บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การทดลองแยกแบคทีเรียจากทางเดินอาหารของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่ได้จากทะเลใน จ.ชลบุรี และ จ. ตรังสามารถแยกแบคทีเรียรวมได้ประมาณ $8.5 \times 10^3 - 5.9 \times 10^7$ CFU/กรัมลำไส้ แบคทีเรียแกรมบวกในกลุ่ม *Bacillus* sp. ประมาณ 8.5×10^3 CFU/กรัมลำไส้ และแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* sp. ประมาณ $3 \times 10 - 1.31 \times 10^2$ CFU/กรัมลำไส้ นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียแกรมลบอื่นๆอีก 2 สายพันธุ์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ วรรนิภา เพี้ยนภักตร์ (1997) ได้ทดลองแยกแบคทีเรียจากทางเดินอาหารกุ้งกุลาดำและน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง ซึ่งแบคทีเรียที่แยกได้จัดอยู่ในสกุล *Bacillus* sp., *Vibrio* sp., *Aeromonas* sp., *Pseudomonas* sp. และ *Klebsiella* sp. แบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในทางเดินอาหารกุ้งกุลาดำและสามารถพบได้ในบ่อเลี้ยงกุ้ง เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้เป็นแบคทีเรียที่อยู่ในน้ำทะเลโดยเฉพาะส่วนแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งในกลุ่ม *Vibrio* sp. ได้แก่ *V. harveyi* ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคเรืองแสงในกุ้งกุลาดำ โดยปกติหากพบในความเข้มข้นที่ต่ำจะไม่ก่อให้เกิดโรคกับกุ้งกุลาดำ แต่เนื่องจากปัจจุบันการเลี้ยงกุ้งกุลาดำในประเทศไทยเป็นแบบกึ่งหนาแน่น ส่งผลให้กุ้งเกิดสภาวะเครียดจึงทำให้กุ้งติดโรคได้ง่ายและเกิดการระบาดอย่างรวดเร็ว (Sinderman และ Lighter, 1988) จากงานวิจัยนี้สามารถแยกแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* sp. ได้จากทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากแบคทีเรีย *Bacillus* sp. เป็นแบคทีเรียที่สามารถพบได้ทั่วไปในดินกอปรกับกุ้งกุลาดำเป็นสัตว์ที่หากินตามพื้นทะเลจึงมีโอกาสที่ได้รับแบคทีเรียกลุ่มนี้เข้าไปในร่างกายและหากได้รับเข้าไปในปริมาณมากและเป็นประจำจึงทำให้แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถอาศัยอยู่เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำได้ (Timmermans, 1987) จากรายงานของ Hamid et al.,1978 พบว่าแบคทีเรียในทางเดินอาหารของสัตว์น้ำสามารถเปลี่ยนแปลงได้ตามชนิดของจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในสิ่งแวดล้อม เนื่องจากสัตว์น้ำเป็นสัตว์ที่ออกลูกเป็นไข่ ดังนั้นในระยะตัวอ่อนของสัตว์น้ำจึงสัมผัสกับสิ่งแวดล้อมโดยตรงและเนื่องจากการกินอาหารของสัตว์น้ำวัยอ่อนเป็นแบบการกรองผ่านซ่องอาหารทางปาก จึงทำให้แบคทีเรียต่างๆที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมสามารถเข้าสู่ร่างกายได้ง่าย หากได้รับในปริมาณมากและต่อเนื่องสามารถทำให้แบคทีเรียบางสายพันธุ์พัฒนาเป็นแบคทีเรียประจะถิ่นของสัตว์น้ำชนิดนั้นๆได้

การทดลองทดสอบความสามารถของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ได้แก่ *Bacillus* P1, *Bacillus* P2 และ *Bacillus* P11 ที่แยกได้จากทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำ ในการยับยั้งการเจริญของ *Vibrio* sp. และ *E. coli* โดยวิธีการซึมผ่านวุ้น พบว่าส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยง Bacillus ทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งการเจริญของ *V. harveyi* 639 และ *E. coli* ได้ นอกจากนี้ *Bacillus* P1 และ *Bacillus* P2 ยังสามารถยับยั้งการเจริญของ *V. parahaemolyticus* ได้ แต่ Bacillus ทั้ง 3 สายพันธุ์ ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *V. flurialis* และ *V. vulnificus* จากผลการทดลองอาจกล่าวได้ว่า *Bacillus* sp. ที่แยกได้จากทางเดินอาหารกุ้งกุลาดำมีความจำเพาะต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอย่างจำเพาะ ซึ่งแตกต่างจากการยับยั้งที่เกิดจากสารปฏิชีวนะซึ่งสามารถยับยั้งแบคทีเรียในได้หลายกลุ่ม การยับยั้งที่เกิดจาก *Bacillus* sp. ที่แยกได้อาจเนื่องจากการสร้างสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย โดยสร้างและขับออกนอกเซลล์ สารกลุ่มดังกล่าวอาจเป็นแบคเทอริโอซิน ซึ่งมีความแตกต่างจากสารปฏิชีวนะคือ แบคเทอริโอซินเป็นสารที่แบคทีเรียสร้างขึ้นและมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเฉพาะกลุ่มเท่านั้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ วรรนิภา เพี้ยนภักตร์ (1997) ซึ่งแยกแบคทีเรีย *Bacillus* S11 จากทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำและพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของ *V. harveyi* ได้ ต่อมา นิโลบล ได้ทำการศึกษาสมบัติของสารที่ *Bacillus* S11 สร้างขึ้นและขับออกนอกเซลล์ โดยใช้เทคนิค การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตและทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค ion exchange chromatography และ Gel filtration chromatography จากนั้นหาน้ำหนักโมเลกุลของสารที่ทำบริสุทธิ์ได้ด้วยเทคนิค SDS gel electropholysis พบว่าสารที่แยกได้จาก *Bacillus* S11 มีน้ำหนักโมเลกุลขนาดประมาณ 1,500 ดาลตัน ซึ่งมีขนาดเล็กมากเมื่อเปรียบเทียบกับโมเลกุลของสารปฏิชีวนะ Laurent et al. (1999) คัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *V. proteolyticus* CW8T2 ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในอาร์ทีเมีย โดยพบว่าสารที่สร้างจากแบคทีเรียสายพันธุ์ LVS2 และ LVS8 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่แยกได้สามารถยับยั้งการเจริญของ *V. proteolyticus* CW8T2 เช่นกันในปี 2001 R. Chythanya et al. คัดแยกแบคทีเรีย *Pseudomonas* I-2 ซึ่งส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *Vibrio* sp. ที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคในอาร์ทีเมียได้ นอกจากนี้ B. Vaseeharan และ P. Ramasamy (2003) ทดลองใช้ cell-free extract ของ *Bacillus subtilis* BT23 ในการยับยั้งการเจริญของ *V. harveyi* ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคเรืองแสงในกุ้งกุลาดำ

การทดลองใช้ *Bacillus* P1, *Bacillus* P2 และ *Bacillus* P11 ผสมในอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำ โดยแต่ละสายพันธุ์จะแยกผสมกับอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำในอัตราส่วนต่างๆกัน พบว่าอัตราส่วนระหว่างเซลล์สดต่ออาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่เหมาะสมคือ 1 : 4 โดยจากอัตราส่วนดังกล่าวจะทำให้ความเข้มข้น

