บทที่ 4

ผลการทดลอง

การเก็บตัวอย่างกุ้งและน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ เพื่อหาแบคทีเรียประจำถิ่น

เก็บตัวอย่างกุ้งกุลาดำและน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งจังหวัดเพชรบุรี จังหวัดฉะเชิงเทรา จังหวัดสมุทรปราการ และจังหวัดสมุทรสาคร บ่อที่เก็บตัวอย่างมีขนาดตั้งแต่ 3-5 ไร่ ลึกประมาณ 1.5 เมตร ลักษณะเป็นบ่อดิน มีพีเอชประมาณ 8.0- 8.5 กุ้งกุลาดำมีอายุประมาณ พี 30 - พี 45 เก็บตัวอย่างด้วยวิธีปราศจากเชื้อใส่ในหลอดแก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เก็บในที่เย็นอุณหภูมิ 4 °ซ นำมาแยกและคัดเลือกแบคทีเรียประจำถิ่นของกุ้งกุลาดำ

คัดเลือกแบคทีเรียจากทางเดินอาหารกุ้งและน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

นำทางเดินอาหารกุ้งที่ตัดด้วยวิธีปราศจากเชื้อ และน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ มาเจือจางในโซเดียมคลอไรด์ 0.85% ในอัตราส่วนที่เหมาะสม เพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง ทริปติกซอยเพื่อหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด พบจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดแสดงในตารางที่ 4 จำนวนแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมดเท่ากับ 377 ตัวอย่าง เมื่อนำมาตรวจสอบการย้อมติดสีแกรม รูปร่าง ลักษณะ และสมบัติต่างๆ สามารถแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 6 สกุล คือ *Bacillus* sp., *Aeromonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Klebsiella* sp. และ *Staphylococcus* sp. แยกได้จากอาหารแข็งทริปติกซอย *Vibrio* sp. แยกได้จากอาหารแข็งไทโอซัลเฟตซิเตรทบายซอลท์ จำนวนแบคทีเรียที่นับได้แต่ละสกุล แสดงผลในตารางที่ 5 แบคทีเรียที่ตรวจพบทั้ง 6 สกุลจัดเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นของกุ้งกุลาดำ นำแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมดมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวทริปติกซอย เขย่าที่ 30 °ซ เป็นเวลา 24 ชม. และนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 5000 รอบต่อนาที นำส่วนน้ำใสมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบที่ก่อโรคในคนและกุ้ง (ตามการทดลองข้อ 3.3) คือ *Bacillus cereus* เป็นตัวแทนของแบคทีเรียแกรมบวกรูปแท่ง *Vibrio harveyi* เป็นตัวแทนของแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่ง *Stsphylococcus aureus* เป็นตัวแทนของแบคทีเรียแกรมบวกรูปกลม โดยดูผลการ ยับยั้งจากบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้นแสดงในรูปที่ 2 พบแบคทีเรียจำนวน 1 สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบได้ คือ แบคทีเรีย S11 สามารถแยกได้จากทางเดินอาหารกุ้งกุลาดำ เมื่อนำมาตรวจสอบการย้อมติดสีแกรม รูปร่าง ลักษณะ และสมบัติต่างๆ สามารถจัดอยู่ในสกุล *Bacillus* sp. ดังนั้นจึงเรียกว่า *Bacillus* S11

ตารางที่ 4 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำ และน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

สถานที่	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (Total plate counts)	
	ทางเดินอาหาร (cfu/g)	น้ำ (cfu/ml)
จังหวัดเพชรบุรี	$2.2x10^5$ - $3.3x10^6$	$3.0x10^4$ - $1.2x10^5$
จังหวัดฉะเชิงเทรา	$1.4x10^4$ - $1.6x10^5$	$2.8x10^3$ - $8.1x10^4$
จังหวัดสมุทรปราการ	$4.7x10^6$ - $7.2x10^6$	$3.8x10^4$ - $6.4x10^5$
จังหวัดสมุทรสาคร	$4.5x10^4$ - $3.0x10^6$	$3.0x10^4$ - $9.4x10^5$

ตารางที่ 5 ชนิดและจำนวนแบคทีเรียประจำถิ่นที่แยกได้จากทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำ

ชนิดแบคทีเรีย	จำนวนแบคทีเรีย (cfu/g)
Bacillus sp.	$1.1x10^6$
Vibrio sp.	$1.3x10^6$
Aeromonas sp.	$2.7x10^3$
Pseudomonas sp.	$2.3x10^4$
Klebsiella sp.	$1.7x10^2$
Staphylococcus sp.	$2.4x10^3$

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

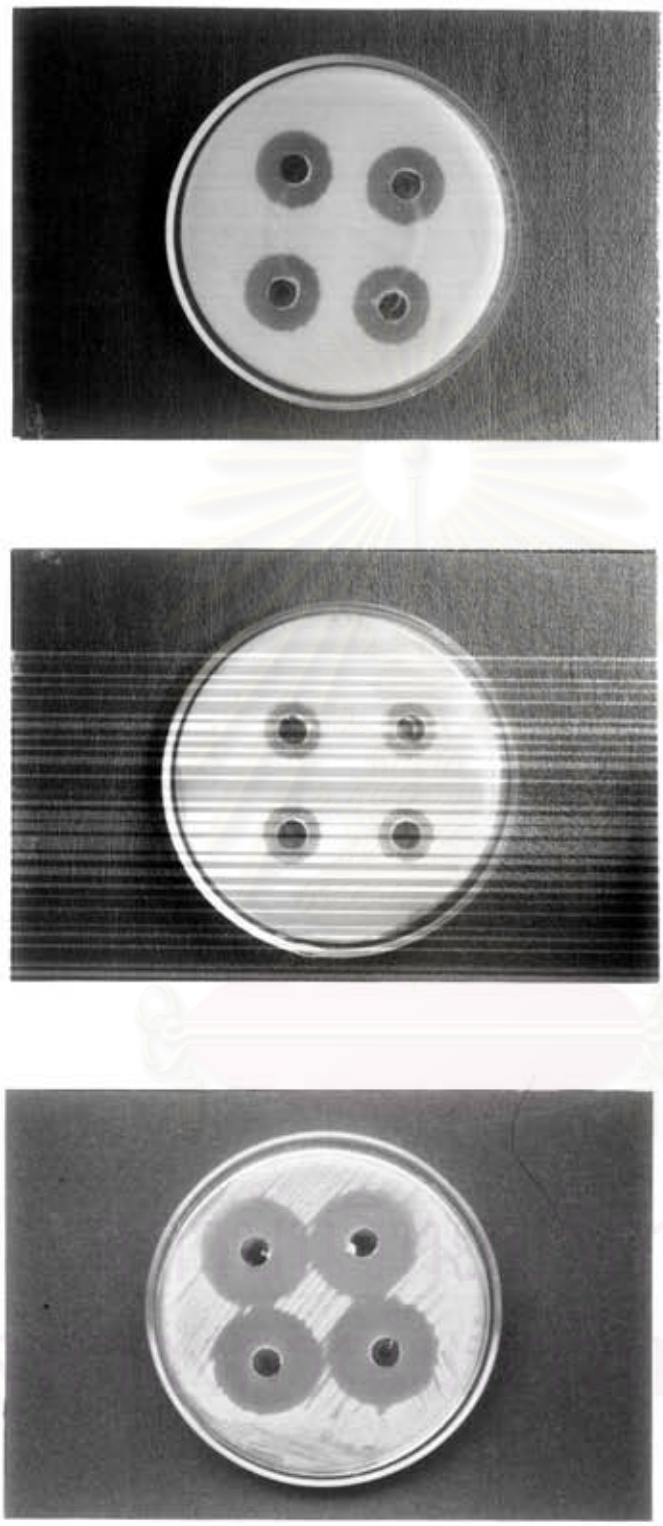
ทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบที่ก่อโรคในคนและกุ้งของ *Bacillus* S11 ที่มีสมบัติเป็นโพรไบโอติก

นำ *Bacillus* S11 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวทริปติกซอย เขย่าที่ 30 °ซ เป็นเวลา 24 ชม. และนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 5000 รอบต่อนาที นำส่วนน้ำใสมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบที่ก่อโรคในคนและกุ้ง (ตามการทดลองข้อ 3.3, 3.4) ได้แก่ *Bacillus cereus, B. subtilis, B. megaterium, Listeria monocytogenes* เป็นตัวแทนของแบคทีเรียแกรมบวกรูปแท่ง *Staphylococcus aureus* เป็นตัวแทนของแบคทีเรียแกรมบวกรูปกลม *Aeromonas hydrophila, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Vibrio alginolyticus, V. anguillarum, V. harveyi, V. parahaemolyticus, V. cholera* เป็นตัวแทนของแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่ง โดยดูผลการยับยั้งจากบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้นผลแสดงในตารางที่ 6 และผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบเมื่อใช้ส่วนน้ำใสของ *Bacillus* S11 เทียบกับกลุ่มควบคุมแสดงผลในรูปที่ 3-7 และแสดงค่าการเปรียบเทียบเวลาการแบ่งตัวเป็นตัว 2 เท่า (Doubling time) ในตารางที่ 7

ตรวจวัดการเจริญและศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการยับยั้งเชื้อทดสอบของ *Bacillus* S11

นำ *Bacillus* S11 มาตรวจวัดการเจริญ และหาภาวะเวลาที่เหมาะสมในการยับยั้งเชื้อทดสอบ พบว่า *Bacillus* S11 จะสร้างสารที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้สูงสุดชั่วโมงที่ 18 ซึ่งเป็นระยะที่การเจริญของแบคทีเรียอยู่ในระยะ late log phase ต่อระยะ stationary phase โดยดูผลการยับยั้งเชื้อทดสอบจากบริเวณยับยั้งเชื้อทดสอบที่เกิดขึ้นแสดงผลในรูปที่ 8 เมื่อนำมาหาอุณหภูมิและอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม พบว่าแบคทีเรีย S11 จะสร้างสารยับยั้งเชื้อทดสอบได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบทุกชนิด และจะสร้างสารยับยั้งได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 25-30 °ซ ในภาวะที่ต้องการอากาศ ผลแสดงในตารางที่ 8

