนักรวมของกุ้งกุลาดำในแต่ละกลุ่มการทดลอง

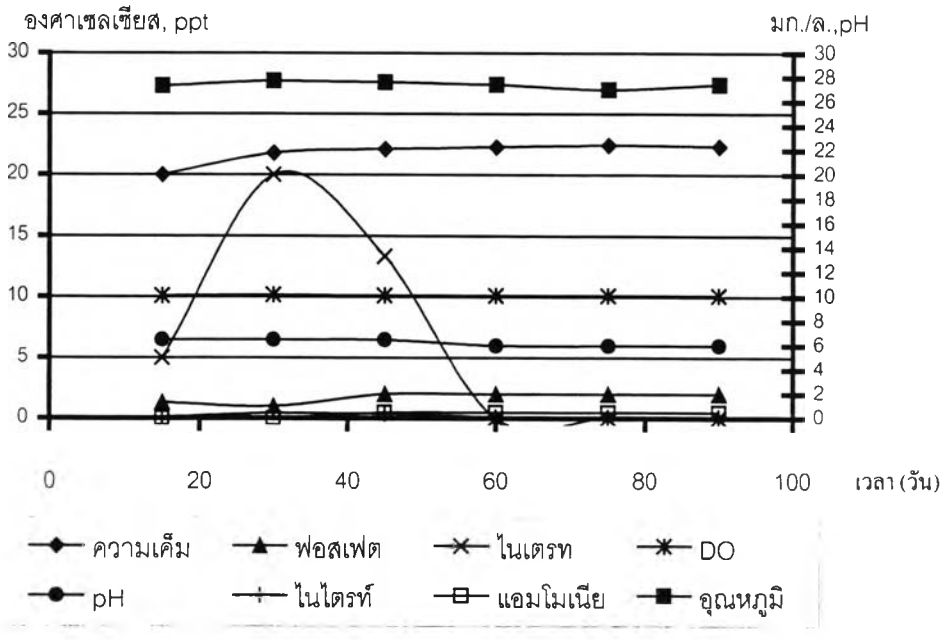
กลุ่มควบคุม		กลุ่ม BP11	
อัตราการรอดชีวิต (%)	น้ำหนักรวม (กรัม)	อัตราการรอดชีวิต (%)	น้ำหนักรวม (กรัม)
67.14	869.97± 56.21	84.29	1,323.96 ± 71.22

ผลคุณภาพน้ำระหว่างการเลี้ยงกุ้งกุลาดำเป็นระยะเวลา 100 วันในบ่อปูนขนาด 400 ลิตร ครั้งที่ 1

คุณภาพน้ำระหว่างการเลี้ยงกุ้งในระดับบ่อปูนซีเมนต์ขนาด 400 ลิตร ในแต่ละกลุ่มการทดลองพบว่า ค่าของปัจจัยต่างๆมีค่าค่อนข้างคงที่ตลอดเวลาการทดลอง ได้แก่ ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำประมาณ 10 มก./ล. ความเค็ม 20 - 23 ppt ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) อยู่ในช่วง 6.5-7.0 ปริมาณฟอสเฟตอยู่ในช่วง 0.1-2.0 มก./ล. อุณหภูมิประมาณ 26 - 27 องศาเซลเซียส ปริมาณไนไตรท์ประมาณ 0 – 0.5 มก./ล. ปริมาณแอมโมเนียรวม 0 – 0.5 มก./ล. ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ปลอดภัยต่อสัตว์น้ำ สำหรับปริมาณไนเตรทพบว่าในแต่ละกลุ่มทดลองมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเป็นบางช่วงเวลาของการเลี้ยงกุ้ง เนื่องจากเกิดการสะสมของอาหารที่เหลือค้างรวมทั้งของเสียที่กุ้งขับถ่ายออกมา แต่ทั้งนี้ปริมาณที่เพิ่มขึ้นยังคงอยู่ในช่วงที่ปลอดภัยต่อกุ้งคือ น้อยกว่า 200 มก./ล. ดังแสดงในรูปที่ 17 และ 18 ตามลำดับ



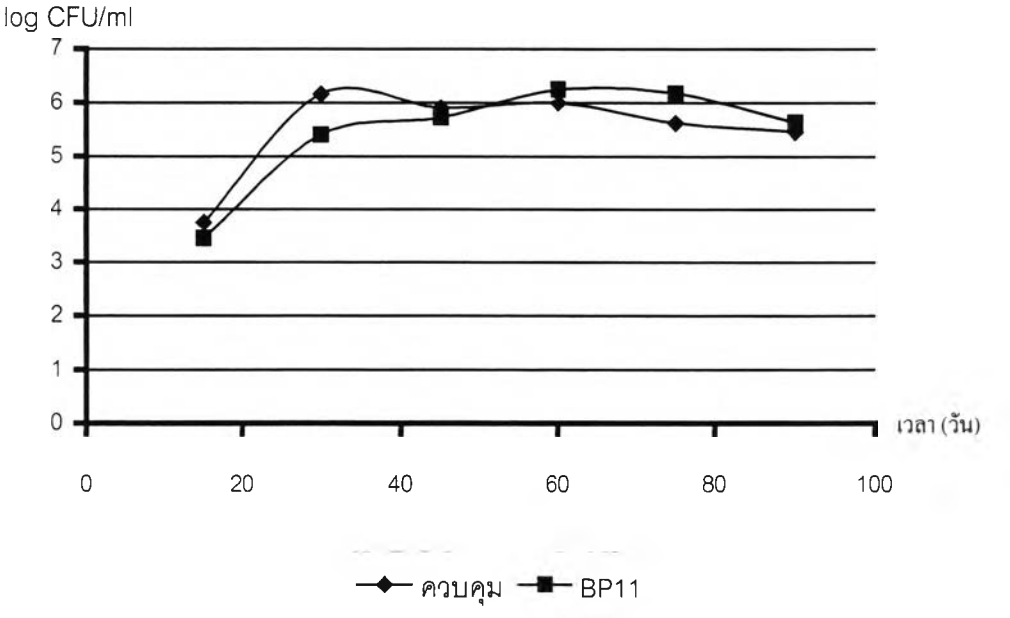
รูปที่ 17 แสดงการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ, ความเค็ม, ปริมาณไนเตรท, ปริมาณไนไตรท์, ปริมาณแอมโมเนีย, ปริมาณฟอสเฟต, ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (DO)และค่าความเป็นกรด - ด่างในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำในกลุ่มควบคุม เป็นระยะเวลา 100 วัน



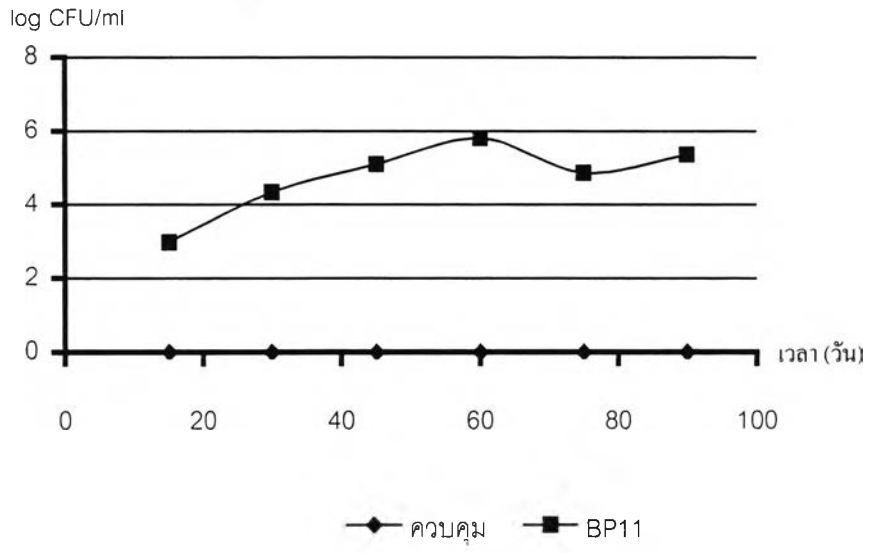
รูปที่ 18 แสดงการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ, ความเค็ม, ปริมาณไนเตรท, ปริมาณไนไตรท์, ปริมาณแอมโมเนีย, ปริมาณฟอสเฟต, ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (DO) และค่าความเป็นกรด – ด่างในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำในกลุ่ม BP11 เป็นระยะเวลา 100 วัน

ผลปริมาณแบคทีเรียรวม, *Bacillus* sp. **และ** *Vibrio* sp. **ในน้ำเลี้ยงกุ้งในบ่อขนาด** 400 **ลิตร ครั้งที่** 1

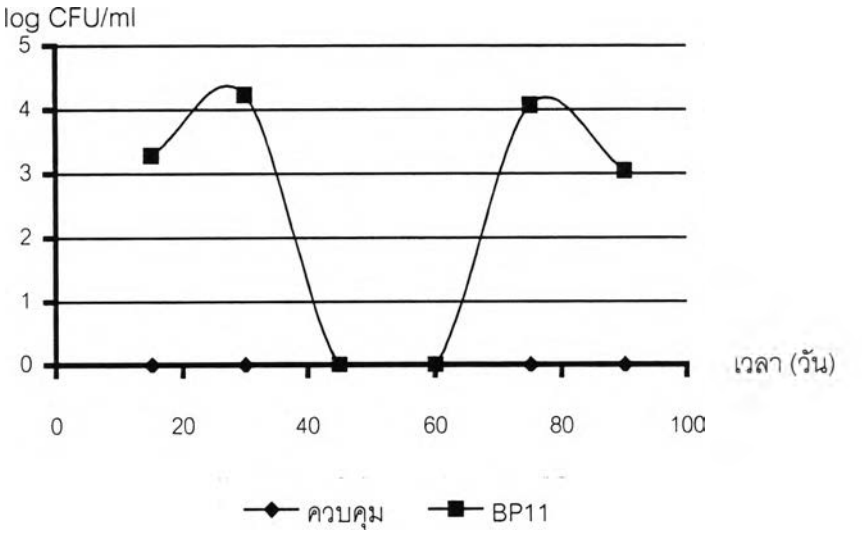
การทดลองหาปริมาณแบคทีเรียรวมในน้ำระหว่างการเลี้ยงกุ้งพบว่าปริมาณแบคทีเรียรวมในน้ำกลุ่มควบคุมอยู่ในช่วง 10^4 – 10^6 CFU/ml สำหรับในน้ำของกลุ่มการเลี้ยงที่มีการผสมอาหารด้วย *Bacillus* P11 มีปริมาณแบคทีเรียรวมอยู่ในช่วง 10^4 – 10^6 CFU/ml ดังแสดงในรูปที่ 19 ไม่พบ *Bacillus* P11 ในน้ำจากบ่อควบคุม แต่พบ *Bacillus* P11 และสปอร์ในน้ำจากบ่อที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* P11ประมาณ 10^3 – 10^6 CFU/ml และ 10^1 – 10^4 CFU/ml ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 20 และ 21 สำหรับการตรวจหาปริมาณ *Vibrio* sp.พบว่าในน้ำจากบ่อกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* P11 มีปริมาณ *Vibrio* sp. ใกล้เคียงกันคือประมาณ 10^3 – 10^4 CFU/ml ดังแสดงในรูปที่ 22



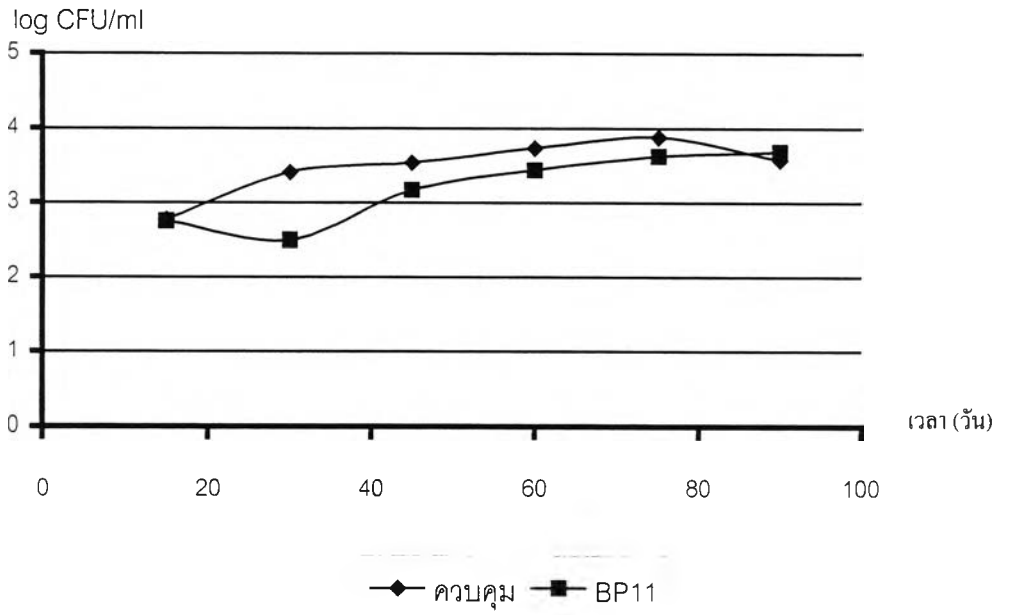
รูปที่ 19 แสดงปริมาณแบคทีเรียรวมในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำในบ่อปูนขนาด 400 ลิตร เป็นระยะเวลา 100 วัน



รูปที่ 20 แสดงปริมาณ *Bacillus* P11ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำในบ่อปูนขนาด 400 ลิตร เป็นระยะเวลา 100 วัน