สุดท้ายของ *Bacillus* sp. มีความเข้มข้นประมาณ 10^{10} CFU/กรัม (วรรนิภา เพี้ยนภักตร์, 1997) จากนั้นนำอาหารที่ผสม *Bacillus* แต่ละสายพันธุ์ที่แยกได้ ไปเลี้ยงกุ้งกุลาดำอายุ PL25 ในระดับตู้กระจกขนาด 20 ลิตร โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ให้อาหารที่ผสม *Bacillus* S11 ซึ่งคัดแยกโดย วรรนิภา เพี้ยนภักตร์ (1997) ทำการทดลองเป็นระยะเวลา 60 วัน ให้อาหารวันละ 3 มื้อ และเก็บข้อมูลน้ำหนัก, ความยาว, ปริมาณแบคทีเรียในน้ำและตะกอนในบ่อเลี้ยงกุ้ง รวมทั้งวัดคุณภาพน้ำทุก 15 วัน จากผลการทดลองพบว่ากุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ผสม *Bacillus* P11 มีน้ำหนักและความยาวมากกว่ากุ้งกุลาดำในกลุ่มการทดลองอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) รวมทั้งแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวไม่มีผลกระทบกับคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้ง แสดงว่า *Bacillus* P11 มีความสามารถทำให้กุ้งกุลาดำมีสุขภาพดี มีประสิทธิภาพการใช้อาหารได้ดีกว่ากุ้งกุลาดำในกลุ่มอื่นๆ จึงทำให้มีการเจริญเติบโตที่ดีกว่า นอกจากนี้ยังสามารถตรวจพบ *Bacillus* P11 ในน้ำและตะกอนในบ่อเลี้ยงตลอดเวลา 60 วัน ส่วนในกลุ่มทดลองที่ให้อาหารผสม *Bacillus* P1 และ *Bacillus* P2 พบว่ากุ้งกุลาดำมีการเจริญเติบโตไม่แตกต่างจากกุ้งกุลาดำในกลุ่มควบคุม ดังนั้นการทดลองในระดับขยายขนาดคือการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ PL25 ในบ่อปูนซีเมนต์ขนาด 400 ลิตร จึงเลือก *Bacillus* P11 เป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมในอาการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ให้อาหารปกติ ซึ่งบ่อที่ใช้เลี้ยงเป็นบ่อเลี้ยงแบบระบบน้ำหมุนเวียนแบบปิด (closed recirculating water system) (Menasaveta และคณะ, 1989) มีการหมุนเวียนน้ำในระบบผ่านบ่อกรองที่อยู่ด้านข้าง ตลอดเวลาการเลี้ยงไม่มีการเปลี่ยนน้ำเพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ที่มีตั้งแต่เริ่มกระบวนการเลี้ยงกุ้ง ทำการทดลองเป็นระยะเวลา 100 วัน ระหว่างการทดลองเก็บข้อมูล น้ำหนัก, ความยาว, ปริมาณแบคทีเรียในน้ำและตะกอนในบ่อเลี้ยงกุ้ง รวมทั้งวัดคุณภาพน้ำทุก 15 วัน จากการทดลองพบว่ากุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* P11 มีการเจริญเติบโตและอัตรการรอดชีวิตมากกว่ากุ้งกุลาดำในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ตั้งแต่ 45 วันจนถึง 100 วันของการทดลองเลี้ยงกุ้งทั้ง 2 ครั้ง หลังจากทำการทดลองเลี้ยงกุ้งกุลาดำครบ 100 วัน เก็บตัวอย่างกุ้งแต่ละการทดลองมาแยกทางเดินอาหารและตรวจหาปริมาณของแบคทีเรียรวม, ปริมาณ *Bacillus* P11 และปริมาณ *Vibrio* sp. บนอาหารแข็งทริปติกซอย (TSA) ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์และบนอาหารแข็งไทโอซัลเฟตซิเตรทบายซอลท์ (TCBS) ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองสามารถตรวจพบ *Bacillus* P11 ทั้งในรูปเซลล์ที่มีชีวิตและสปอร์ในทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำประมาณ 10^3 - 10^4 CFU/กรัมลำไส้ จะสังเกตเห็นว่าปริมาณ *Bacillus* P11 ที่พบในทางเดินอาหารกุ้งกุลาดำมีปริมาณน้อยกว่าที่ผสมในอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณของ *Bacillus* P11 บางส่วนอาจกระจายตัวอยู่ในน้ำและบางส่วนที่กุ้งกินเข้าไปถูกขับออกจากร่างกายพร้อมกับอุจจาระ