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



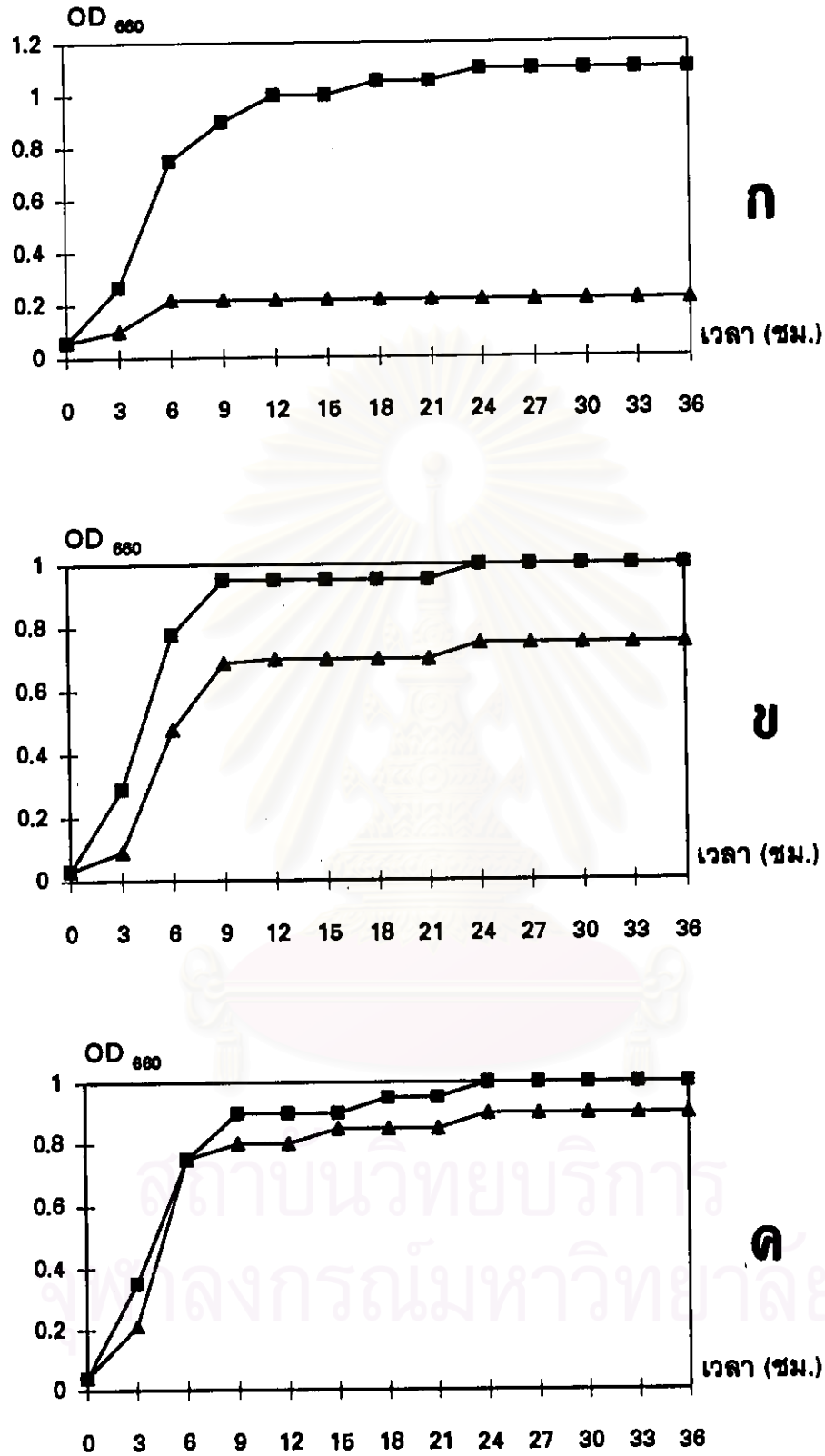
รูปที่ 2 บริเวณยับยั้งที่เกิดจากการยับยั้งเชื้อทดสอบโดยส่วนน้ำใสของ *Bacillus* S11

ก. *Bacillus cereus* ข. *Vibrio harveyi* ค. *Staphylococcus aureus*

ตารางที่ 6 ขนาดความกว้างของบริเวณยับยั้งที่เกิดจากการยับยั้งเชื้อทดสอบโดยส่วนน้ำใสของ *Bacillus* S11

สายพันธุ์	จำนวนสายพันธุ์ที่ยับยั้ง/จำนวนสายพันธุ์ที่ทดสอบ	ความกว้างของบริเวณยับยั้ง (มม.)
Bacillus cereus	3/3	10.0
Bacillus subtilis	1/1	7.0
Bacillus megaterium	1/1	4.0
Listeria monocytogenes	1/1	13.0
Staphylococcus aureus	1/1	17.0
Aeromonas hydrophila	1/1	4.0
Pseudomonas aeruginosa	0/1	0.0
Escherichia coli	0/1	0.0
Vibrio alginolyticus	1/1	5.0
Vibrio anguillarum	1/1	7.0
Vibrio harveyi	1/1	7.0
Vibrio parahaemolyticus	0/1	0.0
Vibrio cholera	0/1	0.0

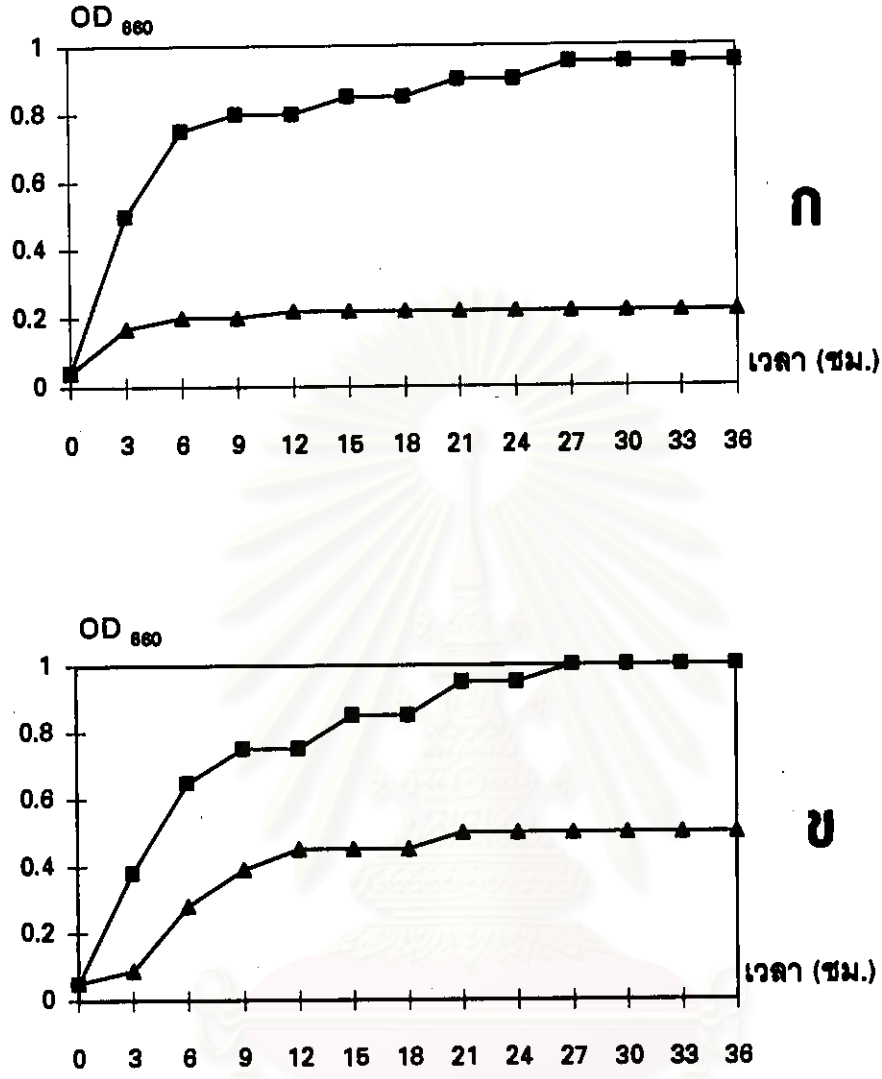
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3 การยับยั้งของส่วนน้ำใส *Bacillus* S11 ต่อการเจริญของ

ก. *B. cereus* ข. *B. subtilis* ค. *B. megaterium*

กลุ่มควบคุม (--■--) เติมส่วนน้ำใสของ *Bacillus* S11 (--▲--)

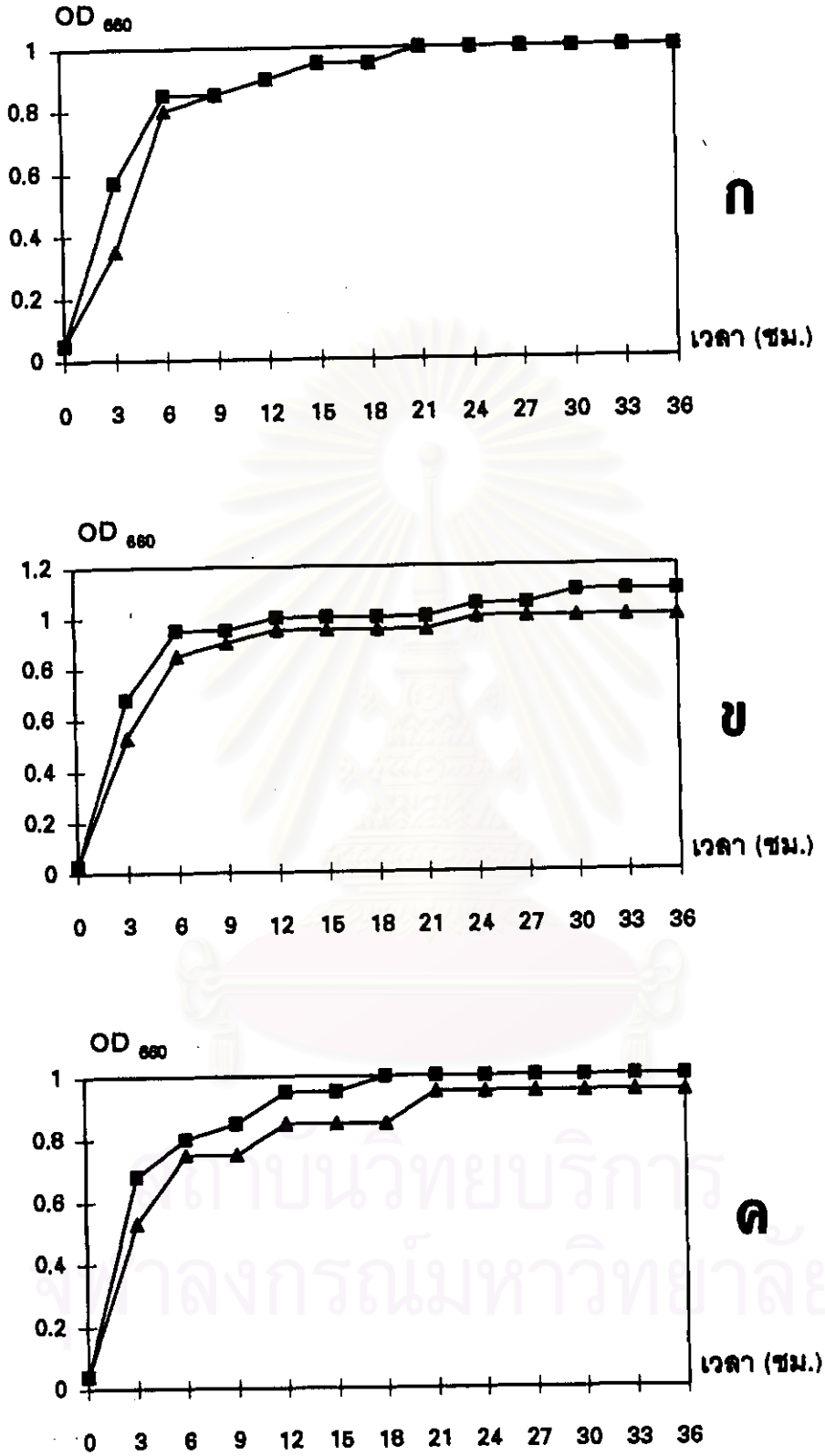


รูปที่ 4 การยับยั้งของส่วนน้ำใส *Bacillus* S11 ต่อการเจริญของ

ก. *Lis. monocytogenes* ข. *S. aureus*

กลุ่มควบคุม (--■--) เติมส่วนน้ำใสของ *Bacillus* S11 (--▲--)