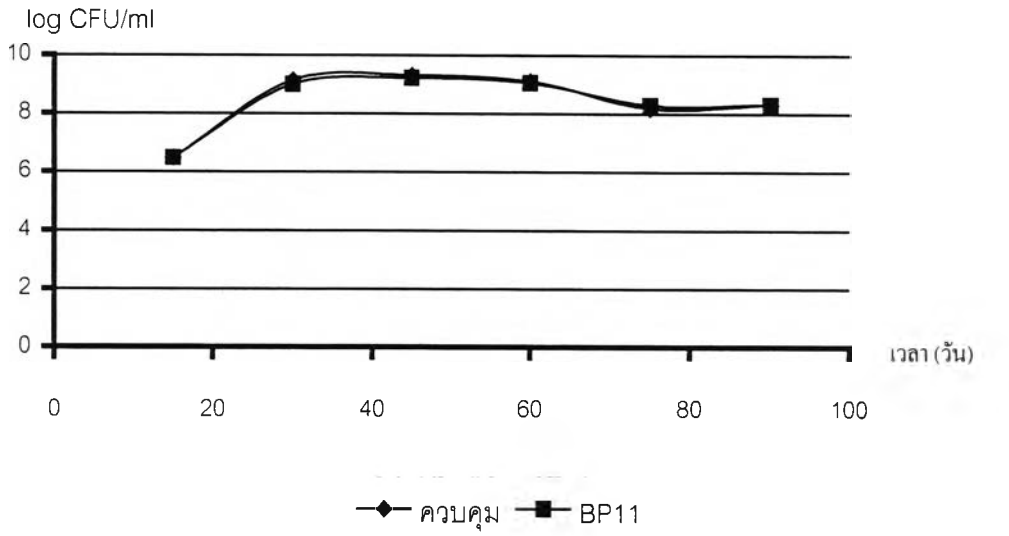
รูปที่ 21 แสดงปริมาณสปอร์ของ *Bacillus* P11ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำในบ่อปูนขนาด 400 ลิตร เป็นระยะเวลา 100 วัน



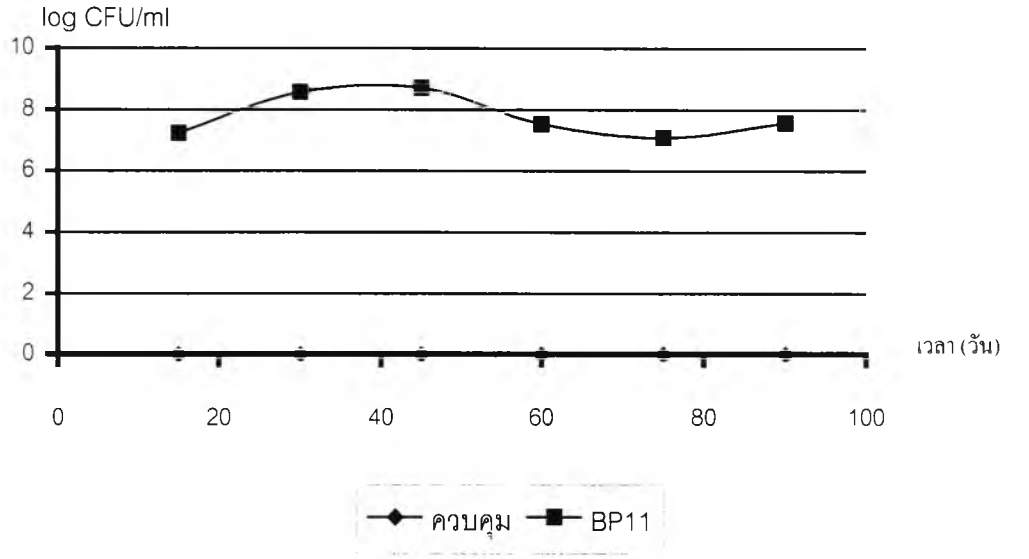
รูปที่ 22 แสดงปริมาณ *Vibrio* sp.ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำในบ่อปูนขนาด 400 ลิตร เป็นระยะเวลา 100 วัน

ผลปริมาณแบคทีเรียรวม, *Bacillus* sp. และ *Vibrio* sp. ในตะกอนและอุจจาระจากบ่อเลี้ยงกุ้งขนาด 400 ลิตร ครั้งที่ 1

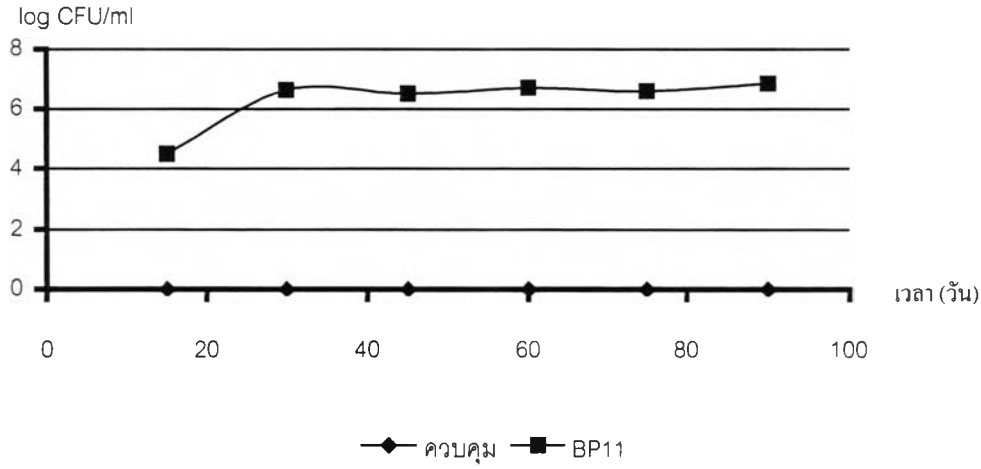
การทดลองหาปริมาณแบคทีเรียรวมในตะกอนและอุจจาระในบ่อระหว่างการเลี้ยงกุ้งพบว่าปริมาณแบคทีเรียรวมในตะกอนและอุจจาระในบ่อกลุ่มควบคุมและกลุ่มการเลี้ยงที่มีการผสมอาหารด้วย *Bacillus* P11 อยู่ในช่วง 10^6 – 10^9 CFU/กรัม ดังแสดงในรูปที่ 23 ไม่พบ*Bacillus* P11 ในตะกอนและอุจจาระจากบ่อควบคุม แต่พบ *Bacillus* P11 และสปอร์ประมาณ 10^7 – 10^9 CFU/กรัม และ10^5 – 10^7 CFU/กรัม จากบ่อที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* P11 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 24 และ 25 สำหรับการตรวจหาปริมาณ *Vibrio* sp. พบว่าในตะกอนและอุจจาระจากบ่อกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* P11 มีปริมาณ *Vibrio* sp. ใกล้เคียงกันคือประมาณ 10^4 – 10^6 CFU/กรัมดังแสดงในรูปที่ 26



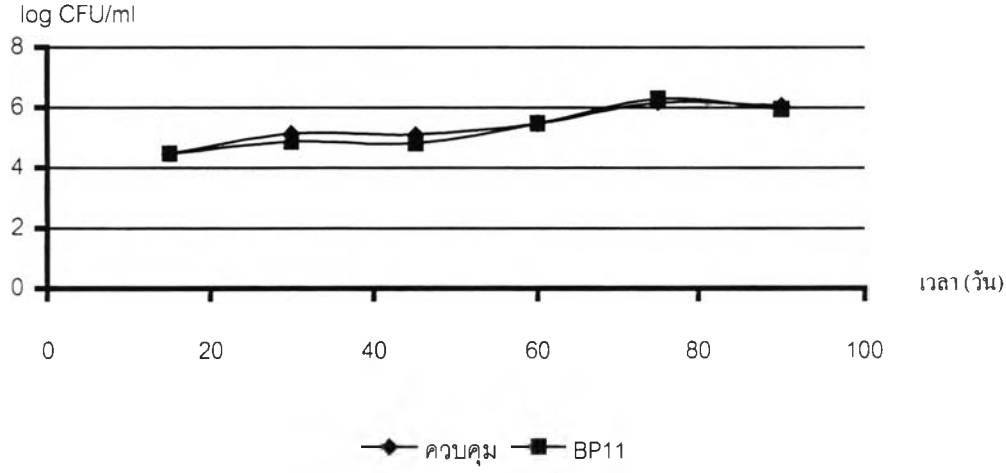
รูปที่ 23 แสดงปริมาณแบคทีเรียรวมในอุจจาระและตะกอนในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำขนาด 400 ลิตร เป็นระยะเวลา 100 วัน



รูปที่ 24 แสดงปริมาณ *Bacillus* P11ในอุจจาระและตะกอนในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำขนาด 400 ลิตร เป็นระยะเวลา 100 วัน



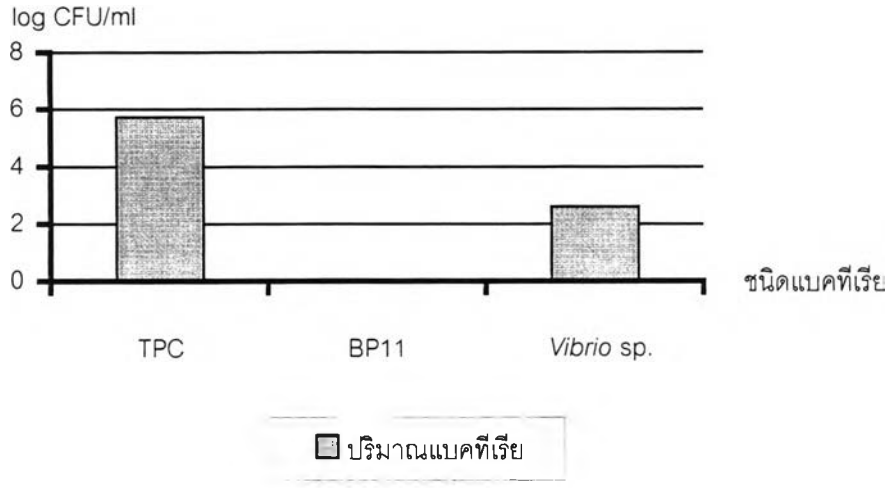
รูปที่ 25 แสดงปริมาณสปอร์ของ *Bacillus* P11ในอุจจาระและตะกอนในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำขนาด 400 ลิตร เป็นระยะเวลา 100 วัน



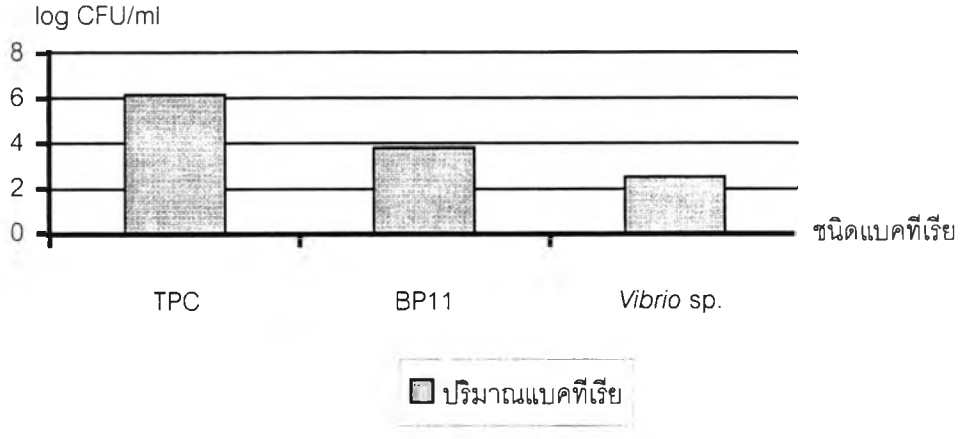
รูปที่ 26 แสดงปริมาณ *Vibrio* sp.ในอุจจาระและตะกอนในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำขนาด 400 ลิตร เป็นระยะเวลา 100 วัน

ผลการตรวจหาปริมาณและชนิดของแบคทีเรียในลำไส้กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงครบ 100 วัน

หลังเลี้ยงกุ้งกุลาดำครบ 100 วัน นำกุ้งแต่ละกลุ่มทดลองมาตรวจหาปริมาณและชนิดของแบคทีเรียในลำไส้พบว่า แบคทีเรียรวมในกุ้งกลุ่มควบคุมและกลุ่ม *Bacillus* P11 มีประมาณ 10^6 CFU/กรัม ปริมาณ *Vibrio* sp.ประมาณ 10^3 CFU/กรัม และปริมาณ *Bacillus* P11 ประมาณ 10^4 CFU/กรัม แต่ไม่พบ *Bacillus* P11 ในทางเดินอาหารของกุ้งกลุ่มควบคุม ดังแสดงในรูปที่ 27 และ 28



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

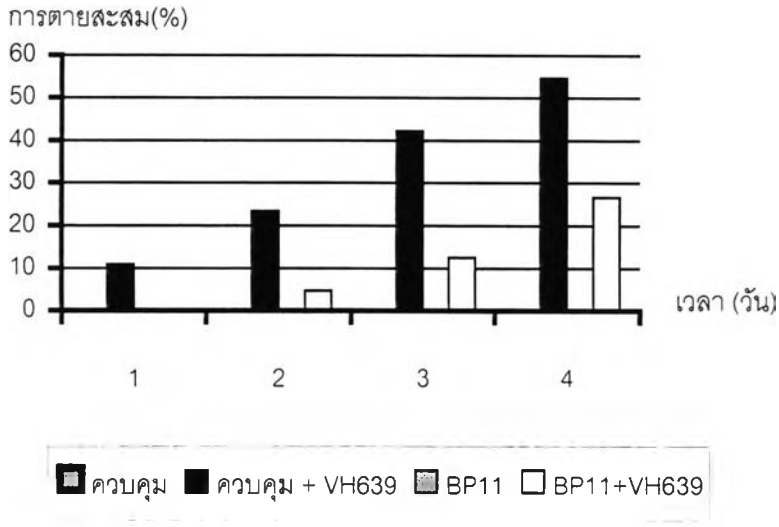


รูปที่ 28 แสดงปริมาณแบคทีเรียรวม, ปริมาณ *Bacillus* P11 (BP11) และปริมาณ *Vibrio* sp. ในลำไส้กุ้งกุลาดำในกลุ่มที่เลี้ยงด้วย *Bacillus* P11 (BP11) หลังการเลี้ยงเป็นเวลานาน 100 วัน

ผลการทดลองการชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 639 ในกุ้งกุลาดำ ครั้งที่ 1

หลังจากเลี้ยงกุ้งกุลาดำเป็นเวลา 100 วัน นำกุ้งที่เหลือจากแต่ละการทดลองมาชักนำให้เกิดโรคเรืองแสงด้วย *V. harveyi* 639 โดยการทดลองแบ่งเป็น 4 กลุ่มได้แก่ กลุ่มควบคุม, กลุ่ม *Bacillus* P11 , กลุ่มควบคุมที่ชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 639 และกลุ่ม *Bacillus* P11ที่ชักนำให้เกิดโรค

ด้วย *V. harveyi* 639 พบว่า ไม่พบการตายของกุ้งในกลุ่มกลุ่มควบคุมและกลุ่ม *Bacillus* P11 กุ้งกลุ่มควบคุมที่ชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 639 มีเปอร์เซ็นต์การตายสะสมมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์หลังจากชักนำให้โรคเป็นเวลานาน 4 วัน แต่พบเปอร์เซ็นต์การตายสะสมเพียง 28 เปอร์เซ็นต์ในกุ้งกลุ่มกลุ่ม *Bacillus* P11ที่ชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 639 ดังแสดงในรูปที่ 29



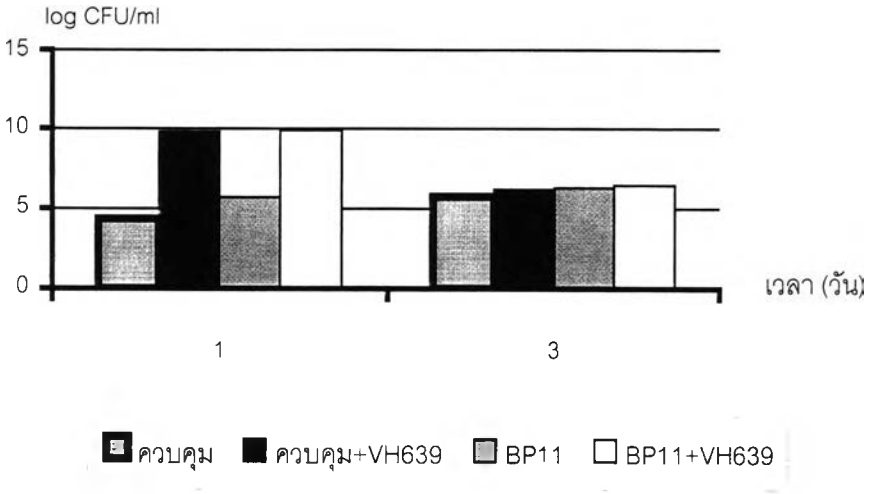
รูปที่ 29 แสดงเปอร์เซ็นต์การตายสะสมของกุ้งกุลาดำระหว่างการชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 639

ผลการหาปริมาณแบคทีเรียรวม, *Bacillus* P11 และ *Vibrio* sp. ระหว่างชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 639 ครั้งที่ 1

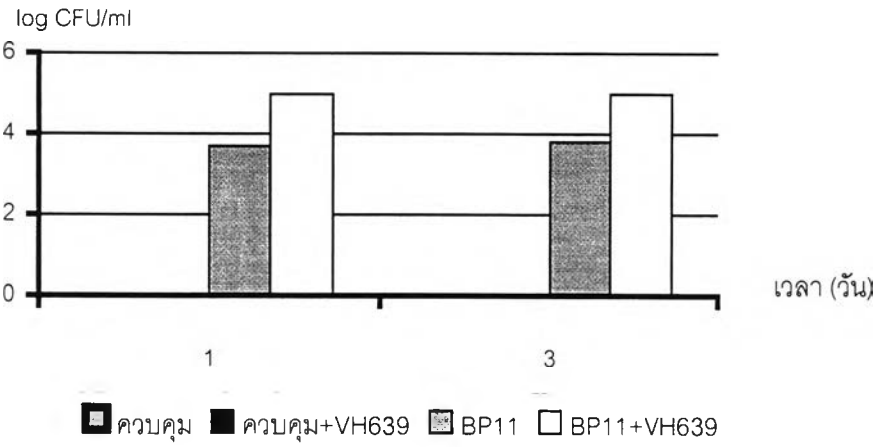
ปริมาณแบคทีเรียรวมที่ตรวจพบในน้ำระหว่างการชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 639 จากแต่ละกลุ่มทดลองพบว่า ปริมาณแบคทีเรียรวมในน้ำของกลุ่มควบคุมและกลุ่ม *Bacillus* P11 มีประมาณ 10^5 CFU/ml ในวันที่ 1 และ 3 ของการชักนำให้เกิดโรค สำหรับในกลุ่มควบคุมและกลุ่ม *Bacillus* P11ที่ชักนำให้เกิดโรคมีปริมาณแบคทีเรียรวมประมาณ 10^{10} CFU/ml ในวันที่ 1 และลดลงเป็นประมาณ 10^5 CFU/ml ในวันที่ 3 หลังการชักนำให้เกิดโรค ดังแสดงในรูปที่ 30

ตรวจพบ *Bacillus* P11 ในปริมาณ 10^4 CFU/ml ในกลุ่ม *Bacillus* P11 และประมาณ 10^5 CFU/ml ในกลุ่ม *Bacillus* P11ที่ชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 639 ดังแสดงในรูปที่ 31

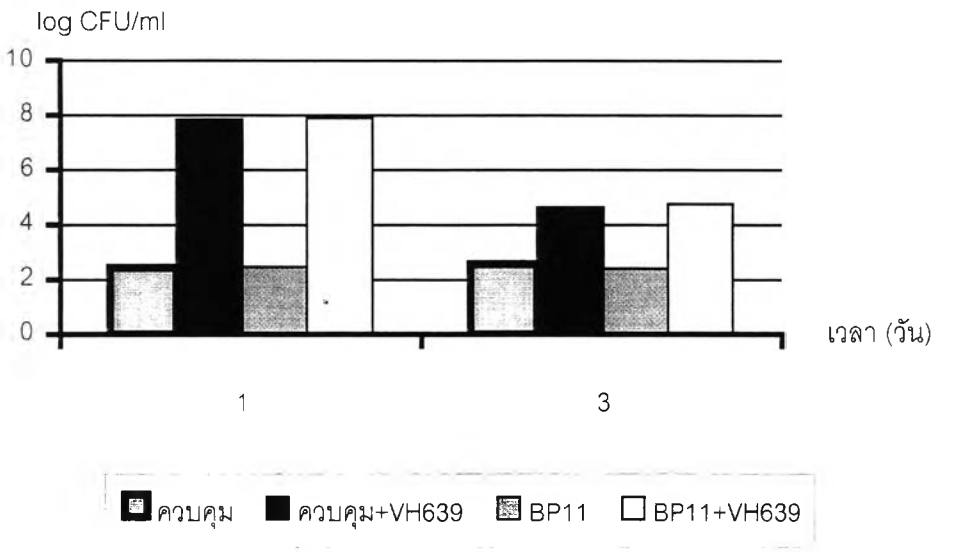
ตรวจพบ *Vibrio* sp. ในปริมาณ 10^2 CFU/ml ในกลุ่ม *Bacillus* P11 และกลุ่มควบคุมและพบ *Vibrio* sp. ประมาณ 10^8 CFU/ml ในกลุ่ม *Bacillus* P11และกลุ่มควบคุมที่ชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 639 ดังแสดงในรูปที่ 32



รูปที่ 30 แสดงปริมาณแบคทีเรียรวมในน้ำเลี้ยงกุ้งระหว่างการชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 639



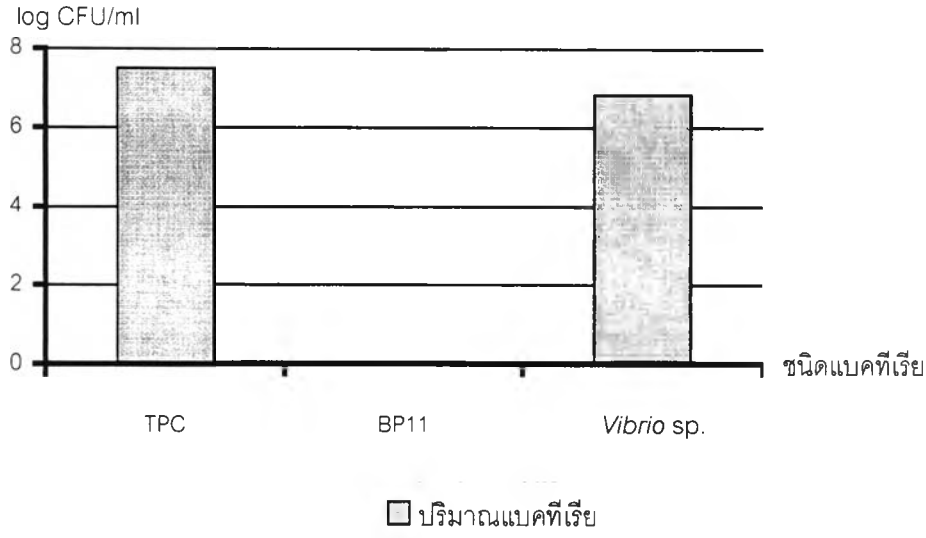
รูปที่ 31 แสดงปริมาณ *Bacillus* P11 ในน้ำเลี้ยงกุ้งระหว่างการชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 639



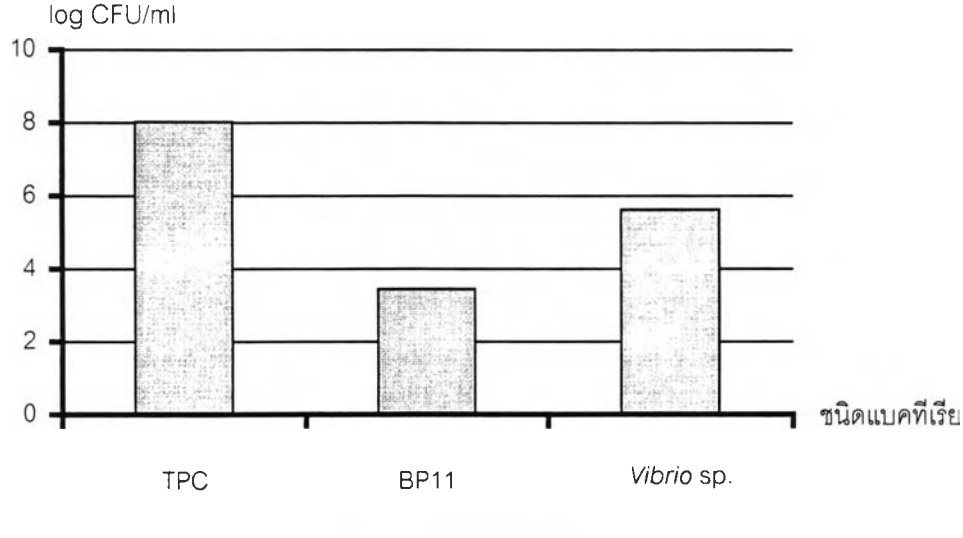
รูปที่ 32 แสดงปริมาณ *Vibrio* sp. ในน้ำเลี้ยงกุ้งระหว่างการชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 639

ผลการตรวจหาปริมาณและชนิดของแบคทีเรียในลำไส้กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงครบ 100 วันและชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 639

หลังจากชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 639 นำกุ้งกุลาดำที่ตายมาตรวจหาปริมาณและชนิดของแบคทีเรียในลำไส้พบว่า ลำไส้กุ้งในกลุ่มควบคุมที่ชักนำให้เกิดโรคมีปริมาณแบคทีเรียรวมประมาณ 10^7 CFU/กรัมและปริมาณ *Vibrio* sp.ประมาณ 10^7 CFU/กรัม แต่ไม่พบ *Bacillus* P11 สำหรับลำไส้กุ้งในกลุ่ม *Bacillus* P11 ที่ชักนำให้เกิดโรคมีปริมาณแบคทีเรียรวมประมาณ 10^8 CFU/กรัมและปริมาณ *Vibrio* sp.ประมาณ 10^6 CFU/กรัม และพบ *Bacillus* P11ประมาณ 10^3CFU/กรัม ดังแสดงในรูปที่ 33 และ 34

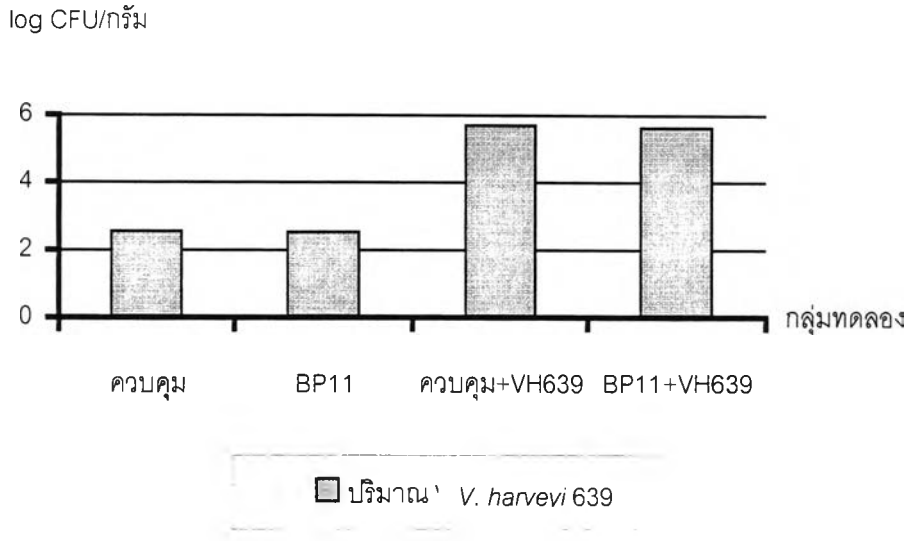


รูปที่ 33 แสดงปริมาณแบคทีเรียรวม, ปริมาณ *Bacillus* P11 (BP11) และปริมาณ *Vibrio* sp. ในลำไส้กุ้งกุลาดำในกลุ่มควบคุมหลังการเลี้ยงเป็นเวลานาน 100 วันและชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 639