ซึ่งจากผลการทดลองสามารถตรวจพบ *Bacillus* P11 ได้ทั้งในน้ำเลี้ยงกุ้งและในอุจจาระของกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* P11 แต่ไม่พบ *Bacillus* P11 ในทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำในกลุ่มควบคุม

การทดลองตรวจหา *Bacillus* P11 ในทางเดินอาหารกุ้งกุลาดำหลังเลี้ยงครบ 100 วันด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope) พบเซลล์แบคทีเรียที่มีรูปร่างแท่งคล้าย *Bacillus* sp.บริเวณผนังลำไส้ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* P11 แต่ไม่พบเซลล์แบคทีเรียรูปร่างดังกล่าวบริเวณผนังลำไส้ของกลุ่มควบคุม ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าเซลล์แบคทีเรียที่พบที่บริเวณผนังลำไส้ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* P11 น่าจะเป็น *Bacillus* P11 ที่กุ้งกินเข้าไปพร้อมกับอาหาร จากการทดลองไม่พบเซลล์แบคทีเรียบริเวณผนังลำไส้ของกุ้งกลุ่มควบคุมรวมทั้งไม่พบเซลล์แบคทีเรียชนิดอื่นในบริเวณผนังลำไส้ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* P11 อาจเนื่องมาจากเซลล์แบคทีเรียชนิดอื่นๆยึดเกาะกับผนังลำไส้ได้ไม่ดีจึงหลุดออกไประหว่างขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง

การทดลองการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคเรืองแสงด้วย *V. harveyi* 639 ความเข้มข้น 10^7 CFU/ml โดยวิธีการแช่ (immersion technique) พบว่ากุ้งกุลาดำในกลุ่มควบคุมเมื่อเหนี่ยวนำให้เกิดโรคเรืองแสง กุ้งกุลาดำมีอัตราการตายสะสม 50 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 5 และอัตราการตายสะสมเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 8 หลังจากทำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 639 ส่วนกุ้งกุลาดำที่ผ่านการเลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* P11 เป็นระยะเวลา 100 วัน พบว่า หลังจากเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 639 กุ้งในกลุ่มดังกล่าวมีอัตราการตายน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์หลังจากเหนี่ยวนำเกิดโรคเป็นเวลานาน 10 วัน จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ากุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* P11 สามารถต้านทานการเกิดโรคเรืองแสงจาก *V. harveyi* 639 ได้ดีกว่ากุ้งในกลุ่มควบคุมซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของวรรนิภา เพี้ยนภักตร์ (1997) ซึ่งทำการทดลองเลี้ยงกุ้งกุลาดำด้วยอาหารผสม *Bacillus* S11 พบว่ากุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมแบคทีเรียดังกล่าวมีน้ำหนัก,ความยาวรวมทั้งอัตราการรอดชีวิตมากกว่ากุ้งกุลาดำในกลุ่มควบคุมและเมื่อเหนี่ยวนำให้กุ้งติดโรคด้วย *V. harveyi* พบว่ากุ้งในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* S11 มีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่ากุ้งในกลุ่มควบคุม สมบัติ รักประทานพร (2542) ทดลองเลี้ยงกุ้งกุลาดำด้วยอาหารผสม *Bacillus* S11 และทำการศึกษาการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของระบบภูมิคุมกันของกุ้งในแต่ละกลุ่มการทดลองเพื่อเปรียบเทียบการต้านทานการเกิดโรคของกุ้งกลุ่มดังกล่าวเปรียบเทียบกับกุ้งกลุ่มควบคุม พบว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* S11 มีกิจกรรมการต้านแบคทีเรีย, กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสและระบบภูมิคุ้มกันดีกว่าในกุ้งกลุ่มควบคุม ทั้งนี้เนื่องมาจาก *Bacillus* S11 มีผลช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันให้กับกุ้งกุลาดำทำให้สามารถต้านทานการเกิดโรคได้ดีขึ้น อรุณ ธัญญนันท์ (2544) ได้ทดลองเลี้ยงกุ้งกุลาดำในกระชังในบ่อดินด้วยอาหารผสม