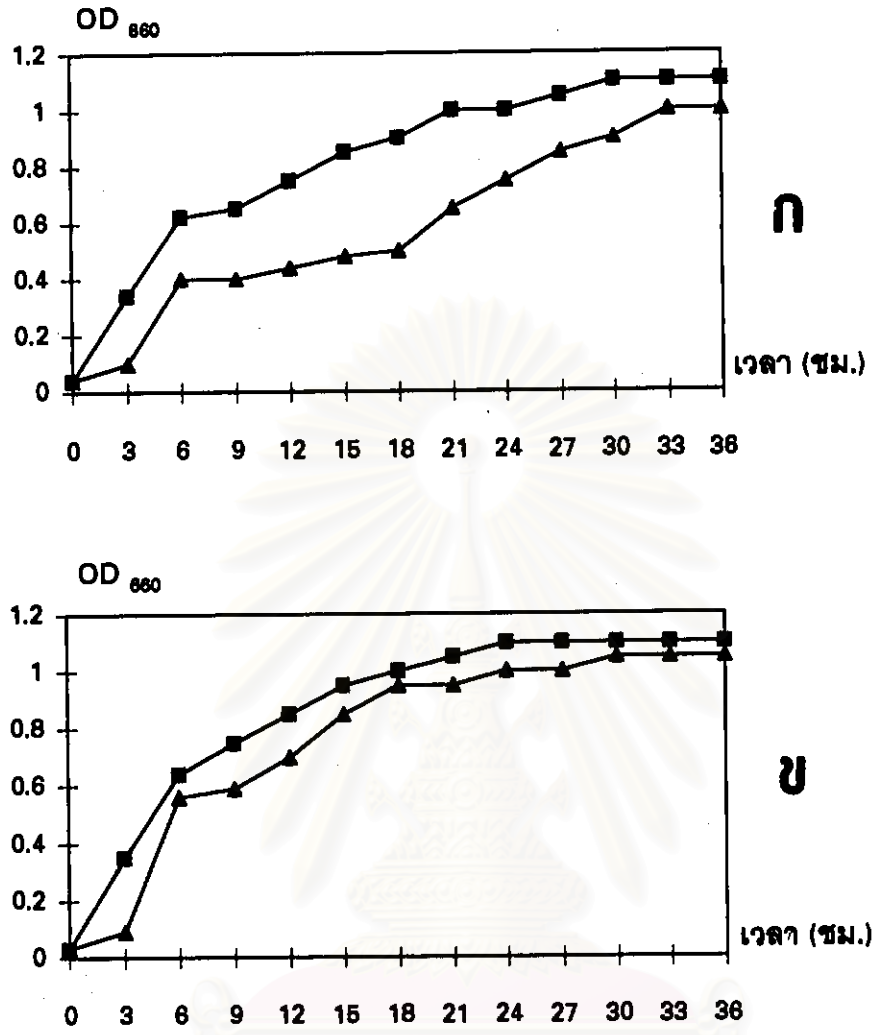
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 6 การยับยั้งของส่วนน้ำใส *Bacillus* S11 ต่อการเจริญของ

ก. *A. hydrophila* ข. *P. aeruginosa* ค. *E. coli*

กลุ่มควบคุม (--■--) เติมส่วนน้ำใสของ *Bacillus* S11 (--▲--)

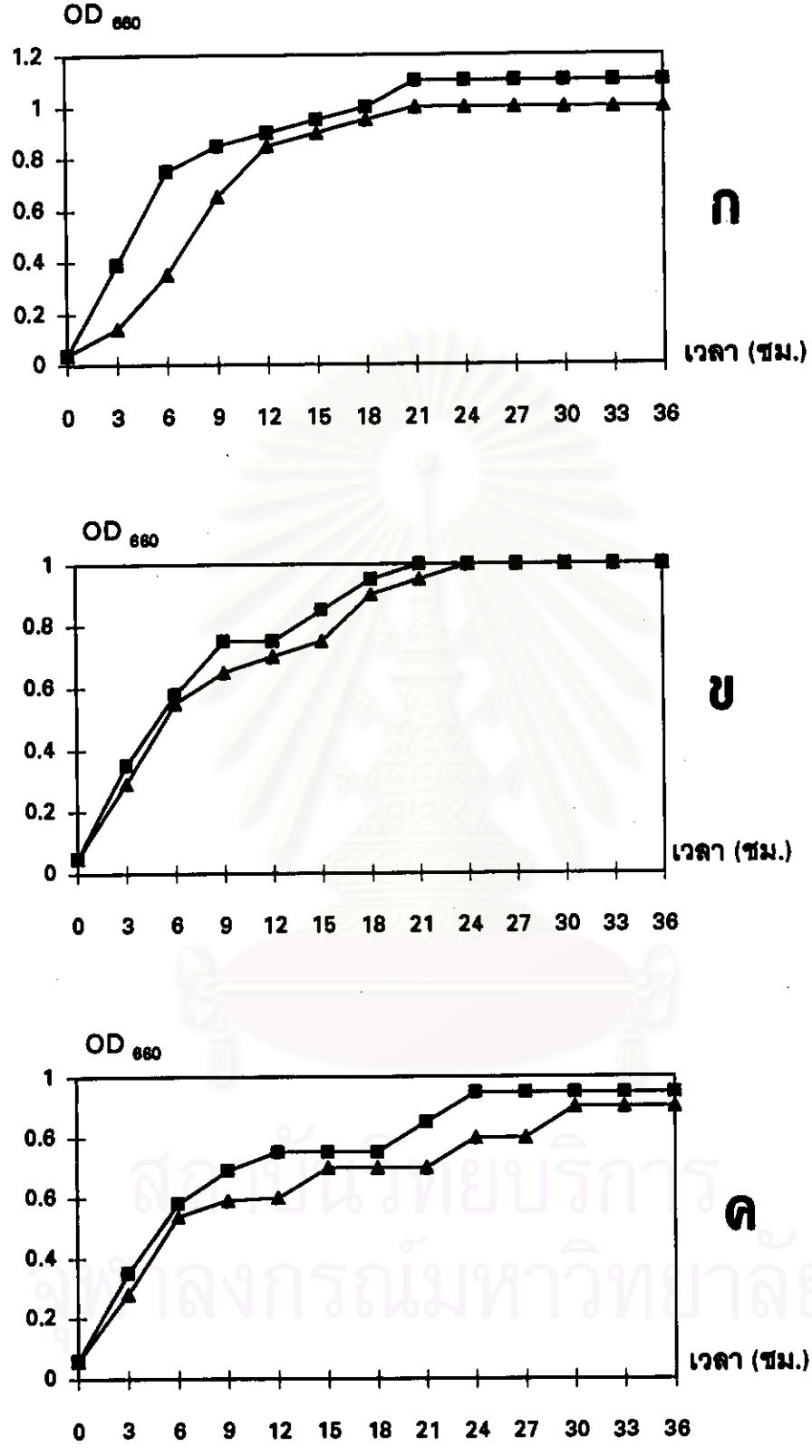


รูปที่ 6 การยับยั้งของส่วนน้ำใส *Bacillus* S11 ต่อการเจริญของ

ก. *V. alginolyticus* ข. *V. anguillarum*

กลุ่มควบคุม (--■--) ส่วนน้ำใสของ *Bacillus* S11 (--▲--)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 7 การยับยั้งของส่วนน้ำใส *Bacillus* S11 ต่อการเจริญของ

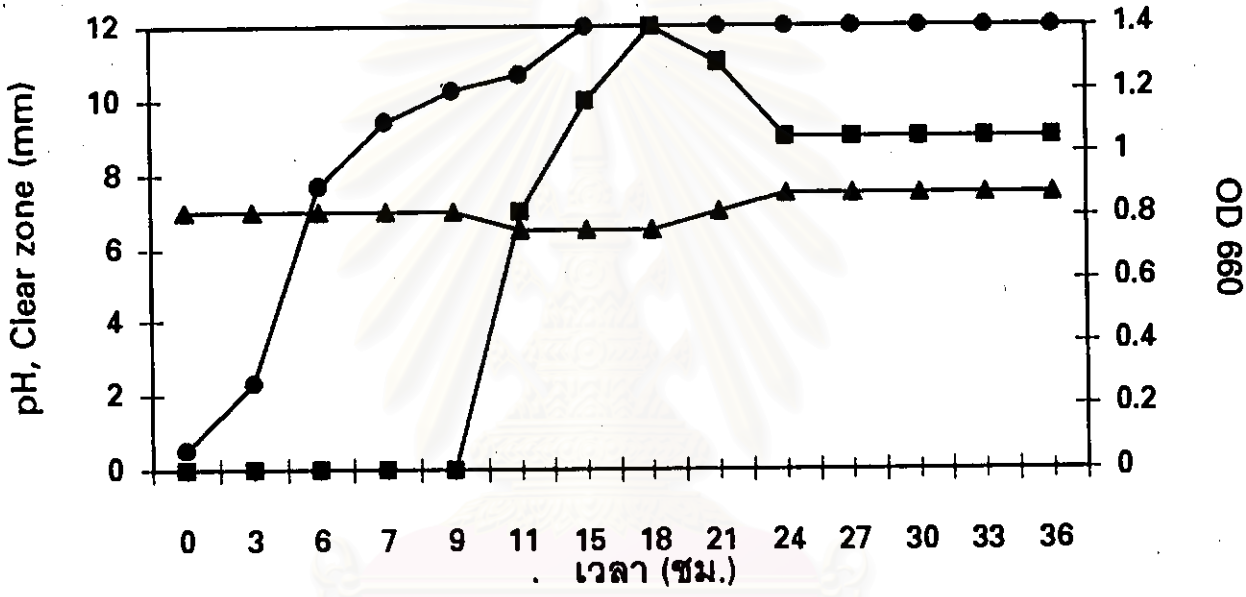
ก. *V. harveyi* ข. *V. parahaemolyticus* ค. *V. cholera*

กลุ่มควบคุม (--■--) เติมส่วนน้ำใสของ *Bacillus* S11 (--▲--)

ตารางที่ 7 การเปรียบเทียบเวลาการแบ่งตัวเป็น 2 เท่าของเชื้อทดสอบ เมื่อใช้ส่วนน้ำใสของ *Bacillus* S11

เชื้อทดสอบ	เวลาการเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่า (ชม.)	
	กลุ่มควบคุม	ส่วนน้ำใส *Bacillus* S11
Bacillus cereus	3.65	15.75
Bacillus subtilis	4.17	8.07
Bacillus megaterium	5.90	7.00
Listeria monocytogenes	5.00	43.30
Staphylococcus aureus	8.15	27.70
Aeromonas hydrophila	3.19	5.60
Pseudomonas aeruginosa	3.30	3.42
Escherichia coli	3.70	3.85
Vibrio alginolyticus	5.05	6.35
Vibrio anguillarum	5.33	6.78
Vibrio harveyi	4.77	6.92
Vibrio parahaemolyticus	5.92	6.02
Vibrio cholera	4.90	5.05

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 8 ความสัมพันธ์ระหว่างการสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ของ *Bacillus* S11 ต่อการเจริญของ *B. cereus* และการเปลี่ยนแปลงพีเอช ในระหว่างการเจริญของ *Bacillus* S11

การเจริญ (--●--) บริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น (--■--) พีเอช (--▲--)

ตารางที่ 8 ทดสอบการสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ของ *Bacillus* S11 โดยแปรผันชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อและอุณหภูมิ

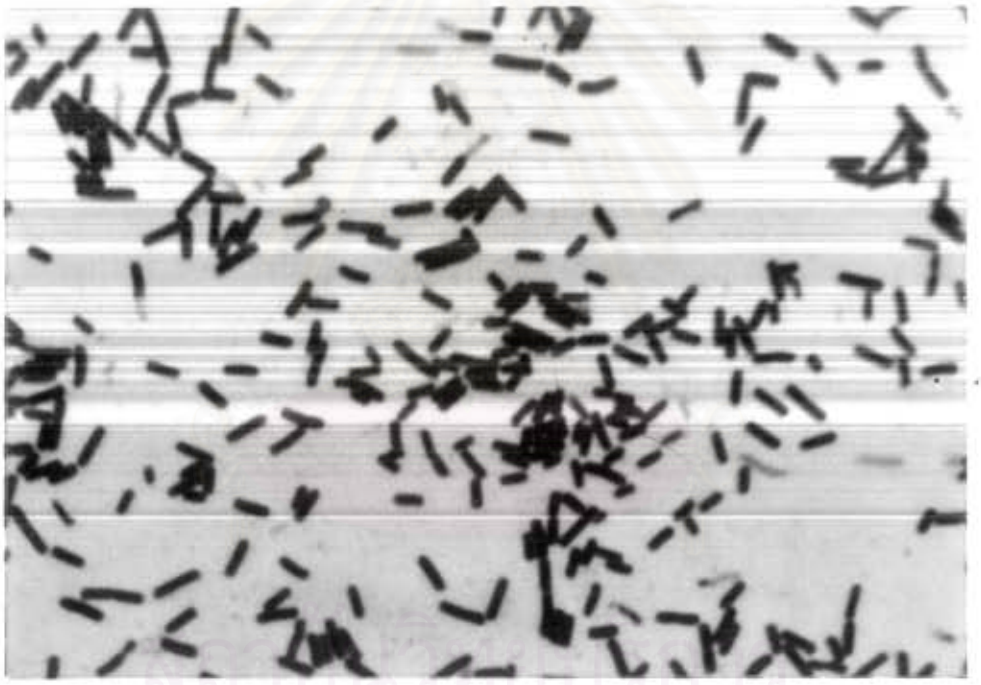
อาหารเลี้ยงเชื้อ	อุณหภูมิ (°ซ)	ความกว้างของบริเวณยับยั้ง (มม.)
MRS lactobacilli broth	28	10.0
Brain heart infusion broth	28	10.0
Nutrient broth	28	8.0
Typtic soy broth	28	10.0
Typtic soy broth	20	4.0
Typtic soy broth	30	10.0
Typtic soy broth	37	4.0
Typtic soy broth	อุณหภูมิห้อง (25 °ซ)	10.0
Typtic soy broth	อุณหภูมิห้อง (ไม่เขย่า)	0.0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตรวจสอบสมบัติ และรูปร่างลักษณะของ *Bacillus* S11