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

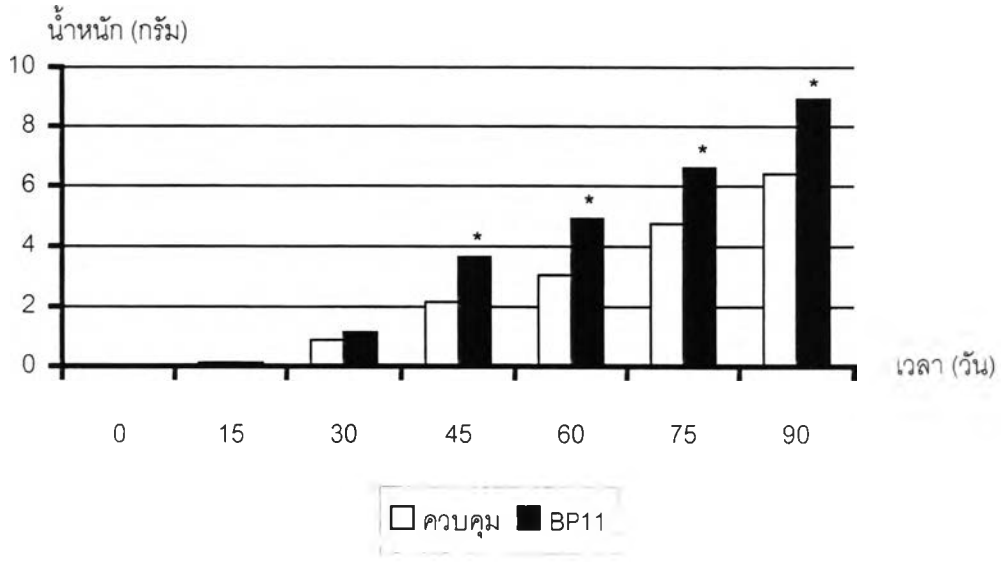
ผลการตรวจหาปริมาณ *V. harveyi* 639 **ในตับกุ้งที่ตายเนื่องจากชักนำให้เกิดโรคด้วย** *V. harveyi* 639



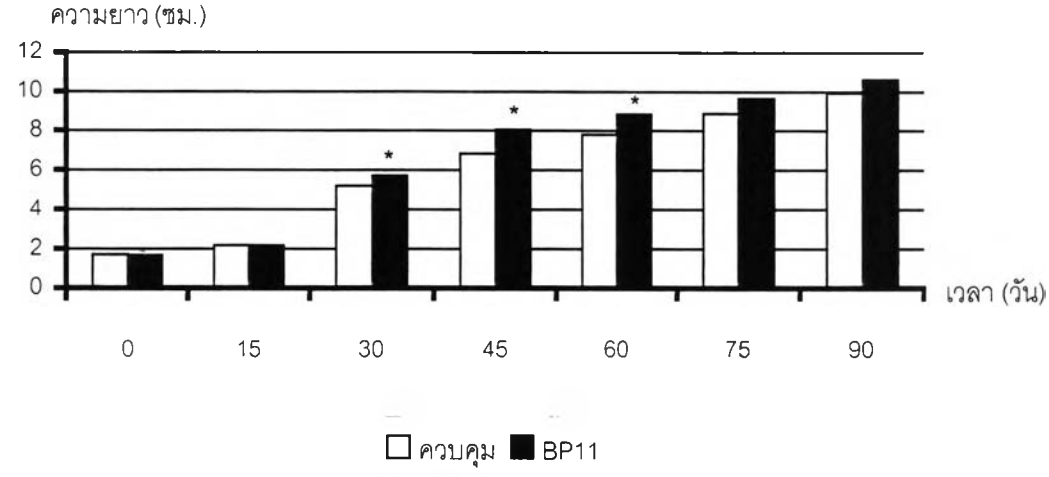
รูปที่ 35 แสดงปริมาณ *V. harveyi* 639 ตับกุ้งที่ตายเนื่องจากชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 639

ผลการทดลองการเลี้ยงกุ้งกุลาดำในบ่อปูนขนาด 400 ลิตร ครั้งที่ 2

การทดลองเลี้ยงกุ้งกุลาดำด้วยอาหารผสม *Bacillus* P11 ในระดับบ่อปูนซีเมนต์ขนาด 400 ลิตร เป็นเวลา 100 วัน (ครั้งที่ 2) โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่ากุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* P11 มีน้ำหนัก,ความยาวและอัตราการรอดชีวิตมากกว่ากุ้งในกลุ่มควบคุมดังแสดงในรูปที่ 36 และ 37 ตามลำดับ



รูปที่ 36 แสดงผลน้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยแบคทีเรีย BP11 ที่แยกจากทางเดินอาหารแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ โดยเลี้ยงเป็นระยะเวลา 100 วัน (* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p<0.05$)



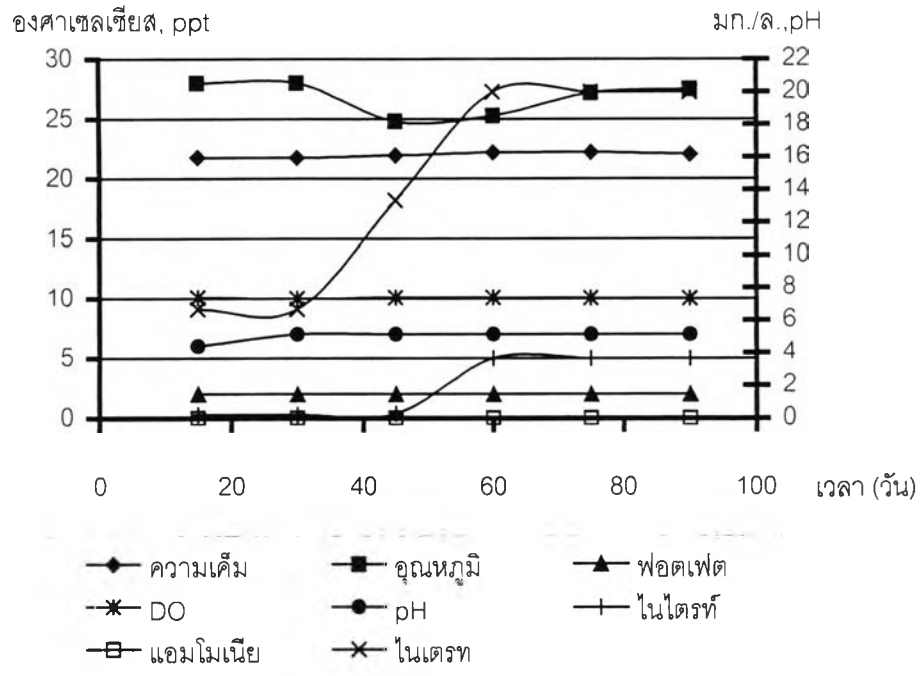
รูปที่ 37 แสดงผลของความยาวกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยแบคทีเรีย BP11 ที่แยกจากทางเดินอาหารแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำโดยเลี้ยงเป็นระยะเวลา 100 วัน (* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p<0.05$)

ตารางที่ 4.4 แสดงอัตราการรอดชีวิตและน้ำหนักรวมของกุ้งกุลาดำในแต่ละกลุ่มการทดลอง

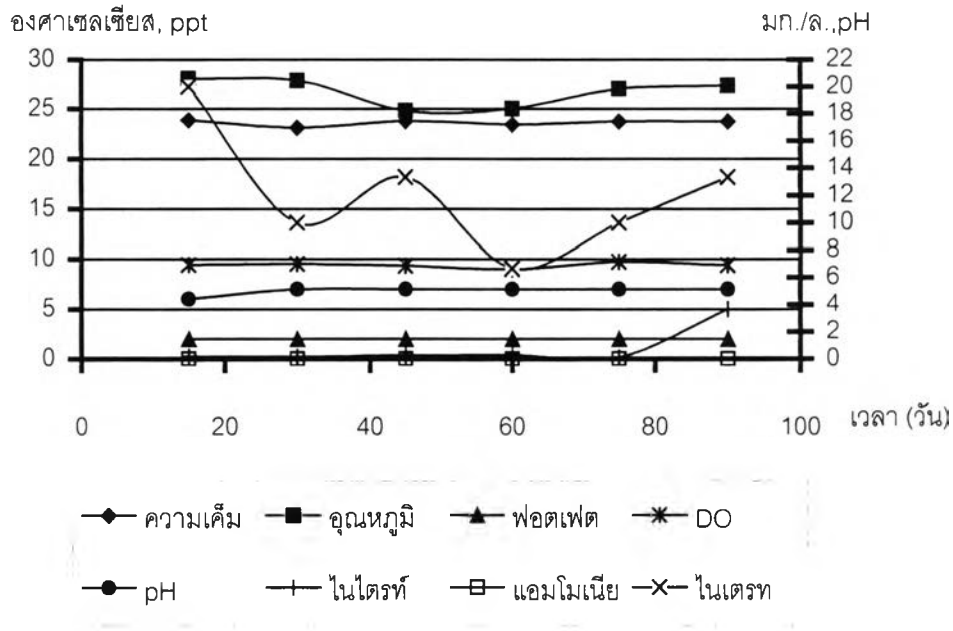
กลุ่มควบคุม		กลุ่ม BP11	
อัตราการรอดชีวิต (%)	น้ำหนักรวม (กรัม)	อัตราการรอดชีวิต (%)	น้ำหนักรวม (กรัม)
61.17	706.2 $\pm$ 19.52	63.88	1028.1 $\pm$ 49.42

ผลคุณภาพน้ำระหว่างการเลี้ยงกุ้งกุลาดำเป็นระยะเวลา 100 วันในบ่อปูนขนาด 400 ลิตร ครั้งที่ 2

คุณภาพน้ำระหว่างการเลี้ยงกุ้งในระดับบ่อปูนซีเมนต์ขนาด 400 ลิตร ในแต่ละกลุ่มการทดลองพบว่า ค่าของปัจจัยต่างๆมีค่าค่อนข้างคงที่ตลอดเวลาการทดลอง ได้แก่ ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำประมาณ 10 มก./ล. ความเค็ม 20 - 23 ppt ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) อยู่ในช่วง 6.5-7.0 ปริมาณฟอตเฟตอยู่ในช่วง 0.1-2.0 มก./ล. อุณหภูมิประมาณ 24 - 26 องศาเซลเซียส ปริมาณไนไตรท์ประมาณ 0 – 0.5 มก./ล. ปริมาณแอมโมเนียรวม 0 – 0.5 มก./ล. ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ปลอดภัยต่อสัตว์น้ำ สำหรับปริมาณไนเตรทพบว่าในแต่ละกลุ่มทดลองมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเป็นบางช่วงเวลาของการเลี้ยงกุ้ง เนื่องจากเกิดการสะสมของอาหารที่เหลือค้างรวมทั้งของเสียที่กุ้งขับถ่ายออกมา แต่ทั้งนี้ปริมาณที่เพิ่มขึ้นยังคงอยู่ในช่วงที่ปลอดภัยต่อกุ้งคือ น้อยกว่า 200 มก./ล. ดังแสดงในรูปที่ 38 และ 39 ตามลำดับ



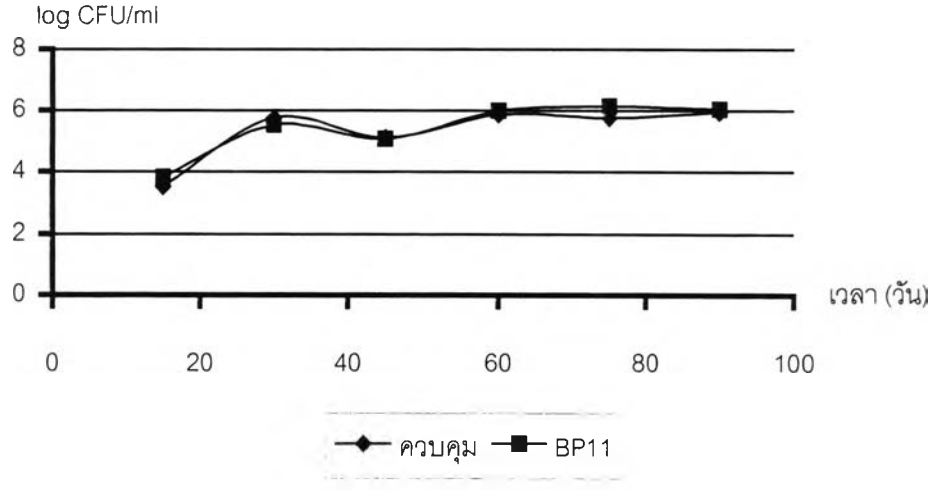
รูปที่ 38 แสดงการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ, ความเค็ม, ปริมาณไนเตรท, ปริมาณไนไตรท์, ปริมาณแอมโมเนีย, ปริมาณฟอตเฟต, ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (DO)และค่าความเป็นกรด - ด่างในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำในกลุ่มควบคุม เป็นระยะเวลา 100 วัน