Bacillus S11 พบว่ากุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* S11 มีน้ำหนัก, ความยาวรวมทั้งอัตราการรอดชีวิตมากกว่ากุ้งกุลาดำในกลุ่มควบคุม

จากงานวิจัยนี้หลังจากการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 639 เก็บตัวอย่างกุ้งที่ตายจากแต่ละกลุ่มการทดลองมาตรวจหา *V. harveyi* 639 ในส่วนของทางเดินอาหารและตับโดยการกระจายเชื้อบนอาหารแข็งไทโอซัลเฟตซิเตรทบายซอลท์ (TCBS) ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสามารถตรวจพบ *V. harveyi* 639 ทั้งในตับและในทางเดินอาหารของกุ้งที่ตาย โดยพบปริมาณของ *V. harveyi* 639 ในตับประมาณ 10^5 CFU/กรัมของตับกุ้งทั้ง 2 กลุ่มทดลอง แต่พบปริมาณของ *V. harveyi* 639 ในทางเดินอาหารของกุ้งกลุ่มควบคุมประมาณ 10^7 CFU/ กรัม ส่วนในทางเดินอาหารของกุ้งในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* P11 พบปริมาณของ *V. harveyi* 639 ประมาณ 10^5 CFU/กรัม ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากกุ้งในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* P11 เกิด colonization ของ *Bacillus* P11 ในทางเดินอาหารจึงทำให้ *V. harveyi* 639 มีพื้นที่ยึดเกาะกับผนังทางเดินอาหารได้น้อยกว่าในกุ้งกลุ่มควบคุมและจากการตรวจหาปริมาณ *V. harveyi* 639 ในตับของกุ้งที่ตายทั้ง 2 กลุ่มทดลอง พบว่ามีปริมาณของ *V. harveyi* 639 ไม่แตกต่างกัน คือประมาณ 10^5 CFU/กรัม แต่กุ้งในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* P11 เป็นเวลานาน 100 วัน สามารถรอดชีวิตได้มากกว่ากุ้งในกลุ่มควบคุมหลังจากเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 639 จากผลการทดลองอาจเนื่องมาจากกุ้งในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* P11 สามารถต้านทานการเกิดโรคได้ดีกว่ากุ้งในกลุ่มควบคุม โดย *Bacillus* P11 มีผลช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำและช่วยให้กุ้งที่ได้รับ *Bacillus* P11 สามารถกำจัด *V. harveyi* 639 ได้ดีกว่ากุ้งในกลุ่มควบคุม และจากการยืนยันผลการติดโรคเรืองแสงจาก *V. harveyi* 639 ด้วยวิธี immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี (3-3H) (วรรนิภา เพี้ยนภักตร์) ซึ่งมีความจำเพาะต่อ *V. harveyi* 639 พบว่า สามารถตรวจพบ *V. harveyi* 639 ได้ทั้งในตับและทางเดินอาหารกุ้งกุลำดำ แสดงว่ากุ้งตายเนื่องจากการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* 639

การทดลองศึกษาลักษณะเฉพาะและการจัดจำแนก *Bacillus* P11 ด้วยชุดจำแนกแบคทีเรียสำเร็จรูป API50CHB (Biomerioux, France) และการเรียงตัวของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ซึ่งมีความยาวประมาณ 1,401 เบส สามารถจัดจำแนก *Bacillus* P11 เป็น *Bacillus subtilis* โดยจากผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ 16S rDNA พบว่ามีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ที่สมบูรณ์ของ *B. subtilis* ซึ่งรายงานใน Gen Bank ถึง 99 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ค)