Bacillus S11 เมื่อนำมาตรวจสอบสมบัติ รูปร่างลักษณะพบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน สร้างสปอร์ จัดอยู่ในกลุ่มของ *Bacillus* sp. แสดงในรูปที่ 9 และเมื่อทดสอบทางชีวเคมีเพื่อนำมาจัดจำแนกสปีชีส์โดยยึดหลักการจัดจำแนกตาม Bergey's Mannual of Systematic Bacteriology (Sneath และคณะ, 1986) สามารถจำแนกได้เป็น *Bacillus mycoides* ผลการทดสอบแสดงในตารางที่ 9 การทดสอบใช้ *B. subtilis* TISTR 1 และ *B. cereus* TISTR 4 เป็นแบคทีเรียควบคุมได้ผลการทดสอบเหมือนกับ Bergey's Mannual of Systematic Bacteriology (Sneath และคณะ, 1986)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



I--I 5 µm

รูปที่ 9 การติดสีแกรมของ *Bacillus* S11 อายุ 24 ชม.ถ่ายจากกล้อง Nikon รุ่น M-35S กำลังขยาย 1000 เท่า

ตารางที่ 9 ลักษณะการเจริญและการทดสอบทางชีวเคมีของ *Bacillus* S11

ลักษณะที่ทดสอบ	ผลการทดสอบ
A. Culture charcteristics	
Form	irregular
Elevation	flat
Edge	undulate
Surface	ruguse
Optical	opaque
Consistency	brittle
NA slant	beaded
NB growth	ring
Sediment	flaky
B. Morphological characteristics	
Gram's stain	+
Rod	+
Pleomorphic	-
Spore	+
Motile	-
C. Physiological characteristics	
O-F test	Oxidation
Catalase test	+
Oxidase test	-
Indole test	-
Methyl red test	-
Voges proskauer test	+
Urease test	+
Nitrate test	+
Citrate test	+
Gelatin test	-
H_2S test	-

ตารางที่ 9 (ต่อ)

Casein test	+
Amylase test	+
Lipase test	+
Egg yolk reaction	+
Haemolysin test	+ (β -haemolysis)
Nuclease test	-
Glucose	+
Dextrose	+
Arabinose	-
Mannose	+
Maltose	+
Mannitol	-
Lactose	-
Sucrose	+
xylose	-
Ribose	-
NaCl 0%	+
1%	+
2%	+
3%	+
4%	+
5%	+
6%	+
7%	+
8%	+
9%	-
10%	-

ตารางที่ 9 (ต่อ)

Temperature	4 °C	-
	20 °C	+
	28 °C	+
	30 °C	+
	37 °C	+
	55 °C	-
pH	4	-
	5	+
	6	+
	7	+
	8	+
	9	-
	10	-
	11	-
	12	-

หมายเหตุ

- = Negative, + = Positive

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Bacillus S11 ที่มีสมบัติเป็นโพรไบโอติกมาผสมในอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำ และเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำเป็นเวลา 100 วัน

การนำ *Bacillus* S11 มาใช้ผสมในอาหารกุ้งกุลาดำ ได้แบ่งการทดลองเป็น 4 กลุ่มการทดลอง (แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ) คือ

1. กลุ่มควบคุม (Control) คือ กลุ่มที่ให้แต่อาหารกุ้งกุลาดำสำเร็จรูปโดยไม่ผสมเซลล์ *Bacillus* S11

2. กลุ่มที่ใช้เซลล์ของ *Bacillus* S11 (Fresh cells) ผสมกับอาหารกุ้งกุลาดำ

3. กลุ่มที่ใช้เซลล์ของ *Bacillus* S11 ละลายใน 0.85% NaCl (Fresh cells in NSS) และให้อาหารกุ้งกุลาดำ

4. กลุ่มที่ใช้เซลล์ของ *Bacillus* S11 ในรูปผงแห้ง (Lyophilized cells) ผสมกับอาหารกุ้งกุลาดำ

ก่อนเริ่มต้นการทดลองได้ตรวจสอบแบคทีเรียทั้งหมดที่มีอยู่ในอาหารกุ้งกุลาดำสำเร็จรูป พบว่ามีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด 2.0×10^{2} cfu/g เมื่อตรวจสอบสมบัติและรูปร่างพบว่าเป็นกลุ่มของ *Bacillus* spp. และได้ตรวจสอบจำนวน *Bacillus* S11 ทั้งหมดที่อยู่ในรูป Fresh cells, Fresh cells in NSS, Lyophilized cells มีจำนวน *Bacillus* S11 เท่ากับ 3.0×10^{13} cfu/g, 3.4×10^{10} cfu/ml และ 5.0×10^{12} cfu/g ตามลำดับ เมื่อนำ *Bacillus* S11 มาผสมในอาหารกุ้งกุลาดำ และตรวจสอบจำนวน *Bacillus* S11 ทั้งหมดในอัตราส่วนต่างๆ ระหว่างจำนวน *Bacillus* S11 ต่ออาหารกุ้งกุลาดำในหน่วยกรัม แสดงผลในตารางที่ 10

กุ้งกุลาดำที่นำมาเลี้ยงมีน้ำหนักประมาณ 0.7-0.8 กรัม เลี้ยงในระบบน้ำหมุนเวียนแบบปิดตลอดการทดลองและให้อาหารวันละ 3 เวลาคือเวลา 8.00 น. 12.00 น. และ 18.00 น. ปริมาณที่ให้ต่อวันเท่ากับ 10% ของน้ำหนักตัวกุ้ง เก็บตัวอย่างทุกๆ 21 วัน โดยศึกษาผลดังนี้

- น้ำหนักตัวกุ้งกุลาดำ ความยาวกุ้งกุลาดำ อัตราการรอด แสดงผลในรูปที่ 10 แสดงสภาพของกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสม *Bacillus* S11 เทียบกับกลุ่ม Control ในรูปที่ 11 เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* S11 ที่มีสมบัติเป็นโพรไบโอติกในอาหารกุ้งกุลาดำโดยใช้ ANOVA Test ระดับนัยสำคัญ 0.05 พบว่ากลุ่มควบคุมมีอัตราการเจริญเติบโตต่อ 21 วันเท่ากับ 0.73 กรัม ส่วนกลุ่มที่ใช้ *Bacillus* S11 ผสมอาหารในรูป Fresh cells, Fresh cells in NSS, Lyophilized cells มีอัตราการเจริญเติบโตเท่ากับ 1.29, 1.17 และ 1.16 กรัม ตามลำดับ (ข้อมูลแสดงในภาคผนวก จ ข้อ 1) และใช้ Duncan's multiple range test ระดับนัยสำคัญ 0.05 พบว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ใช้เซลล์ของ - *Bacillus* S11 ผสมในอาหารกุ้งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และกลุ่มที่ใช้เซลล์ *Bacillus* S11 ผสมในอาหารกุ้งในรูปแบบต่างๆ

เมื่อทดสอบทางสถิติไม่มีความแตกต่างกันในระหว่างกลุ่มทดลองที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 (ข้อมูลแสดงในภาคผนวก จ ข้อ 2, 3, 4)

- จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด *Bacillus* S11 และ *Vibrio* sp. ในน้ำเลี้ยงกุ้งโดยวิธี Total plate counts (cfu/ml) แสดงผลในรูปที่ 12 (ข้อมูลแสดงในภาคผนวก จ ข้อ 5)

- จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด *Bacillus* S11 และ *Vibrio* sp. จากลำตัวกุ้งโดยวิธี Total plate counts (cfu/g) แสดงผลในรูปที่ 13 (ข้อมูลแสดงในภาคผนวก จ ข้อ 6)

- จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด *Bacillus* S11 และ *Vibrio* sp. ในทางเดินอาหารกุ้งโดยวิธี Total plate counts (cfu/g) แสดงผลในรูปที่ 14 (ข้อมูลแสดงในภาคผนวก จ ข้อ 7)

- จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด *Bacillus* S11 และ *Vibrio* sp. ในขี้กุ้งโดยวิธี Total plate counts (cfu/g) แสดงผลในรูปที่ 15 (ข้อมูลแสดงในภาคผนวก จ ข้อ 8)

นำแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำ ลำตัว ทางเดินอาหาร และขี้กุ้งมาทดสอบสมบัติ รูปร่างลักษณะจัดได้อยู่ในกลุ่มของ *Vibrio* sp., *Aeromonas* sp., *Staphylococcus* sp., *Bacillus* sp. สายพันธุ์ที่แตกต่างจาก *Bacillus* S11 และ *Bacillus* S11 ที่ใช้ในการทดลอง ต่อมาได้นำ *Bacillus* S11 ที่แยกได้จากทางเดินอาหาร และขี้กุ้งมาทดสอบสมบัติ รูปร่างลักษณะ ทดสอบทางชีวเคมี และนำมาตรวจสอบการสร้างสารยับยั้งต่อเชื้อทดสอบพบว่าเป็น *Bacillus* S11 สายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองและมีสมบัติที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้เหมือนเดิมทุกประการ

ตรวจสอบคุณภาพน้ำระหว่างการเลี้ยงกุลาดำทุกสัปดาห์ตลอดการทดลองดังนี้

- ค่าพีเอช มีค่าระหว่าง 7.9-8.2
- ค่าออกซิเจนที่ละลายน้ำ มีค่าระหว่าง 5-6 มิลลิกรัมต่อลิตร
- อุณหภูมิ อยู่ในช่วง 26-27 องศาเซลเซียส
- ความเค็ม เท่ากับ 20 ส่วนในพันส่วน
- แอมโมเนียม มีค่าระหว่าง 0-0.5 มิลลิกรัมต่ อลิตร
- ไนไตรท์ มีค่าระหว่าง 0-2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ไนเตรท มีค่าระหว่าง 0-1.2 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ฟอสเฟต มีค่าระหว่าง 2-3 มิลลิกรัมต่อลิตร

พีเอช ค่าออกซิเจนที่ละลายน้ำ อุณหภูมิ ความเค็ม แสดงผลในรูปที่ 16 (ข้อมูลแสดงในภาคผนวก จ ข้อ 9)

แอมโมเนียม ไนไตรท์ ไนเตรท ฟอสเฟต แสดงผลในรูปที่ 17 (ข้อมูลแสดงในภาคผนวก จ ข้อ 10)

การทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค (Challenge test)

หลังจากการเลี้ยงกุ้งกุลาดำเป็นเวลา 100 วัน นำจำนวนกุ้งที่เหลือจากแต่ละการทดลองมาทดสอบความต้านทานต่อการเกิดโรคจาก *V. harveyi* โดยวิธีการแช่และเก็บผลทุก 2 วันดังนี้

- อัตราการรอด แสดงผลในรูปที่ 18 เมื่อทดสอบอัตราการรอดระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ใช้ *Bacillus* S11 ผสมในอาหารกุ้ง โดยใช้ Duncan's multiple range test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ข้อมูลแสดงในภาคผนวก จ ข้อ 11)

- จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด *Bacillus* S11 และ *V. harveyi* ในน้ำเลี้ยงกุ้ง โดยวิธี Total plate counts (cfu/ml) แสดงผลในรูปที่ 19 (ข้อมูลแสดงในภาคผนวก จ ข้อ 12)

- จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด *Bacillus* S11 และ *V. harveyi* ในทางเดินอาหารกุ้ง โดยวิธี Total plate counts (cfu/g) แสดงผลในรูปที่ 20 (ข้อมูลแสดงในภาคผนวก จ ข้อ 13)