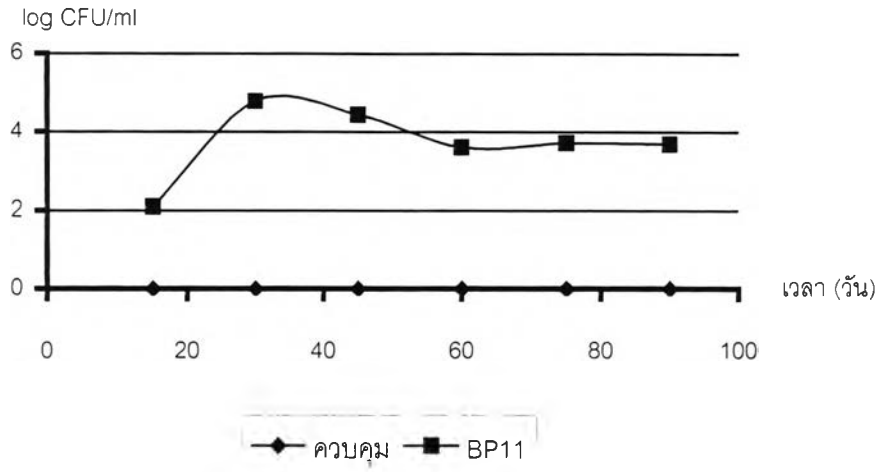
รูปที่ 39 แสดงการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ, ความเค็ม, ปริมาณไนเตรท, ปริมาณไนไตรท์, ปริมาณแอมโมเนีย, ปริมาณฟอตเฟต, ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (DO) และค่าความเป็นกรด – ด่างในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำในกลุ่ม BP11 เป็นระยะเวลา 100 วัน

ผลปริมาณแบคทีเรียรวม, *Bacillus* sp. **และ** *Vibrio* sp. **ในน้ำเลี้ยงกุ้งในบ่อขนาด** 400 **ลิตร ครั้งที่** 2

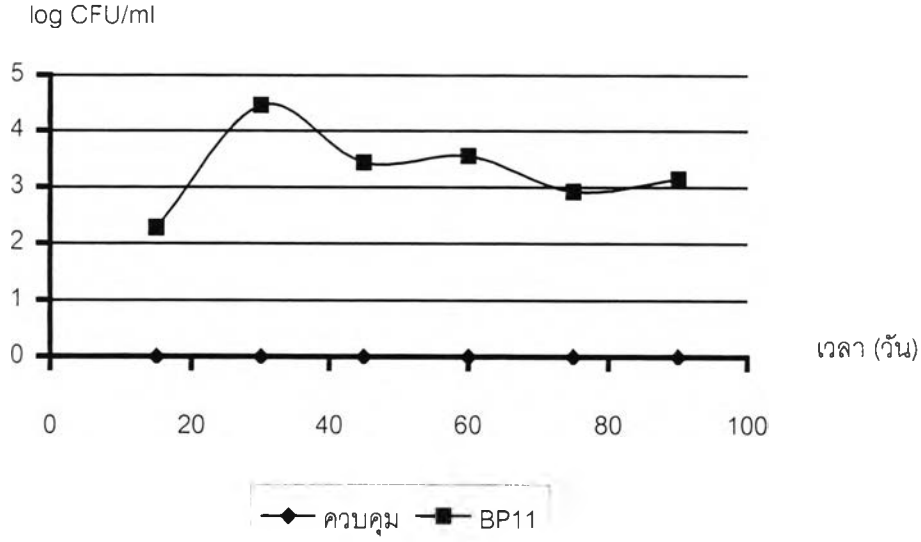
การทดลองหาปริมาณแบคทีเรียรวมในน้ำระหว่างการเลี้ยงกุ้งพบว่าปริมาณแบคทีเรียรวมในน้ำกลุ่มควบคุมอยู่ในช่วง 10^4 – 10^6 CFU/ml สำหรับในน้ำของกลุ่มการเลี้ยงที่มีการผสมอาหารด้วย *Bacillus* P11 มีปริมาณแบคทีเรียรวมอยู่ในช่วง 10^4 – 10^6 CFU/ml ดังแสดงในรูปที่ 40 ไม่พบ *Bacillus* P11 ในน้ำจากบ่อควบคุม แต่พบ *Bacillus* P11 และสปอร์ในน้ำจากบ่อที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* P11ประมาณ 10^2 – 10^5 CFU/ml และ 10^2 – 10^5 CFU/ml ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 41 และ 42 สำหรับการตรวจหาปริมาณ *Vibrio* sp.พบว่าในน้ำจากบ่อกลุ่มควบคุมมีปริมาณ *Vibrio* sp. ประมาณ 10^1 – 10^4 CFU/ml กลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* P11 มีปริมาณ *Vibrio* sp. ประมาณ 10^3 – 10^4 CFU/ml ดังแสดงในรูปที่ 43



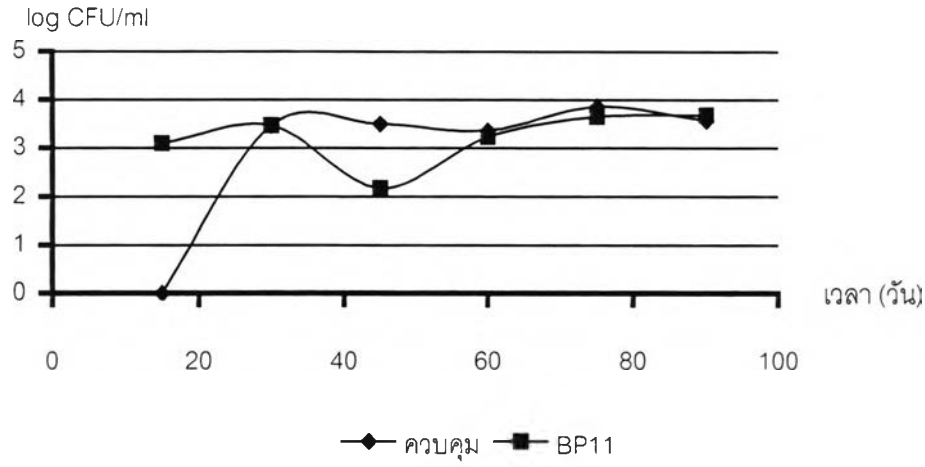
รูปที่ 40 แสดงปริมาณแบคทีเรียรวมในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำในบ่อปูนขนาด 400 ลิตร เป็นระยะเวลา 100 วัน



รูปที่ 41 แสดงปริมาณ *Bacillus* P11ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำในบ่อปูนขนาด 400 ลิตร เป็นระยะเวลา 100 วัน



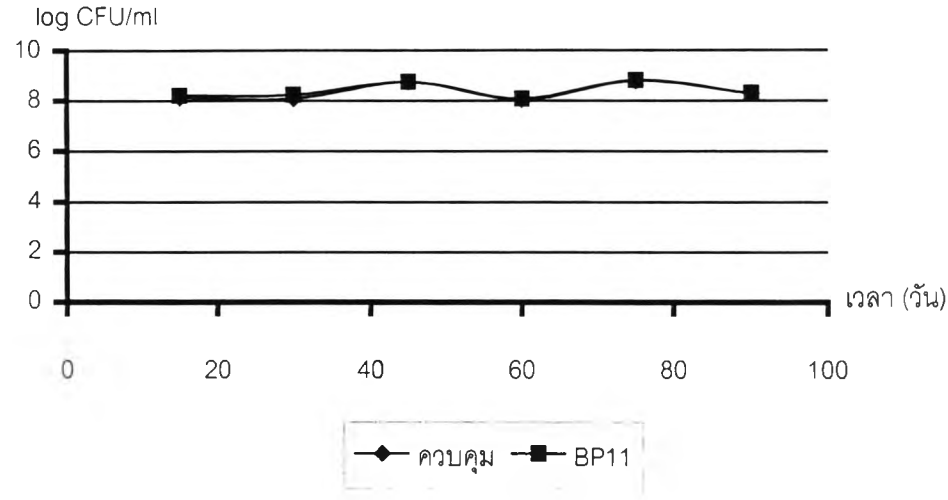
รูปที่ 42 แสดงปริมาณสปอร์ของ *Bacillus* P11ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำในบ่อปูนขนาด 400 ลิตร เป็นระยะเวลา 100 วัน



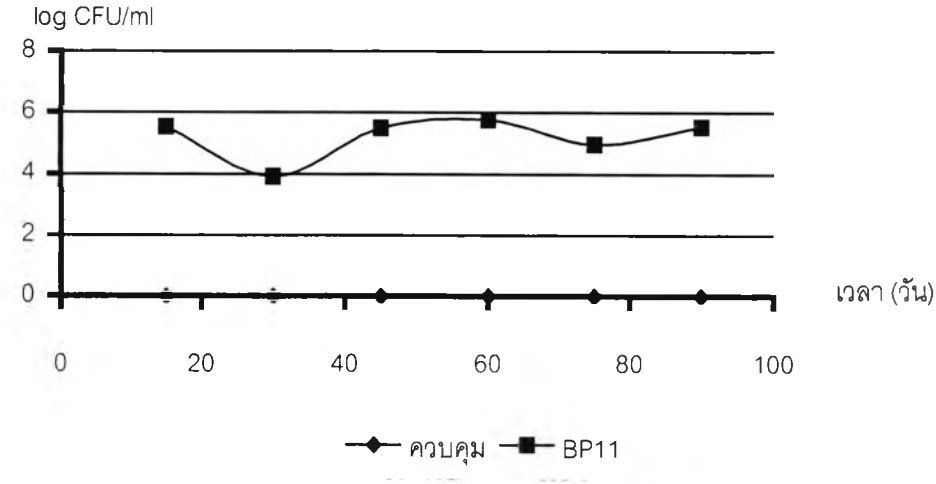
รูปที่ 43 แสดงปริมาณ *Vibrio* sp. ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำในบ่อปูนขนาด 400 ลิตร เป็นระยะเวลา 100 วัน

ผลปริมาณแบคทีเรียรวม, *Bacillus* sp. และ *Vibrio* sp. ในตะกอนและอุจจาระจากบ่อเลี้ยงกุ้งขนาด 400 ลิตร ครั้งที่ 2

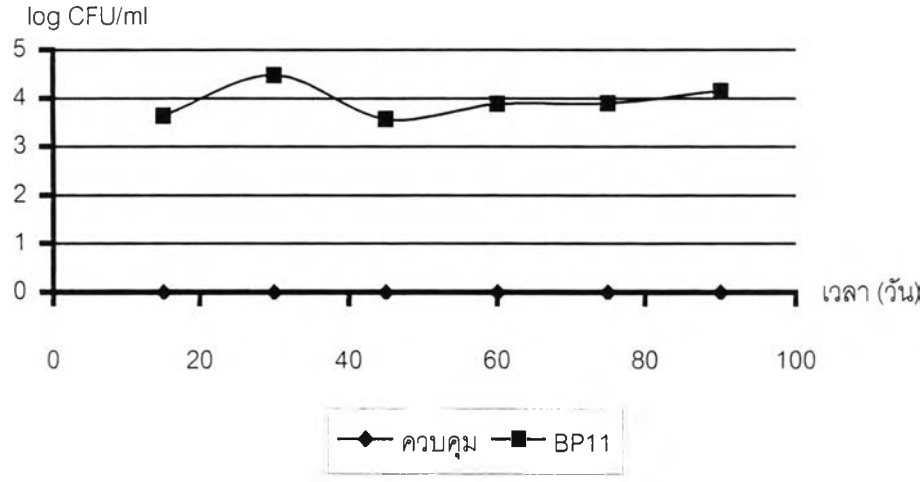
การทดลองหาปริมาณแบคทีเรียรวมในตะกอนและอุจจาระในบ่อระหว่างการเลี้ยงกุ้งพบว่าปริมาณแบคทีเรียรวมในตะกอนและอุจจาระในบ่อกลุ่มควบคุมและกลุ่มการเลี้ยงที่มีการผสมอาหารด้วย *Bacillus* P11 อยู่ในช่วง 10^8 – 10^9 CFU/กรัม ดังแสดงในรูปที่ 44 ไม่พบ*Bacillus* P11 ในตะกอนและอุจจาระจากบ่อควบคุม แต่พบ *Bacillus* P11 และสปอร์ประมาณ 10^4 – 10^6 CFU/กรัม และ10^3 – 10^4 CFU/กรัม จากบ่อที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* P11 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 45 และ 46 สำหรับการตรวจหาปริมาณ *Vibrio* sp. พบว่าในตะกอนและอุจจาระจากบ่อกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* P11 มีปริมาณ *Vibrio* sp. ใกล้เคียงกันคือประมาณ 10^4 – 10^7 CFU/กรัมดังแสดงในรูปที่ 47



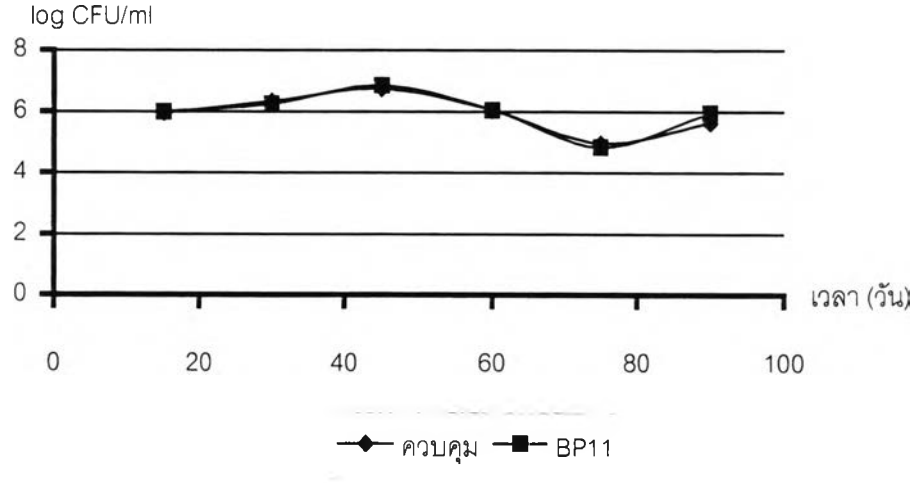
รูปที่ 44 แสดงปริมาณแบคทีเรียรวมในอุจจาระและตะกอนในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำในบ่อปูนขนาด 400 ลิตร เป็นระยะเวลา 100 วัน