การตรวจหาสารปฏิชีวนะที่สร้างโดย *Bacillus* P11 ด้วยชุดตรวจสอบสารปฏิชีวนะตกค้างในอาหารที่ผลิตโดยคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และการตรวจหาสารปฏิชีวนะด้วยวิธี Disk assay พบว่าไม่สามารถตรวจพบสารปฏิชีวนะที่สร้างโดย *Bacillus* P11 แต่เมื่อนำส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยง *Bacillus* P11 เป็นเวลานาน 36 ชั่วโมงไปตรวจหาสารปฏิชีวนะด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยใช้บริการของบริษัท OMIC พบว่าตรวจพบสารปฏิชีวนะออกซิเตตราไซคลินในปริมาณ 0.18 ส่วนในล้านส่วน ซึ่งปริมาณของสารปฏิชีวนะดังกล่าวที่ตรวจพบอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานของกระทรวงสาธารณสุขที่อนุญาตให้ตรวจพบออกซิเตตราไซคลินในอาหารได้ไม่เกิน 0.200 ส่วนในล้านส่วน เมื่อนำเนื้อกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* P11 มาตรวจหาสารปฏิชีวนะที่สร้างโดย *Bacillus* P11 ด้วยชุดตรวจสอบสารปฏิชีวนะตกค้างในอาหารที่ผลิตโดยคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ไม่พบการตกค้างของสารปฏิชีวนะในเนื้อกุ้งกลุ่มดังกล่าว แสดงว่าปริมาณออกซิเตตราไซคลินที่สร้างโดย *Bacillus* P11 มีปริมาณต่ำกว่าที่จะก่อให้เกิดการตกค้างของสารปฏิชีวนะในเนื้อกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* P11

จากการคัดแยก *Bacillus* P11 จากทางเดินอาหารกุ้งกุลาดำ มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *V. harveyi* 639 ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคเรืองแสงในกุ้งกุลาดำ และเมื่อนำ *Bacillus* P11 มาผสมในอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำและทดลองใช้เลี้ยงกุ้งกุลาดำ PL25 เป็นเวลา 100 วัน พบว่า *Bacillus* P11 มีผลช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตและอัตราการรอดชีวิตของกุ้งกุลาดำโดย *Bacillus* P11สามารถอาศัยอยู่ในทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำและช่วยให้กุ้งกุลาดำมีความต้านทานการเกิดโรคเรืองแสงได้ ซึ่งผลดังกล่าวเป็นลักษณะที่ดีของแบคทีเรียโพรไบโอติก (Fuller, 1989) ถึงแม้ว่าจะตรวจพบสารปฏิชีวนะออกซีเตตราไซคลินในส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยง *Bacillus* P11 แต่ปริมาณที่ตรวจพบยังอยู่ในเกณฑ์ที่ปลอดภัยและไม่ก่อให้เกิดการตกค้างของสารปฏิชีวนะในเนื้อกุ้งกุลาดำ ดังนั้นจึงสามารถใช้ *Bacillus* P11 เสริมในอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำเพื่อช่วยเสริมการเจริญเติบโตและเพิ่มความสามารถในการต้านทานการเกิดโรคแทนการใช้สารปฏิชีวนะซึ่งเป็นปัญหากับการส่งออกเนื้อกุ้งกุลาดำในปัจจุบัน

สรุปผลการทดลอง

1. แยกแบคทีเรียจากทางเดินอาหารกุ้งกุลาดำได้แบคทีเรียแกรมบวก 3 ไอโซเลต ได้แก่ *Bacillus* P1, *Bacillus* P2 และ *Bacillus* P11
2. นำแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ผสมกับอาหารเลี้ยงกุ้งในอัตราส่วนต่างๆ พบว่าอัตราส่วนที่

เหมาะสมคือ เซลล์สด 1 ส่วน:อาหารกุ้ง 4 ส่วน (2.0%เซลล์แบคทีเรีย) ได้ปริมาณแบคทีเรียประมาณ 10^{10}CFU/กรัม

3. การทดลองเลี้ยงกุ้งด้วยอาหารผสม *Bacillus* sp. แต่ละสายพันธุ์ที่แยกได้ในระดับตู้กระจกขนาด 20 ลิตร เป็นเวลา 60 วัน พบว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* P11 การเจริญเติบโตและต้านทานการเกิดโรคเรืองแสงจาก *V. harveyi* 1526 ได้ดีกว่ากุ้งในกลุ่มอื่นๆ