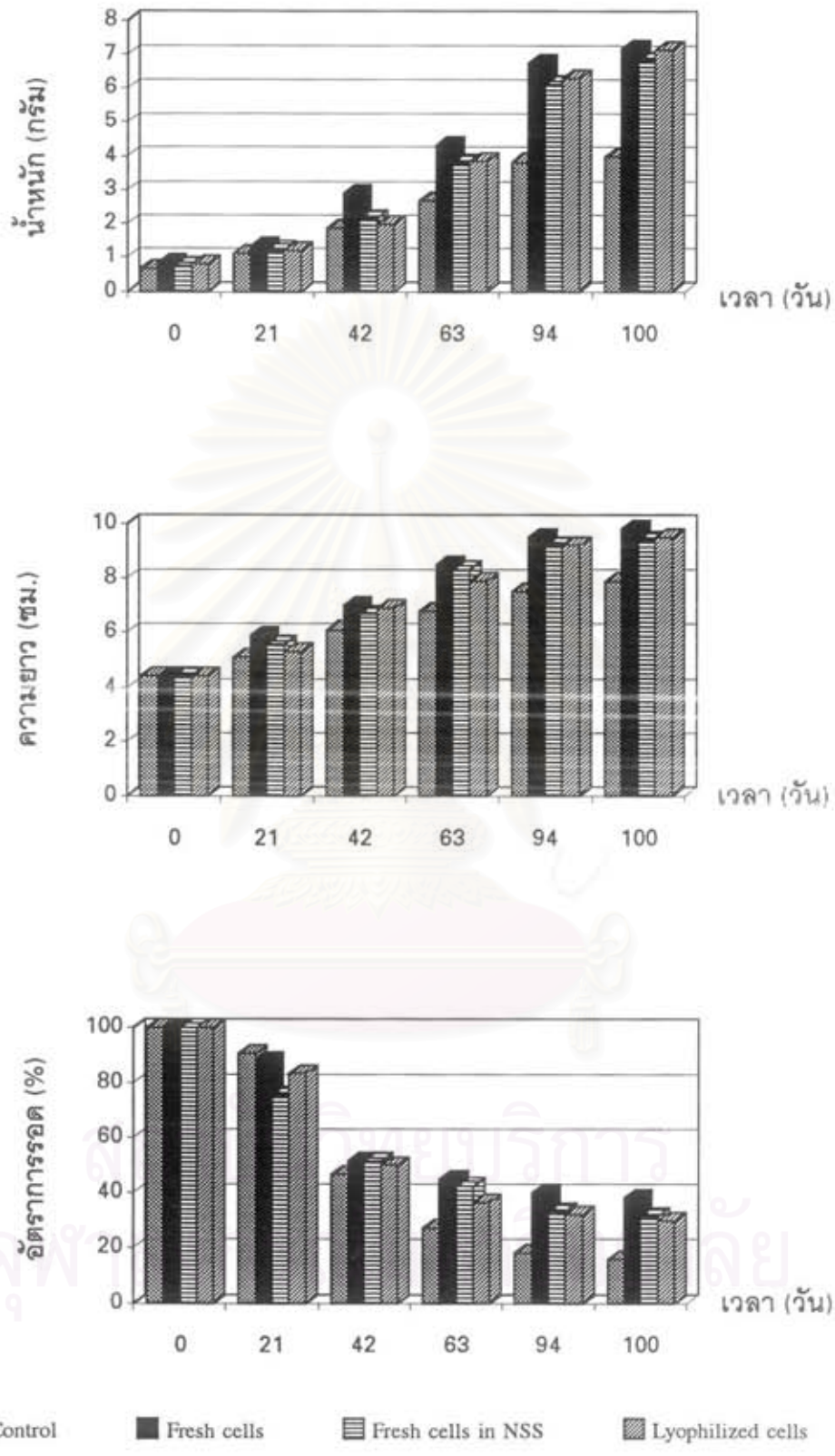
นำ *Vibrio* sp. ที่แยกได้จากน้ำและทางเดินอาหารมาตรวจสอบสมบัติ รูปร่างและทดสอบทางชีวเคมีเพื่อยืนยันว่าเป็น *V. harveyi* ที่ใส่ลงไปเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดโรค โดยผลเทียบกับ *V. harveyi* สายพันธุ์ D331 จากศูนย์ค้นคว้าวิจัยการเลี้ยงกุ้งเครือเจริญโภคภัณฑ์ พบว่าได้ผลเหมือนกัน แสดงในตารางที่ 11 และนำกุ้งกุลาดำที่ตายมาตรวจสอบลักษณะภายนอก พบว่ากุ้งที่ติดเชื้อจะมีอาการอ่อนเพลีย ไม่กินอาหารหรือกินอาหารน้อยลง จะว่ายน้ำอยู่บริเวณผิวน้ำ ตัวกุ้งจะเริ่มมีสีแดงและเมื่อเวลากลางคืนจะสังเกตเห็นลักษณะเรืองแสงจากตัวกุ้ง กล้ามเนื้อจะเริ่มเป็นแผล บริเวณตับจะมีสีคล้ำและมีขนาดเล็กกว่ากุ้งปกติ แสดงในรูปที่ 21

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

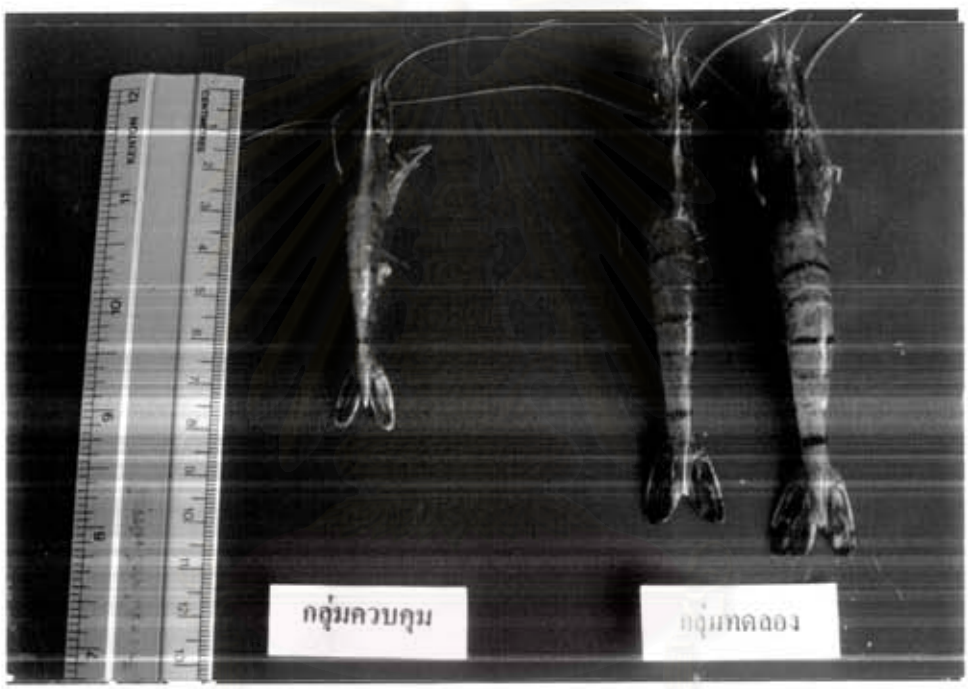
ตารางที่ 10 จำนวน *Bacillus* S11 ทั้งหมดที่ผสมในอาหารกุ้งกุลาดำ

ลักษณะอาหาร	จำนวน *Bacillus* S11 ในอาหารกุ้งกุลาดำ (cfu/g)			
	อัตราส่วน 1:1	อัตราส่วน 1:2	อัตราส่วน 1:3	อัตราส่วน 1:4
อาหารกุ้งกุลาดำที่ไม่ได้ผสม *Bacillus* S11	-	-	-	-
อาหารกุ้งกุลาดำที่ผสม *Bacillus* S11 ในรูป Fresh cells	3.3×10^{10}	4.8×10^{10}	3.0×10^{10}	2.3×10^{8}
อาหารกุ้งกุลาดำ + *Bacillus* S11 ในรูป Fresh cells in NSS	3.4×10^{10}	3.4×10^{10}	3.4×10^{10}	1.3×10^{8}
อาหารกุ้งกุลาดำที่ผสม *Bacillus* S11 ในรูป Lyophilized cells	3.6×10^{10}	6.6×10^{10}	1.1×10^{10}	2.8×10^{9}

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

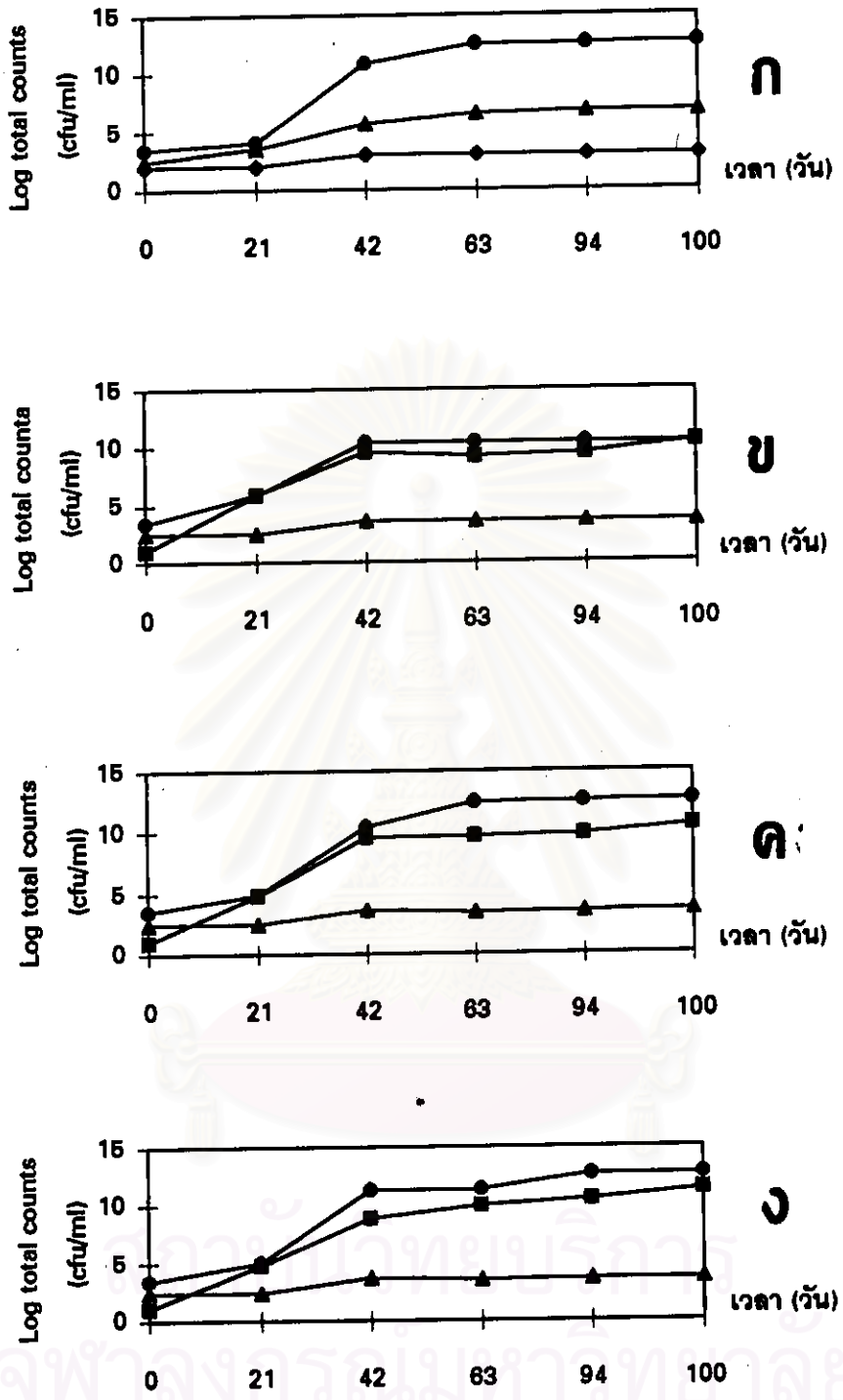


รูปที่ 10 น้ำหนัก ความยาว อัตราการรอดของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ผสม *Bacillus* S11 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเป็นระยะเวลา 100 วัน