รูปที่ 45 แสดงปริมาณ *Bacillus* P11ในอุจจาระและตะกอนในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำในบ่อปูนขนาด 400 ลิตร เป็นระยะเวลา 100 วัน



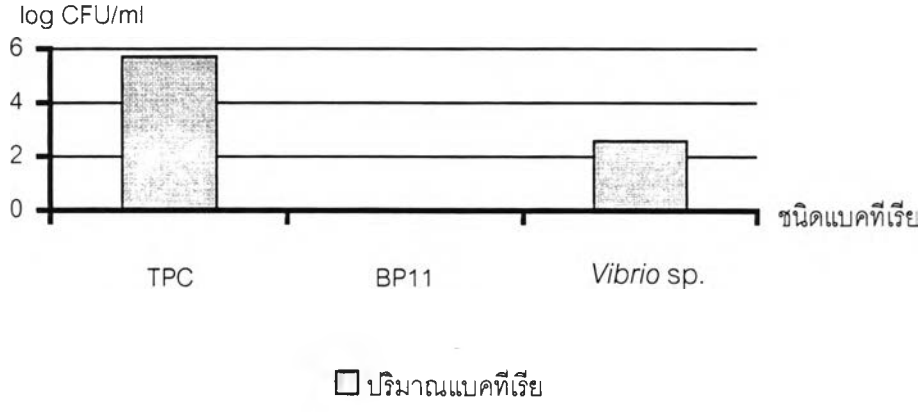
รูปที่ 46 แสดงปริมาณสปอร์ของ *Bacillus* P11ในอุจจาระและตะกอนในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำในบ่อขนาด 400 ลิตร เป็นระยะเวลา 100 วัน



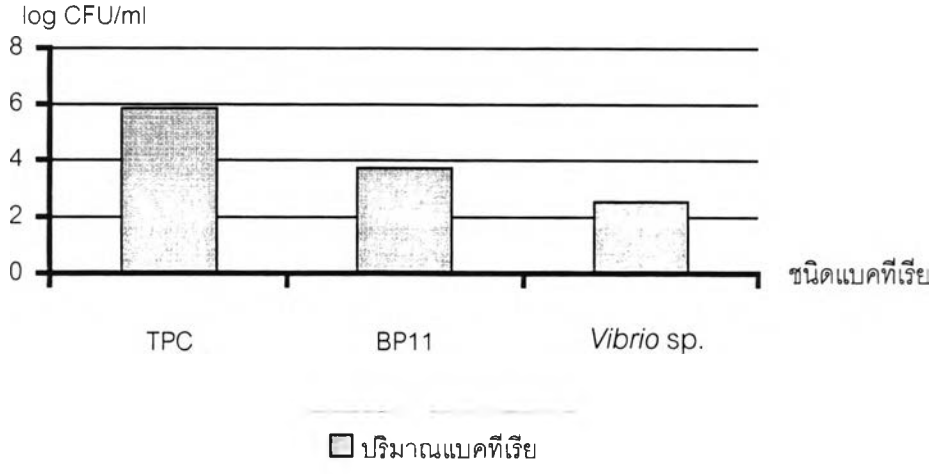
รูปที่ 47 แสดงปริมาณ *Vibrio* sp. ในอุจจาระและตะกอนในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำในบ่อปูนขนาด 400 ลิตร เป็นระยะเวลา 100 วัน

ผลการตรวจหาปริมาณและชนิดของแบคทีเรียในลำไส้กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงครบ 100 วัน

หลังเลี้ยงกุ้งกุลาดำครบ 100 วัน นำกุ้งแต่ละกลุ่มทดลองมาตรวจหาปริมาณและชนิดของแบคทีเรียในลำไส้พบว่า แบคทีเรียรวมในกุ้งกลุ่มควบคุมและกลุ่ม *Bacillus* P11 มีประมาณ 10^6 CFU/กรัม ปริมาณ *Vibrio* sp.ประมาณ 10^3 CFU/กรัม และปริมาณ *Bacillus* P11 ประมาณ 10^4 CFU/กรัม แต่ไม่พบ *Bacillus* P11 ในทางเดินอาหารของกุ้งกลุ่มควบคุม ดังแสดงในรูปที่ 48 และ 49



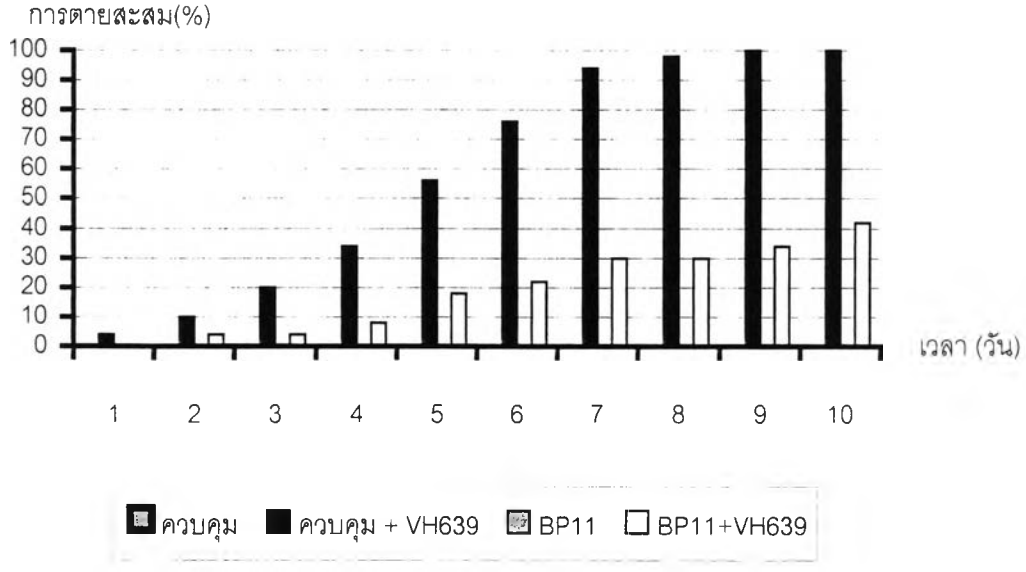
รูปที่ 48 แสดงปริมาณแบคทีเรียรวม, ปริมาณ *Bacillus* P11 (BP11) และปริมาณ *Vibrio* sp. ในลำไส้กุ้งกุลาดำในกลุ่มควบคุมหลังการเลี้ยงเป็นเวลานาน 100 วัน



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

ผลการทดลองการชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 639 ในกุ้งกุลาดำ ครั้งที่ 2

หลังจากเลี้ยงกุ้งกุลาดำเป็นเวลา 100 วัน นำกุ้งที่เหลือจากแต่ละการทดลองมาชักนำให้เกิดโรคเรืองแสงด้วย *V. harveyi* 639 โดยการทดลองแบ่งเป็น 4 กลุ่มได้แก่ กลุ่มควบคุม, กลุ่ม *Bacillus* P11 , กลุ่มควบคุมที่ชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 639 และกลุ่ม *Bacillus* P11ที่ชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 639 พบว่า ไม่พบการตายของกุ้งในกลุ่มกลุ่มควบคุมและกลุ่ม *Bacillus* P11 กุ้งกลุ่มควบคุมที่ชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 639 มีเปอร์เซ็นต์การตายสะสมมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์หลังจากชักนำให้โรคเป็นเวลานาน 5 วัน และ 100 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 9 แต่พบเปอร์เซ็นต์การตายสะสมเพียง 42 เปอร์เซ็นต์ในกุ้งกลุ่มกลุ่ม *Bacillus* P11ที่ชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 639 เป็นเวลา 10 วัน ดังแสดงในรูปที่ 50



รูปที่ 50 แสดงเปอร์เซ็นต์การตายสะสมของกุ้งกุลาดำระหว่างการชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 639

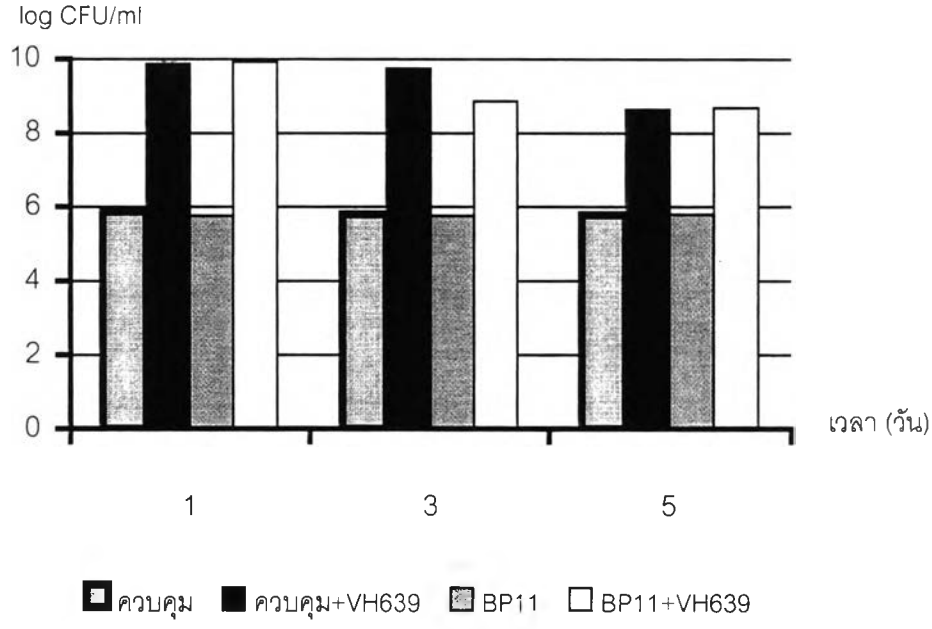
ผลการหาปริมาณแบคทีเรียรวม, *Bacillus* P11 และ *Vibrio* sp. ในน้ำระหว่างชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 639 ครั้งที่ 2

ปริมาณแบคทีเรียรวมที่ตรวจพบในน้ำระหว่างการชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 639 จากแต่ละกลุ่มทดลองพบว่า ปริมาณแบคทีเรียรวมในน้ำของกลุ่มควบคุมและกลุ่ม *Bacillus* P11 มีประมาณ 10^5 CFU/ml ในวันที่ 1, 3 และ 5 ของการชักนำให้เกิดโรค สำหรับในกลุ่มควบคุมและกลุ่ม

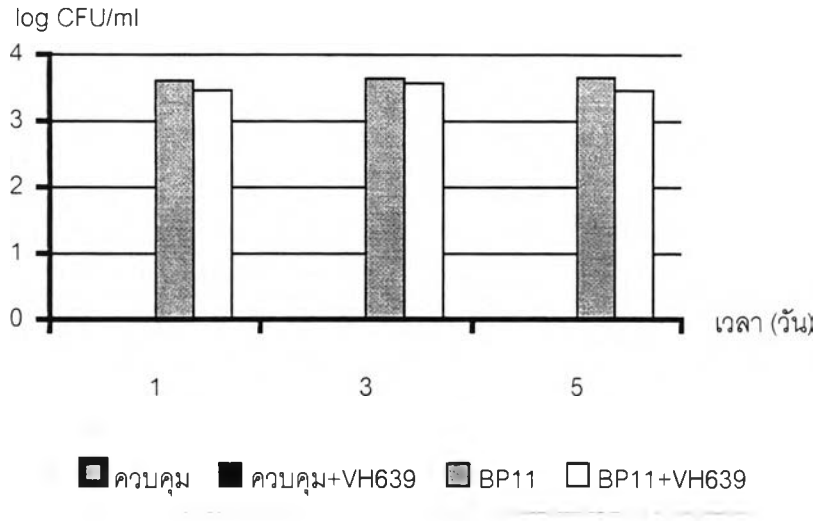
Bacillus P11ที่ชักนำให้เกิดโรคมีปริมาณแบคทีเรียรวมประมาณ 10^{10} CFU/ml ในวันที่ 1 - 3 และลดลงเป็นประมาณ 10^{7} CFU/ml ในวันที่ 5 หลังการชักนำให้เกิดโรค ดังแสดงในรูปที่ 51

ตรวจพบ *Bacillus* P11 ในปริมาณ 10^{3} CFU/ml ในกลุ่ม *Bacillus* P11 และในกลุ่ม *Bacillus* P11ที่ชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 639 ดังแสดงในรูปที่ 52

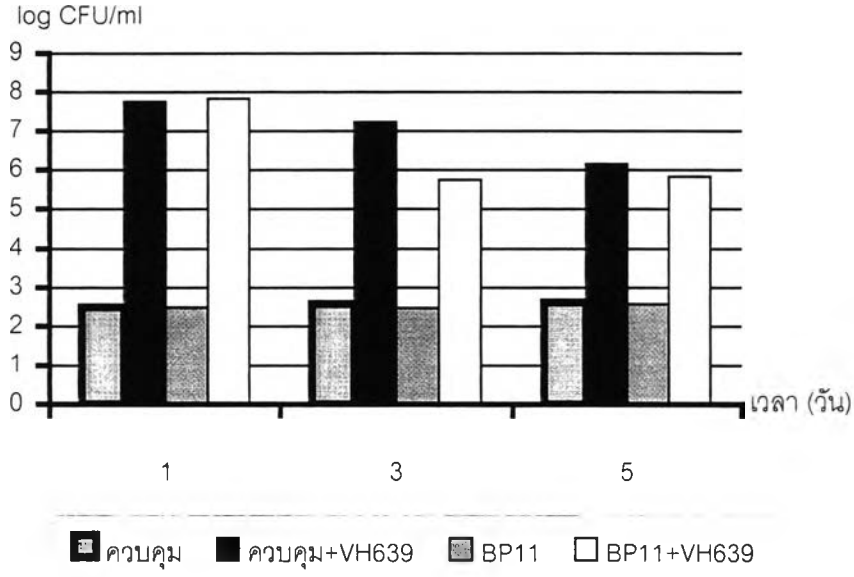
ตรวจพบ *Vibrio* sp. ในปริมาณ 10^{2} CFU/ml ในกลุ่ม *Bacillus* P11 และกลุ่มควบคุมและพบ *Vibrio* sp. ประมาณ 10^{8} CFU/ml ในกลุ่ม *Bacillus* P11และกลุ่มควบคุมที่ชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 639 ในวันที่ 2 และลดลงเหลือประมาณ 10^{6} CFU/ml ในวันที่ 5 ดังแสดงในรูปที่ 53