4. การทดลองเลี้ยงกุ้งด้วยอาหารผสม *Bacillus* P11 เปรียบเทียบกับกุล่มควบคุมในบ่อปูนซีเมนต์ขนาด 400 ลิตร เป็นเวลา 100 วัน (2 ครั้ง) พบว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* P11 การเจริญเติบโต, เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตรวมทั้งสามารถต้านทานการเกิดโรคเรืองแสงจาก *V. harveyi* 639 ดีกว่ากุ้งในกลุ่มควบคุม

5. ระหว่างการทดลองเลี้ยงกุ้งด้วยอาหารผสม *Bacillus* P11 สามารถตรวจพบ *Bacillus* P11 และสปอร์ในน้ำและตะกอนในบ่อเลี้ยงกุ้งตลอดระยะเวลาการเลี้ยงแต่ไม่พบแบคทีเรียดังกล่าวในบ่อเลี้ยงกุ้งกลุ่มควบคุม

6. การทดลองตรวจหาแบคทีเรียบริเวณผนังลำไส้กุ้งด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope) สามารถตรวจพบแบคทีเรียรูปร่างแท่งคล้าย *Bacillus* sp.ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็น *Bacillus* P11 บนผิวหน้าบริเวณผนังลำไส้กุ้งกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* P11 แต่ไม่พบแบคทีเรียดังกล่าวบริเวณผนังลำไส้กุ้งกลุ่มควบคุม

7. การทดลองตรวจหา *V. harveyi* 639 บริเวณตับและลำไส้ของกุ้งที่ชักนำให้เกิดโรคเรืองแสงด้วย *V. harveyi* 639 โดยวิธี Immunohistochemistry สามารถพบการติดเชื้อ *V. harveyi* 639 ที่บริเวณอวัยวะดังกล่าวของกุ้งที่ตายเนื่องจากชักนำให้เกิดโรคเรืองแสงด้วย *V. harveyi* 639

8. การจัดจำแนกสายพันธุ์ *Bacillus* P11 ด้วยชุดจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรีย API50CHB และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA สามารถจัดจำแนก *Bacillus* P11 เป็น *Bacillus subtilis* (มีความเหมือน 99% กับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของ *B. subtilis* ที่รายงานใน GenBank)

9. การตรวจหาสารปฏิชีวนะในส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยง *Bacillus* P11 เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ด้วยวิธี Disk assay และชุดตรวจสอบสารปฏิชีวนะ CM-Test ของคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์หมาวิทยาลัย พบว่าไม่พบสารปฏิชีวนะในส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยง *Bacillus* P11 แต่ตรวจพบสารปฏิชีวนะออกซิเตตราไซคลินปริมาณ 0.18 ส่วนในล้านส่วน ในส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยง *Bacillus* P11 ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้บริการของบริษัท OMIC ซึ่งปริมาณที่ตรวจพบอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนดโดยกระทรวงสาธารณสุขคือน้อยกว่า 0.2 ส่วนในล้านส่วน

10. การตรวจหาสารปฏิชีวนะตกค้างในเนื้อกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* P11 พบว่าตรวจไม่พบสารปฏิชีวนะตกค้างในเนื้อกุ้งกุลาดำในกลุ่มดังกล่าว

ข้อเสนอแนะ

1. ศึกษาการสกัดสารต้านจุลชีพที่ *Bacillus* P11 สร้างขึ้นให้บริสุทธิ์ รวมทั้งศึกษาโครงสร้างของโมเลกุลของสารดังกล่าว

2. ศึกษาหาภาวะเหมาะสมในการเจริญของ *Bacillus* P11 เพื่อให้ได้เซลล์ในปริมาณมากและประหยัดต้นทุนในการผลิต

3. ศึกษาการใช้ *Bacillus* P11 ในระดับบ่อเลี้ยงกุ้งเชิงพาณิชย์และระดับโรงอนุบาลเพาะฟัก