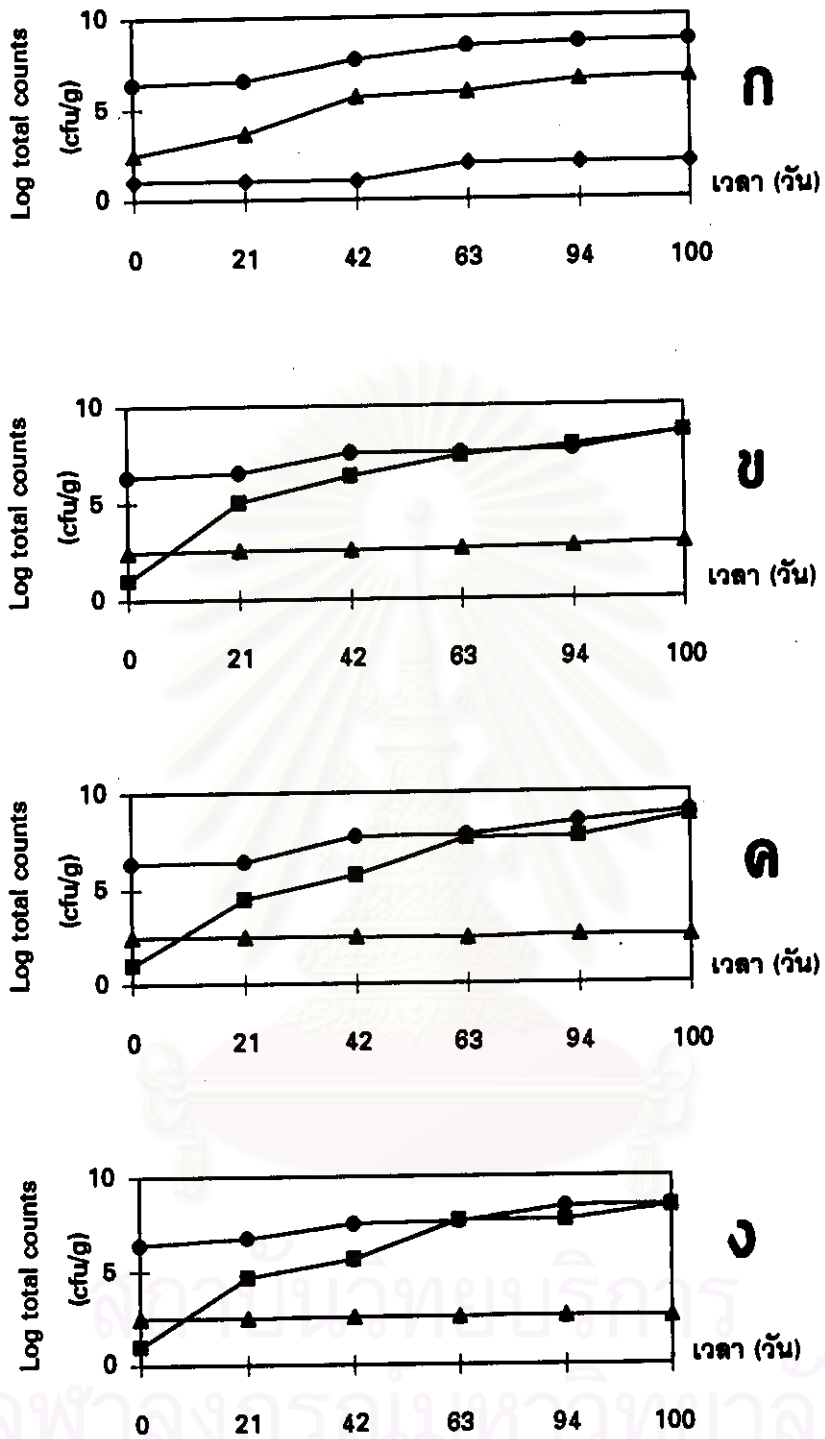
รูปที่ 11 สภาพของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ผสม *Bacillus* S11 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเป็นระยะเวลา 100 วัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



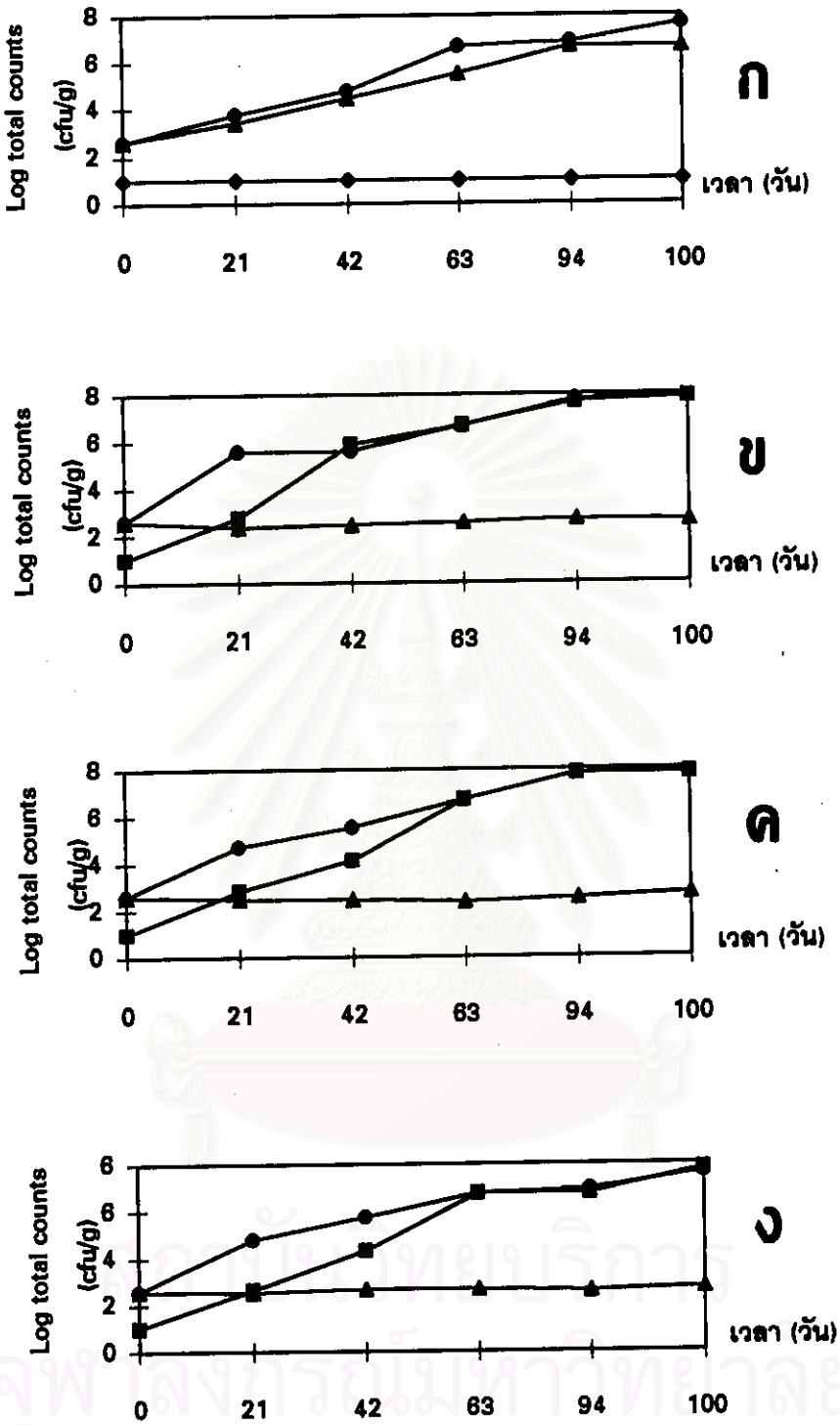
รูปที่ 12 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (--●--) *Bacillus* S11 (--■--) *Vibrio* sp. (--▲--) *Bacillus* sp. (--♦--) ที่นับได้ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ระยะเวลา 100 วัน ในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่เติม *Bacillus* S11

ก. Control ข. Fresh cells ค. Fresh cells in NSS ง. Lyophilized cells



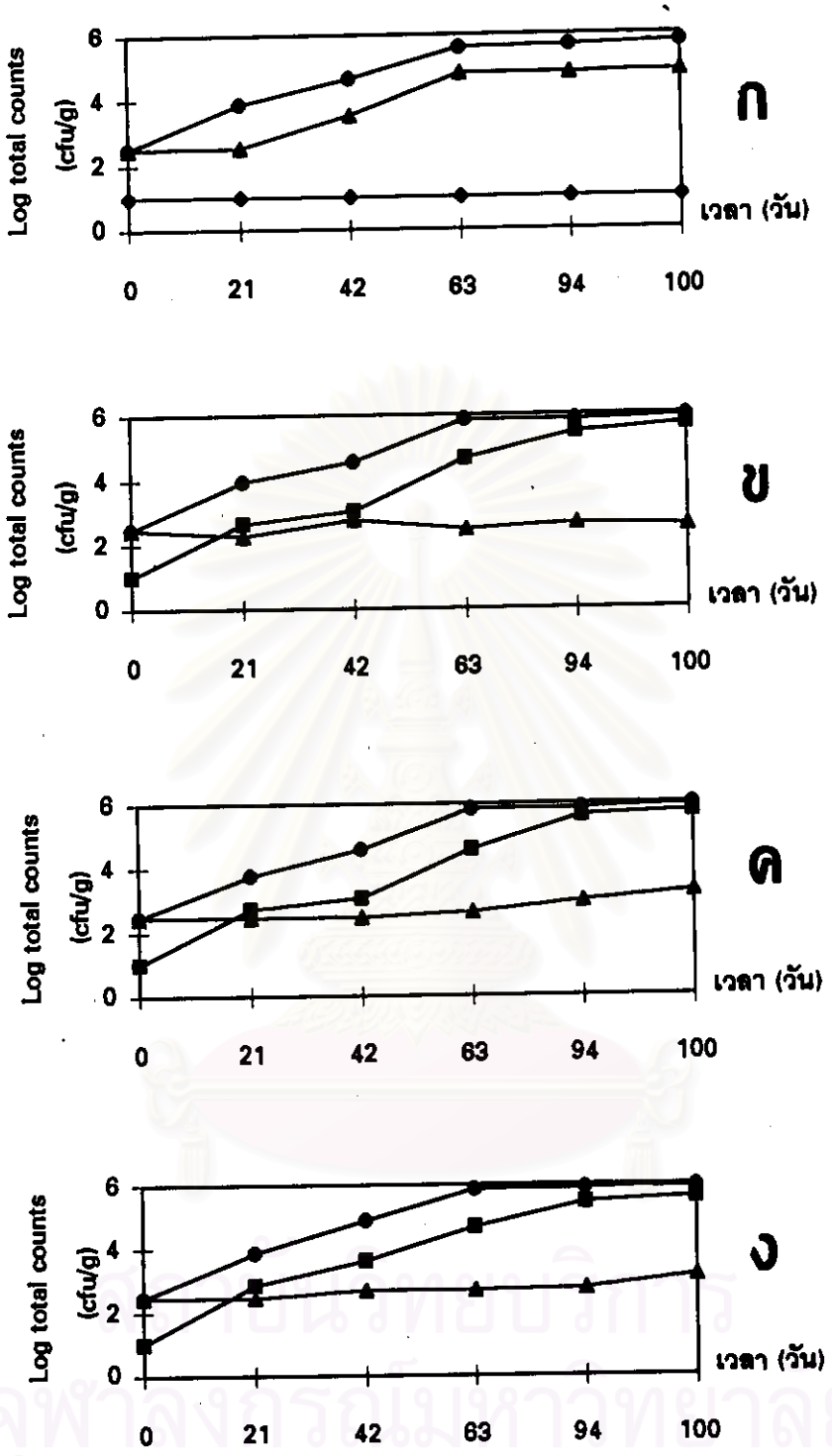
รูปที่ 13 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (--●--) *Bacillus* S11 (--■--) *Vibrio* sp. (--▲--) *Bacillus* sp. (--♦--) ที่นับได้จากลำตัวกุ้งกุลาดำ ระยะเวลา 100 วัน จากกุ้งกุลาดำต่างปอที่เติม *Bacillus* S11