รูปที่ 51 แสดงปริมาณแบคทีเรียรวมในน้ำเลี้ยงกุ้งระหว่างการชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 639



รูปที่ 52 แสดงปริมาณ *Bacillus* P11ในน้ำเลี้ยงกุ้งระหว่างการชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 639

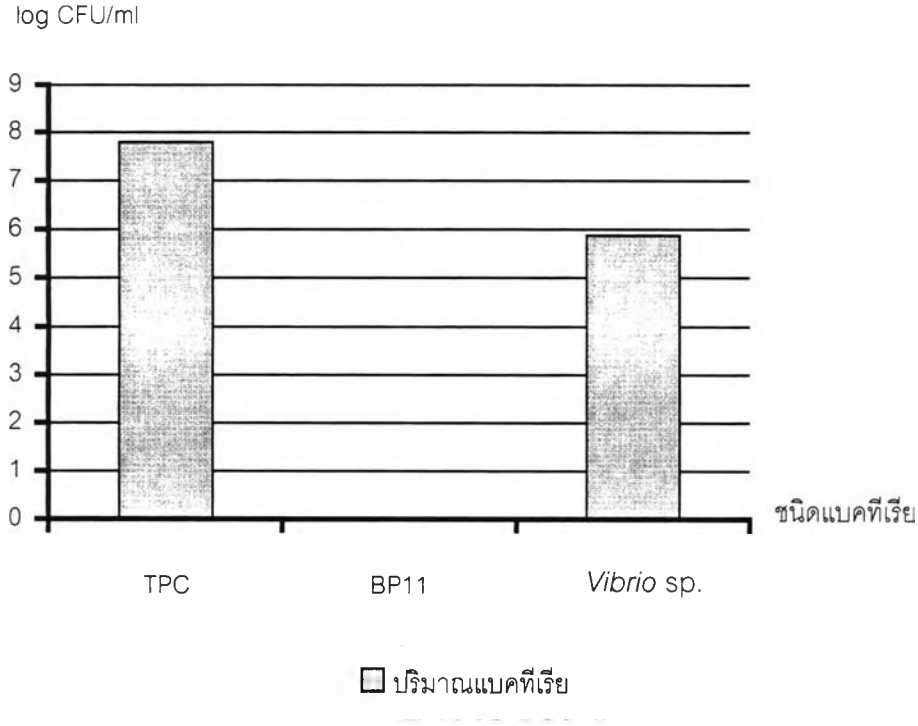


รูปที่ 53 แสดงปริมาณ *Vibrio* sp.ในน้ำเลี้ยงกุ้งระหว่างการชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 639

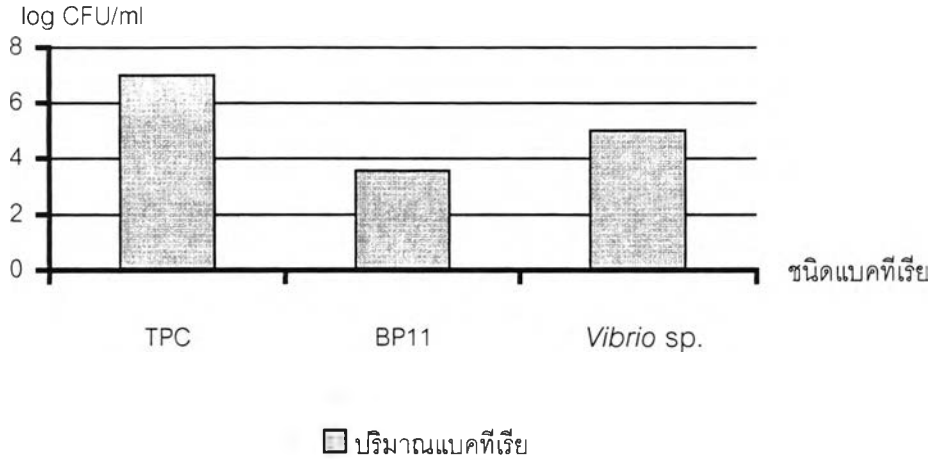
ผลการตรวจหาปริมาณและชนิดของแบคทีเรียในลำไส้กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงครบ 100 วันและชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 639

หลังจากชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 639 นำกุ้งกุลาดำที่ตายมาตรวจหาปริมาณและชนิดของแบคทีเรียในลำไส้พบว่าลำไส้กุ้งในกลุ่มควบคุมที่ชักนำให้เกิดโรคมีปริมาณแบคทีเรียรวมประมาณ

10^7 CFU/กรัมและปริมาณ *Vibrio* sp.ประมาณ 10^6 CFU/กรัม แต่ไม่พบ *Bacillus* P11 สำหรับลำไส้กุ้งในกลุ่ม *Bacillus* P11 ที่ชักนำให้เกิดโรคมีปริมาณแบคทีเรียรวมประมาณ 10^8 CFU/กรัมและปริมาณ *Vibrio* sp.ประมาณ 10^5 CFU/กรัม และพบ *Bacillus* P11ประมาณ 10^3CFU/กรัม ดังแสดงในรูปที่ 54 และ 55

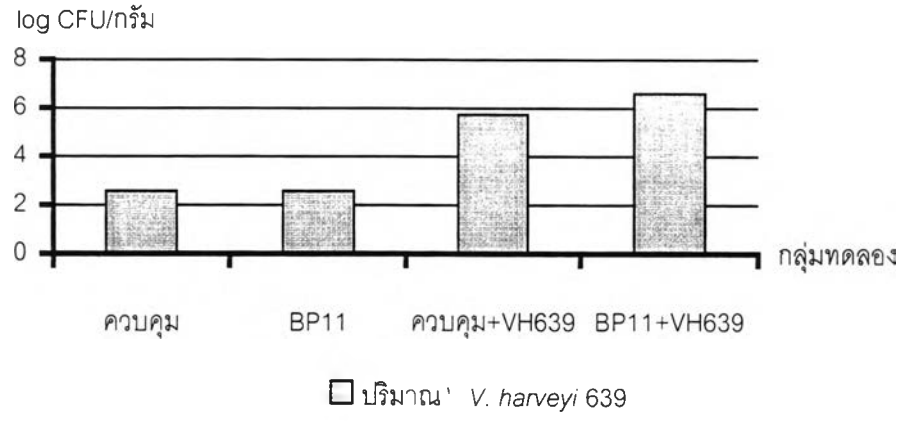


รูปที่ 54 แสดงปริมาณแบคทีเรียรวม, ปริมาณ *Bacillus* P11 (BP11) และปริมาณ *Vibrio* sp. ในลำไส้กุ้งกุลาดำในกลุ่มควบคุมหลังการเลี้ยงเป็นเวลานาน 100 วันและชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 639



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

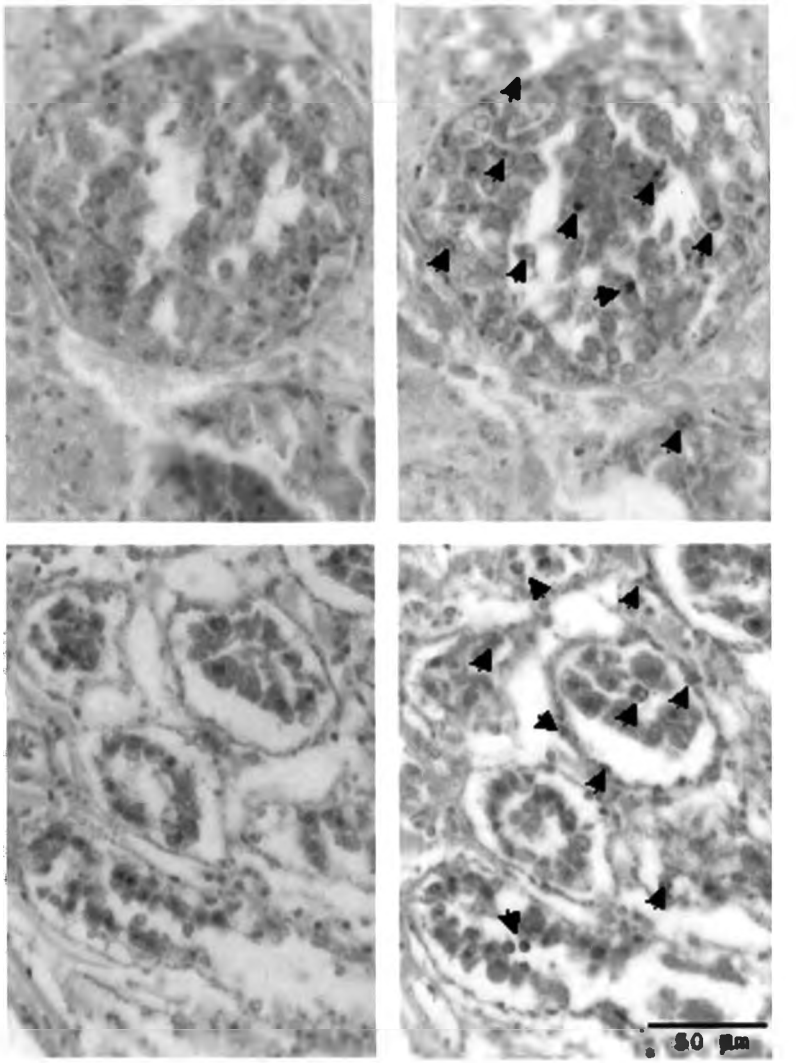
ผลการตรวจหาปริมาณ *V. harveyi* 639 ในตับกุ้งที่ตายเนื่องจากชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 639



รูปที่ 56 แสดงปริมาณ *V. harveyi* 639 ตับกุ้งที่ตายเนื่องจากชักนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 639

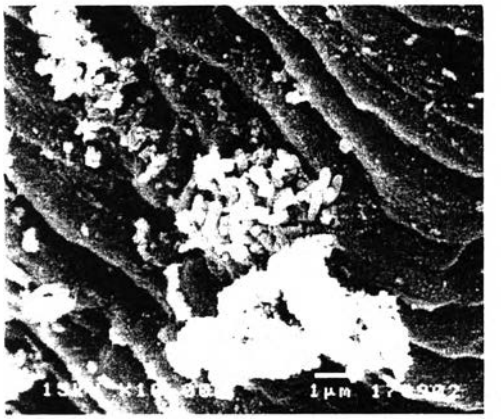
ผลการตรวจหา *V. harveyi* 639 **ด้วยวิธี** immunohistochemistry

การทดลองนำตัวอย่างกุ้งที่ตายเนื่องจากการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 639 มาตรวจดูพยาธิสภาพของตับที่ติดเชื้อ *V. harveyi* 639 โดยใช้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ *V. harveyi* 639 (3-3H) (วรรนิภา เพี้ยนภักตร์) พบว่ากุ้งทั้ง 2 กลุ่มการทดลองตายเนื่องจากติดเชื้อ *V. harveyi* 639 เนื่องจากตรวจพบบริเวณที่ติดเชื้อ ซึ่งมีลักษณะสีน้ำตาลในเนื้อเยื่อตับตัวอย่าง ดังแสดงในรูปที่ 57



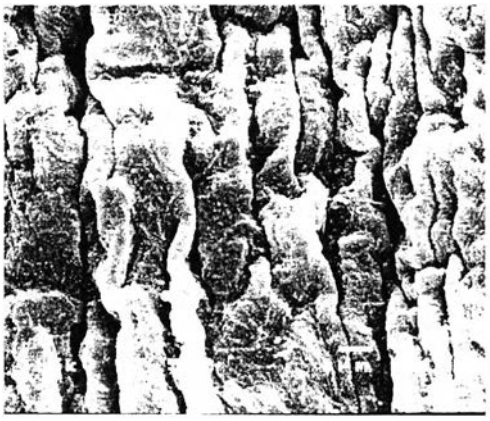
รูปที่ 57 แสดงเนื้อเยื่อบริเวณต่อมน้ำเหลืองของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ *V. harveyi* 639 โดยสังเกตจากตำแหน่งที่ลูกศรชี้เป็นบริเวณเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อ *V. harveyi* 639 (ด้านขวา) หลังจากการย้อมด้วยสีฮีมาทอกซิลินและอิโอซิน เปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลืองในตำแหน่งเดียวกัน (ด้านซ้าย)

ผลการตรวจหา *Bacillus* P11 **ในทางเดินอาหารกุ้งกุลาดำหลังเลี้ยงครบ** 100 **วันโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด** (Scanning electron microscope)



ก

ข

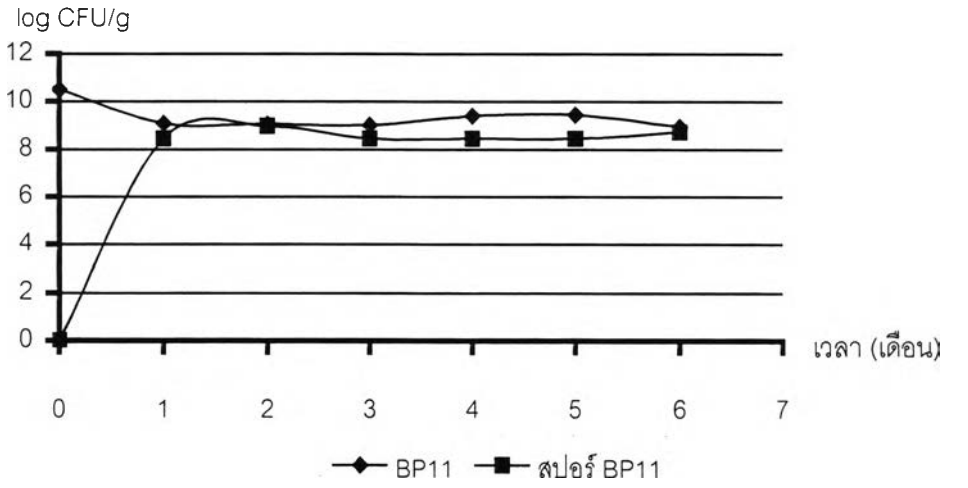


ค

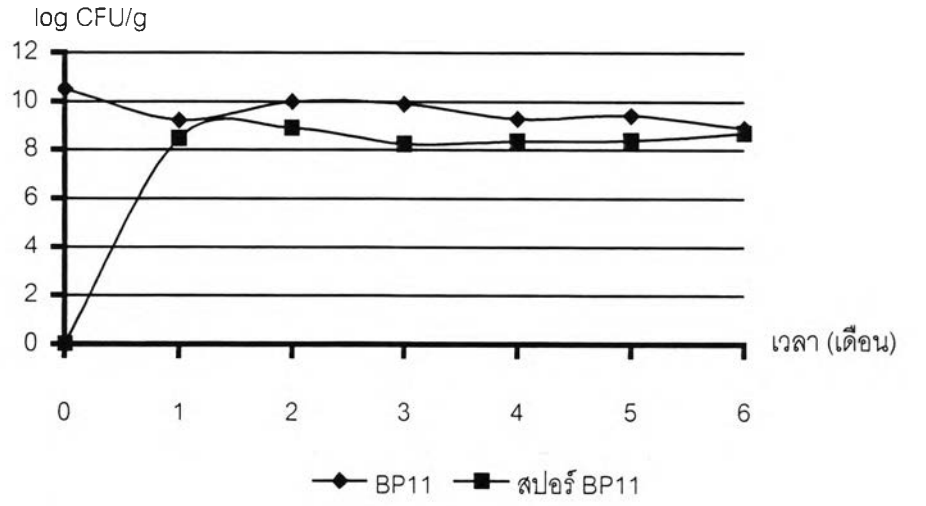
รูปที่ 58 แสดงเนื้อเยื่อลำไส้ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* P11 เป็นเวลานาน 100 วัน โดยสังเกตเห็นเซลล์แบคทีเรียที่ยึดเกาะกับผนังลำไส้ (ก และ ข) เปรียบเทียบกับลำไส้ของกุ้งในกลุ่มควบคุมซึ่งไม่พบเซลล์แบคทีเรียที่ผนังลำไส้ (ค)

ผลการทดลองการติดตามปริมาณ BP11 ที่ผสมในอาหารกุ้งเป็นระยะเวลา 6 เดือน

หลังจากผสม *Bacillus* P11 ในอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ที่ความเข้มข้นสุดท้ายประมาณ 10^{10}CFU/กรัม (วรรนิภา เพี้ยนภักตร์) นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง จากนั้นนำมานับปริมาณ *Bacillus* P11 และสปอร์ทุกๆ 1 เดือน พบว่ามีปริมาณ *Bacillus* P11 ประมาณ 10^{9}CFU/ กรัม และมีปริมาณสปอร์ประมาณ 10^{8}CFU/ กรัม ดังแสดงในรูปที่ 59 และ 60



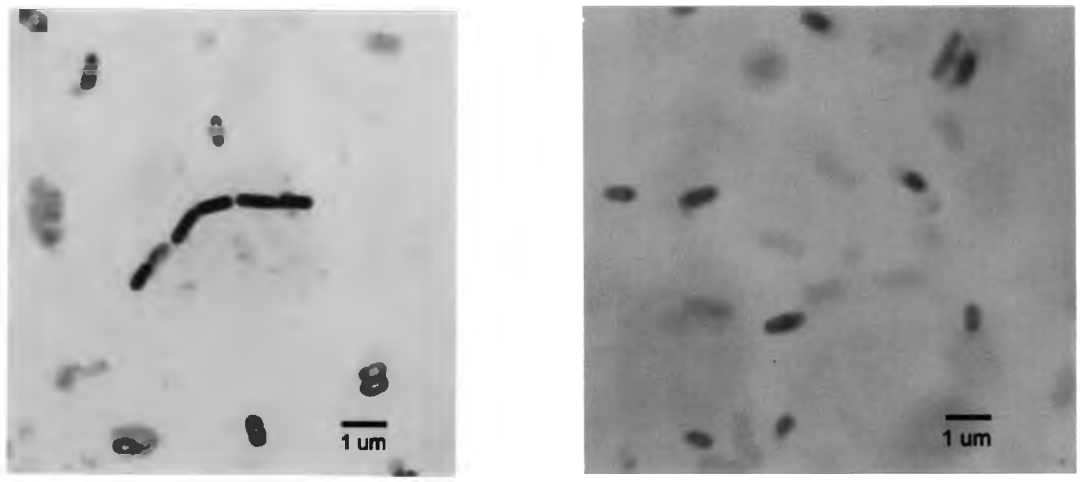
รูปที่ 59 แสดงปริมาณ BP11 และสปอร์ของ BP11 เมื่อผสมในอาหารเลี้ยงกุ้งและเก็บที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลานาน 6 เดือน



รูปที่ 60 แสดงปริมาณ BP11 และสปอร์ของ BP11 เมื่อผสมในอาหารเลี้ยงกุ้งและเก็บที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 6 เดือน

ผลการจัดจำแนก *Bacillus* P11 ด้วยวิธี Gram' s stain, **ชุดจัดจำแนก** API50CHB **และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ** 16S rDNA

ลักษณะเซลล์ของ *Bacillus* P11 หลังการย้อมสี (Gram's stain) พบว่าติดสีแกรมบวก ดังแสดงในรูปที่ 61 (ก) และเมื่อย้อมสีเพื่อดูลักษณะสปอร์ พบสปอร์ติดสีเขียวดังแสดงในรูปที่ 61 (ข)



ก ข

รูปที่ 61 แสดงลักษณะเซลล์ของ *Bacillus* P11 (ก) และลักษณะของสปอร์ของ *Bacillus* P11 (ข)

ตารางที่ 4.5 แสดงผลการจัดจำแนก *Bacillus* P11ด้วยชุดจัดจำแนก API50CHB

Carbohydrate reaction	result
Control	-
Glycerol	+
Erythritol	-
D-Arabinose	+
L-Arabinose	-
Ribose	-
D-Xylose	+
L-Xylose	-
Adonitol	-

Carbohydrate reaction	result
Galactose	-
D-Glucose	+
D-Fructose	+
D-Mannose	+
L-Sorbose	-
Rhamnose	-
Dulcitol	-
Inositol	-
Mannitol	+
Sorbitol	+
α Methyl-D-mannosind	-
α Methyl-D-glucoside	-
N- Acetyl glucosamine	+
Amygdalin	-
Arbutine	+
Esculin	-
Salicine	+
Cellobiose	+
Maltose	+
Lactose	-
Melibiose	-
Saccharose	+
Trehalose	+
Inulin	-
Melezitose	-
D-Raffinose	+

Carbohydrate reaction	result
Glycogen	-
Xylitol	-
β-Gentiobiose	+
D- Turanose	-
D-Lyxose	-
D-Tagarose	-
D-Fucose	-
L-Fucose	-
D-Arabitol	-
L-Arabitol	-
Gluconate	-
2 ceto-gluconate	-
5-ceto-gluconate	-

ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA **ของ** *Bacillus* P11

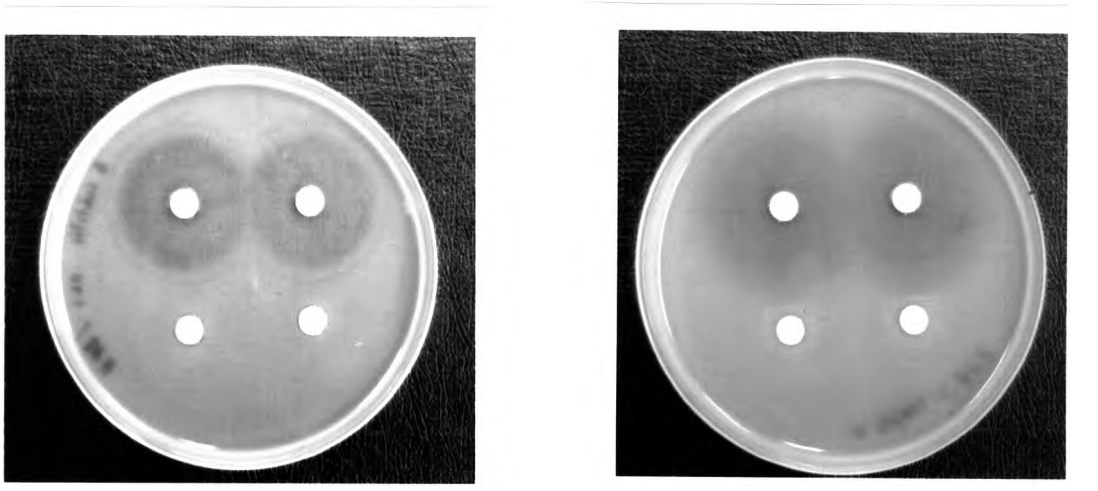
5′TACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGG
GTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCT
AATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCA
CTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGA
CGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGA
CTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAA
CGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAG
TGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTAC
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAA
AGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGG
TCATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGG
TGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAC
TGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACG
CCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACG
CATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGG
GGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACC
AGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGA
CAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAAC
GAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCG

GTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGG
CTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAAT
CCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAA
TCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACAC
CGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGT 3′

จากผลการจัดจำแนก *Bacillus* P11 ด้วยชุดจัดจำแนก API50CH และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA สามารถจัดจำแนก *Bacillus* P11 เป็น *Bacillus subtilis* ซึ่งพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA มีความคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ complete 16S rDNA ของ *Bacillus subtilis* ที่มีรายงานใน GenBank ถึง 99 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ค)

ผลการตรวจหาสารปฏิชีวนะที่สร้างโดย *Bacillus* P11 โดยวิธี Disk assay

การตรวจหาสารปฏิชีวนะที่สร้างโดย *Bacillus* P11 นำส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยง *Bacillus* P11 เป็นเวลานาน 36 ชั่วโมงมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้แก่ *Bacillus subtilis*1163, และ *Micrococcus luteus* พบว่าส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยง *Bacillus* P11 เป็นเวลานาน 36 ชั่วโมง ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ 2 สายพันธุ์คือ *Bacillus subtilis*1163 และ *Micrococcus luteus* แสดงว่าไม่พบสารปฏิชีวนะในส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยง *Bacillus* P11 เป็นเวลานาน 36 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 62



ก ข

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

ผลการตรวจหาสารปฏิชีวนะที่สร้างโดย *Bacillus* P11 โดยใช้บริการของบริษัท OMIC ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

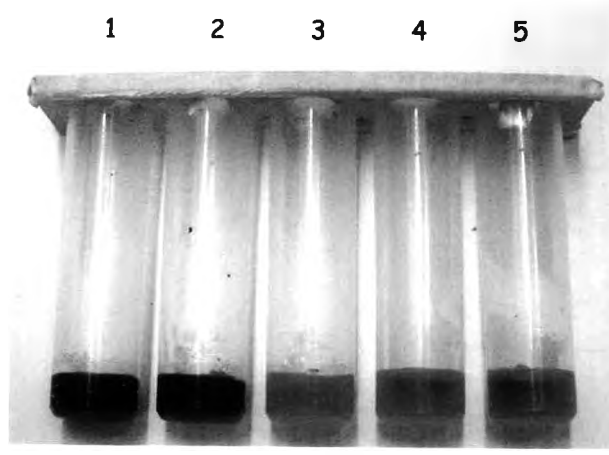
การตรวจหาสารปฏิชีวนะที่สร้างโดย *Bacillus* P11 นำส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยง *Bacillus* P11 เป็นเวลานาน 36 ชั่วโมงมาตรวจหาสารปฏิชีวนะด้วยเครื่อง HPLC C_{18} reverse phase column ตามวิธีของ AOAC ผลแสดงในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 แสดงผลการตรวจหาสารปฏิชีวนะในกลุ่มต่างๆด้วยเครื่อง HPLC

สารปฏิชีวนะ	ปริมาณที่ตรวจพบ (ส่วนในล้านส่วน)
1. ไนโตรฟูแรนด์และอนุพันธ์	0.000
2. คลอแรมฟินิคอล	0.000
3. คลอเตตราไซคลิน	0.000
4. เตตราไซคลิน	0.000
5. ออกซีเตตราไซคลิน	0.180
6. กรดออกโซลินิก	0.000

ผลการทดสอบการหาสารปฏิชีวนะตกค้างในเนื้อกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* P11 เป็นเวลานาน 100 วัน

การตรวจหาสารปฏิชีวนะตกค้างในเนื้อกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* P11 เป็นเวลา 100 วัน ด้วยชุดตรวจหาสารปฏิชีวนะตกค้างในเนื้อกุ้ง (CM-Test) ของคณะสัตวแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พบว่าไม่พบสารปฏิชีวนะในเนื้อกุ้งกุลาดำ ดังแสดงในรูปที่ 63



รูปที่ 63 แสดงผลการตรวจหาสารปฏิชีวนะในเนื้อกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* P11 เป็นเวลานาน 100 วัน

- หลอดที่ 1 และ 2 คือ positive control (สารปฏิชีวนะ)
- หลอดที่ 3 คือ negative control (สารสกัดจากเนื้อที่ปลอดสารปฏิชีวนะ)
- หลอดที่ 4 และ 5 น้ำจากเนื้อกุ้งตัวอย่าง