ก. Control ข. Fresh cells ค. Fresh cells in NSS ง. Lyophilized cells



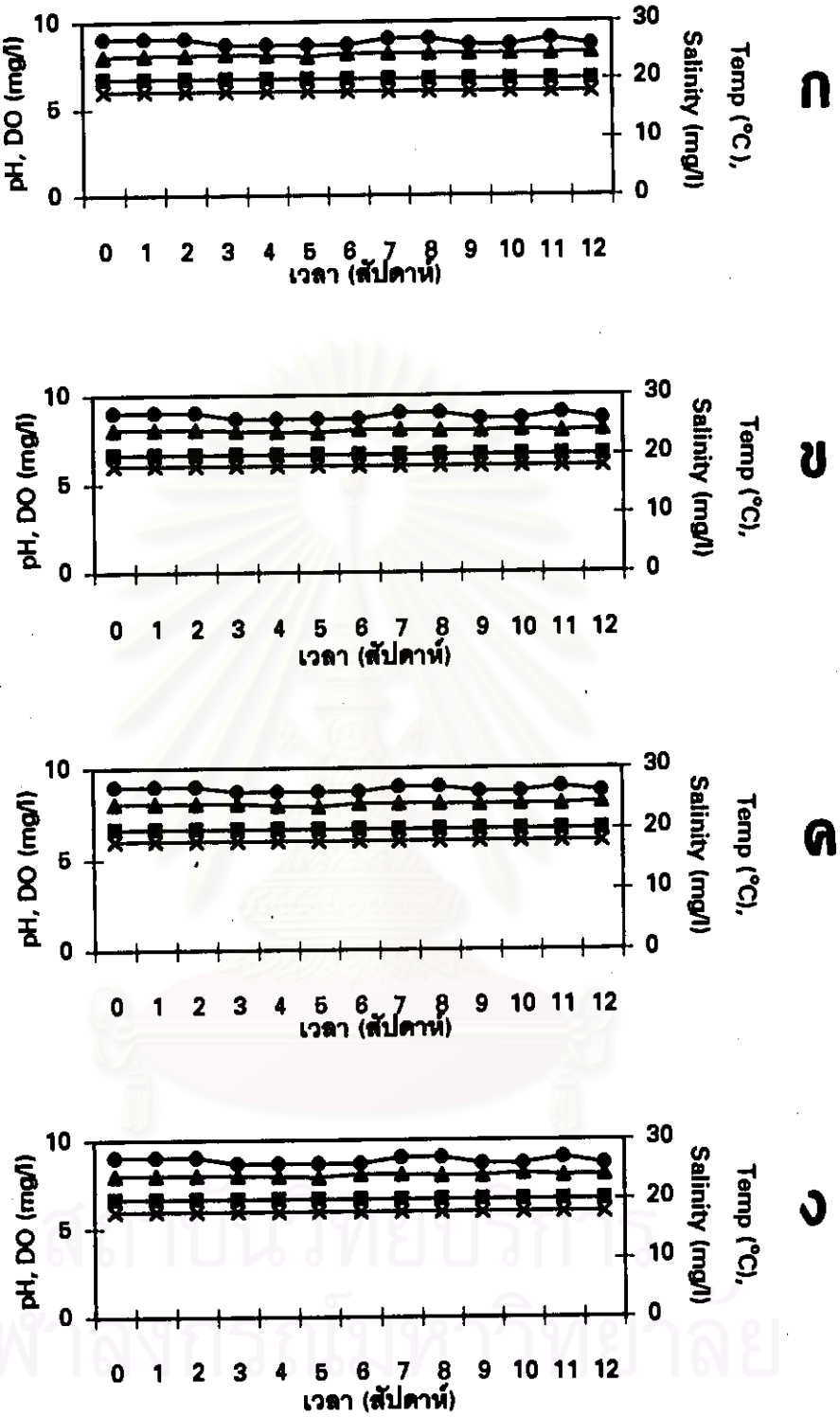
รูปที่ 14 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (--●--) *Bacillus* S11 (--■--) *Vibrio* sp. (--▲--) *Bacillus* sp. (--♦--) ที่นับได้ในทางเดินอาหารกุ้งกุลาดำ ระยะเวลา 100 วัน จากกุ้งกุลาดำต่างบ่อที่เติม *Bacillus* S11

ก. Control ข. Fresh cells ค. Fresh cells in NSS ง. Lyophilized cells



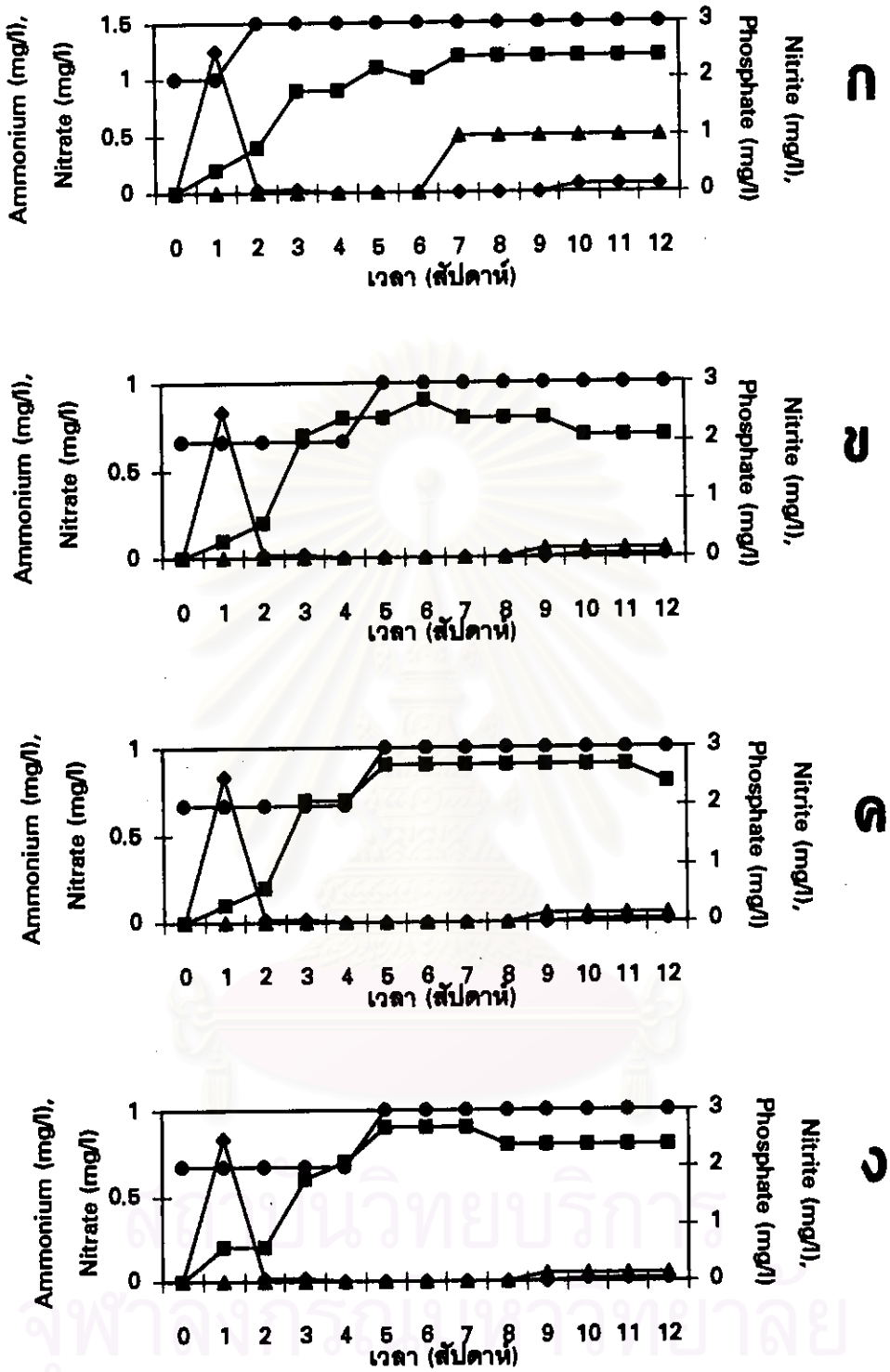
รูปที่ 15 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (--●--) *Bacillus* S11 (--■--) *Vibrio* sp. (--▲--) *Bacillus* sp. (--♦--) ที่นับได้ในขี้กุ้งกุลาดำ ระยะเวลา 100 วัน จากกุ้งกุลาดำต่างบ่อที่เติม *Bacillus* S11

ก. Control ข. Fresh cells ค. Fresh cells in NSS ง. Lyophilized cells



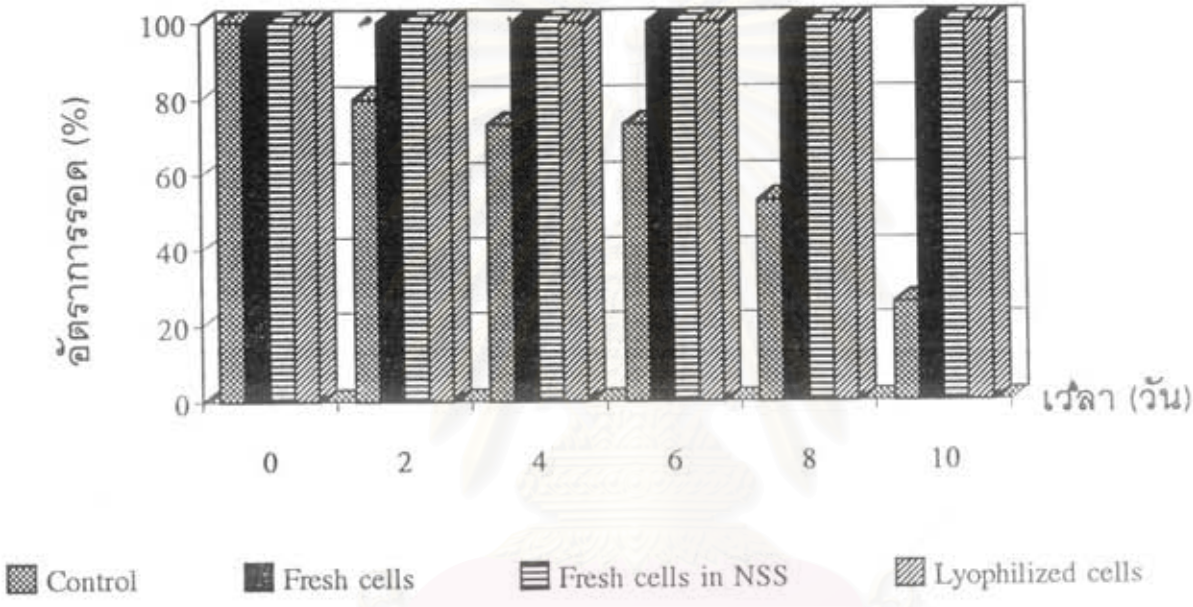
รูปที่ 16 พีเอช (--▲--) ค่าออกซิเจนละลายในน้ำ (--x--) อุณหภูมิ (--●--) ความเค็ม (--■--) ที่วัดได้ระหว่างการเลี้ยงกุ้งกุลาดำเป็นระยะเวลา 100 วัน ในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่เติม *Bacillus* S11

ก. Control ข. Fresh cells ค. Fresh cells in NSS ง. Lyophilized cells



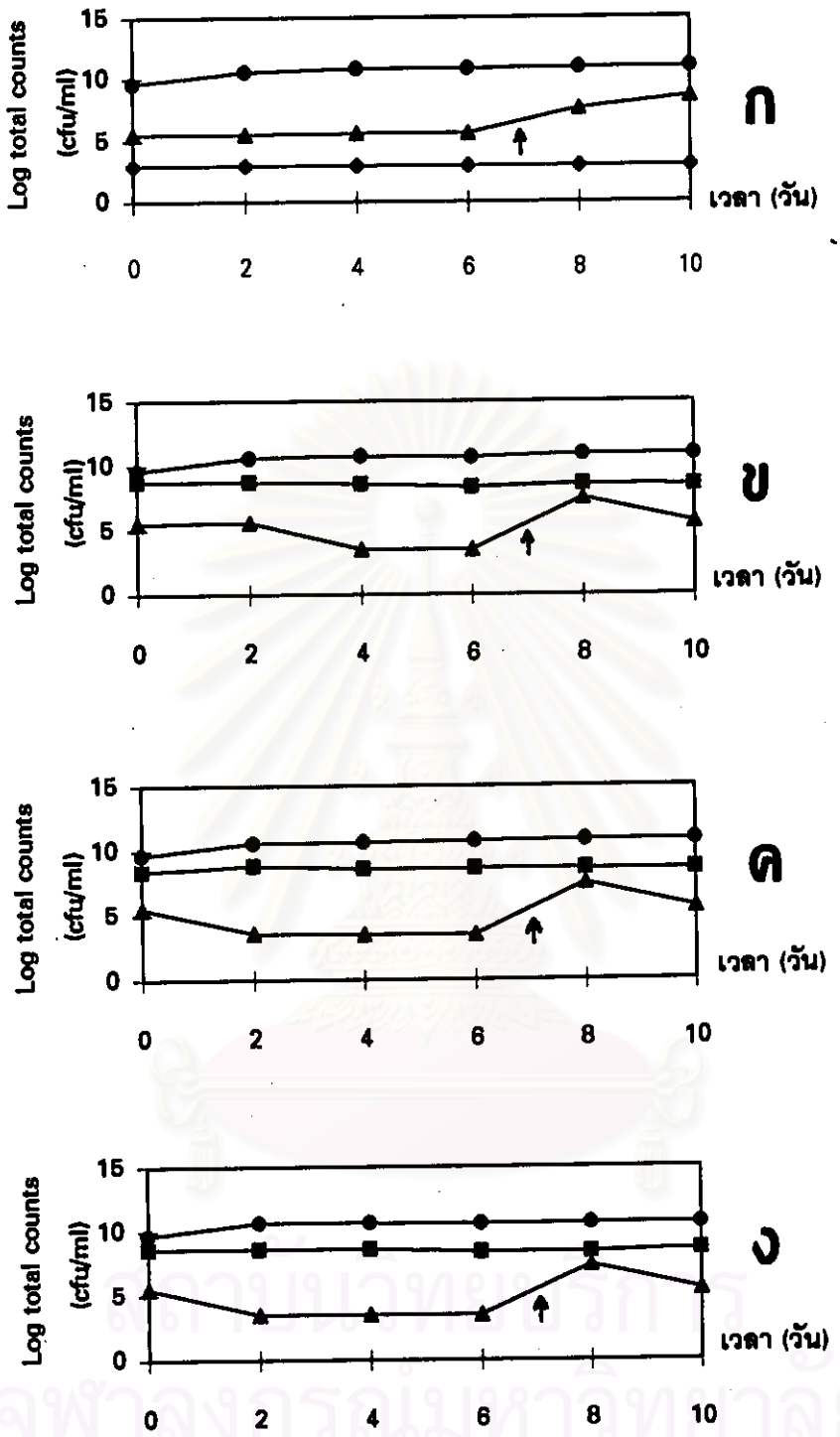
รูปที่ 17 แอมโมเนียม (--▲--) ไนไตรท์ (--✦--) ไนเตรท (--■--) ฟอสเฟต (--●--) ที่วัดได้ระหว่างการเลี้ยงกุ้งกุลาดำเป็นระยะเวลา 100 วัน ในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่เติม *Bacillus* S11

ก. Control ข. Fresh cells ค. Fresh cells in NSS ง. Lyophilized cells

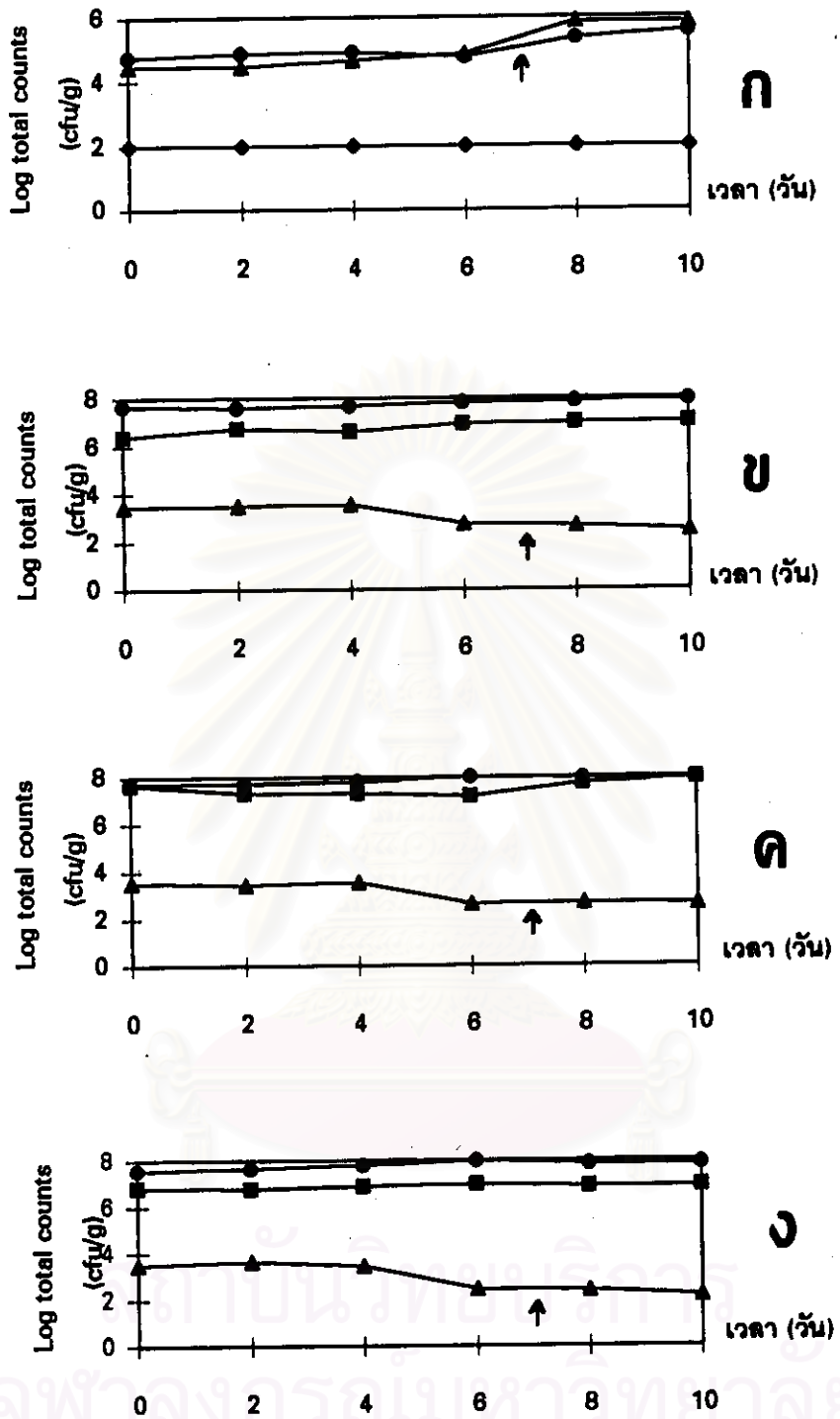


รูปที่ 18 อัตราการรอดของกุ้งกุลาดำ ระหว่างการทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคจาก *V. harveyi* ระยะเวลา 10 วัน ในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่เติม *Bacillus* S11

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 19 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (--●--) *Bacillus* S11 (--■--) *V. harveyi* (--▲--) *Bacillus* sp. (--♦--) ที่นับได้ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ระหว่างการทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคจาก *V. harveyi* ระยะเวลา 10 วัน ในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่เติม *Bacillus* S11 (↑ เติม *V. harveyi* 3.0×10^7 cfu/ml)
ก. Control ข. Fresh cells ค. Fresh cells in NSS ง. Lyophilized cells

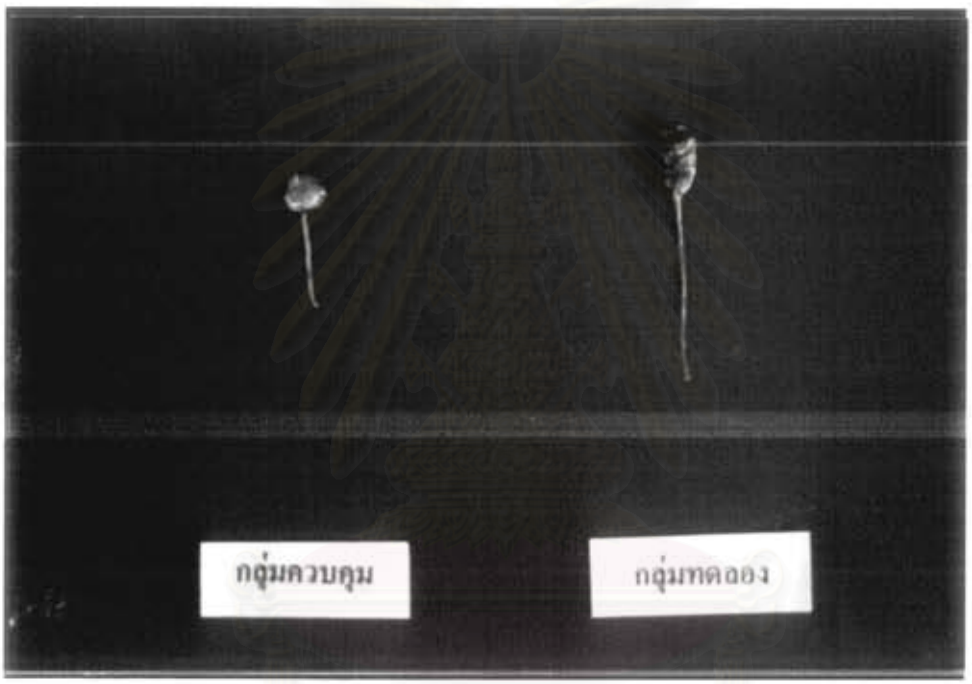


รูปที่ 20 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (--●--) *Bacillus* S11 (--■--) *V. harveyi* (--▲--) *Bacillus* sp. (--♦--) ที่นับได้ในทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำ ระหว่างการทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคจาก *V. harveyi* ระยะเวลา 10 วัน จากกุ้งกุลาดำ ต่างปอที่เติม *Bacillus* S11 (↑ เติม *V. harveyi* 3.0x10^7 cfu/ml)
ก. Control ข. Fresh cells ค. Fresh cells in NSS ง. Lyophilized cells

ตารางที่ 11 ลักษณะการเจริญ และการทดสอบทางชีวเคมีของ *Vibrio* sp. ที่แยกได้ระหว่างการทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคจาก *V. harveyi* ระยะเวลา 10 วัน เทียบกับ *V. harveyi* D331

ลักษณะที่ทดสอบ	*V. harveyi* D331	*Vibrio* sp.
Gram's stain	-	-
Rod	+	+
Growth on TCBS	Green	Green
Pleomorphic	-	-
Spore	-	-
Motile	+	+
Pigment production	-	-
O-F test	Fermentation	Fermentation
Catalase test	+	+
Oxidase test	+	+
Indole test	+	+
Voges proskauer test	-	-
Nitrate test	+	+
Citrate test	-	-
Gelatin test	-	-
Arabinose	-	-
Glucose	-	-
Lactose	-	-
Mannitol	+	+
Sucrose	-	-
NaCl 0%	-	-
2%	+	+
4%	+	+
6%	+	+
10%	-	-

หมายเหตุ - = Negative, + = Positive



รูปที่ 21 สภาพทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ผสม *Bacillus* S11 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ระหว่างการทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคจาก *V. harveyi* ระยะเวลา 10 วัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย