บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

Bacillus subtilis P11 (BSP11) เป็นแบคทีเรียที่ได้รับการทดสอบแล้วว่ามีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกที่ดี คัดแยกจากทางเดินอาหารของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่ได้จากทะเลใน จังหวัดชลบุรี และ จังหวัด.ตรัง โดย ศิริเพ็ญ สังข์ชัย (2546) เมื่อทำการทดลองในระดับขยายส่วนเพื่อเลี้ยงกุ้งในระดับภาคสนาม ในการเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 1 ใช้กุ้งกุลาดำระยะโพสลาวา 30 จากจังหวัดชลบุรี ในบ่อปิดด้วยกระชัง แบ่งการทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มควบคุม (control) ให้อาหารกุ้งกุลาดำสำเร็จรูปไม่ผสมเซลล์สด *B. subtilis* P11 และกลุ่มโพรไบโอติก (probiotic) ให้อาหารกุ้งกุลาดำสำเร็จรูปผสมเซลล์สด *B. subtilis* P11 3 มื้อทุกวัน โดยเลี้ยงในกระชังตามรูปในภาคผนวก จ. ผลการทดลองพบว่ากุ้งกลุ่มโพรไบโอติกมีอัตราการเจริญเติบโตมากกว่ากุ้งกลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) (รูปที่ 7) ส่วนการรอดชีวิตของกุ้งหลังจากทำการเลี้ยงครบ 120 วันพบว่า กุ้งกลุ่มโพรไบโอติกและกลุ่มควบคุมมีอัตราการรอดชีวิตใกล้เคียงกันคือ 51.93% และ 48.13% ตามลำดับ(รูปที่ 8)

การเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 2 ใช้กุ้งกุลาดำระยะโพสลาวา 50 จากจังหวัดชลบุรี ในบ่อปิดด้วยกระชัง แบ่งการทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มควบคุม (control) ให้อาหารกุ้งกุลาดำสำเร็จรูปไม่ผสมเซลล์สด *B. subtilis* P11 และกลุ่มโพรไบโอติก (probiotic) ให้อาหารกุ้งกุลาดำสำเร็จรูปผสมเซลล์สด *B. subtilis* P11 3 มื้อทุกวัน โดยเลี้ยงในกระชังตามรูปในภาคผนวก ฉ. ผลการทดลองพบว่ากุ้งกลุ่มโพรไบโอติกมีอัตราการเจริญเติบโตมากกว่ากุ้งกลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) (รูปที่ 14) ส่วนการรอดชีวิตของกุ้งหลังจากทำการเลี้ยงครบ 80 วันพบว่า กุ้งกลุ่มโพรไบโอติกและกลุ่มควบคุมมีอัตราการรอดชีวิตใกล้เคียงกันคือ 72.80% และ 73.00% ตามลำดับ (รูปที่ 15)

การทดลองทั้ง 2 ครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าโพรไบโอติก *B.subtilis* P11 นี้ให้ผลดีในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของกุ้งโดยไม่มีผลต่ออัตราการรอดชีวิตของกุ้ง

ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงกุ้งทั้ง 2 ครั้ง ในน้ำเลี้ยงกุ้งตรวจพบปริมาณแบคทีเรียรวมอยู่ในช่วง 2.3 – 3.92 Log CFU/ml และ *Vibrio spp.* อยู่ในช่วง ND - 2.93 Log CFU/ml (ตารางที่ 4, 8) ในดินตะกอนบ่อเลี้ยงกุ้งตรวจพบปริมาณแบคทีเรีย 3.92 – 6.88 Log CFU/ml และ *Vibrio* spp. อยู่ในช่วง 2.17 - 3.86 Log CFU/ml (ตารางที่ 5, 9) ส่วนในลำไส้กุ้งพบปริมาณแบคทีเรียอยู่

ในช่วง 6.49 – 8.68 Log CFU/ml และและ *Vibrio spp.* อยู่ในช่วง 2.70 – 4.73 Log CFU/ml (ตารางที่ 6, 10) สอดคล้องกับ Lavilla-Pitogo, Leano และ Paner (1998) ที่รายงานว่ามีจุลินทรีย์ในน้ำอยู่ในช่วง 2 – 4 Log CFU/ml และ *Vibrio spp.* อยู่ในช่วง 1 - 3 Log CFU/ml และในดินตะกอนบ่อเลี้ยงกุ้งตรวจพบปริมาณแบคทีเรีย 4.63 – 5.57 Log CFU/ml และ *Vibrio spp.* อยู่ในช่วง 2.70 – 3.98 Log CFU/ml

จากการทดลองยังสามารถตรวจพบโพรไบโอติก *B. subtilis* P11 ได้ทั้งในน้ำเลี้ยงกุ้ง, ดินตะกอนบ่อเลี้ยงกุ้ง และในลำไส้กุ้ง โดยพบในปริมาณ 2.64 – 3.29 Log CFU/ml และ 3.13 – 5.49 Log CFU/ml ตามลำดับ (ตารางที่ 8, 9, 10) สอดคล้องกับ อรุณ ธัญญนันท์ (2544) ที่รายงานว่าสามารถตรวจพบ โพรไบโอติก *Bacillus* S11 ได้ทั้งในน้ำเลี้ยงและดินตะกอนบ่อเลี้ยงกุ้ง โดยพบในปริมาณ 2.50 – 3.89 Log CFU/ml และ 4.15 – 6.51 Log CFU/ml ตามลำดับ ส่วนในลำไส้กุ้ง ในการเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 1 พบ *B.subtilis* P11 ในกุ้งกลุ่มโพรไบโอติกปริมาณ 6.83 - 7.92 Log CFU/ml และไม่พบในกุ้งกลุ่มควบคุม ในการเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 2 พบ *B. subtilis* P11 ในกุ้งกลุ่มโพรไบโอติกและกลุ่มควบคุมปริมาณ 6.43 – 7.64 Log CFU/ml และ 3.76 – 5.84 Log CFU/ml ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องมาจาก ตำแหน่งการวางกระชังของกุ้งทั้ง 2 กลุ่มทดลองอยู่ใกล้กัน ทำให้ *B. subtilis* P11 แพร่กระจายไปยังกุ้งกลุ่มควบคุมด้วย การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า โพรไบโอติก *B. subtilis* P11 สามารถดำรงชีวิตและอาศัยอยู่รอดได้เป็นอย่างดีทั้งในน้ำบ่อเลี้ยงกุ้ง ดินตะกอนบ่อเลี้ยงกุ้ง และลำไส้กุ้ง

จากการทดสอบคุณภาพน้ำบางประการในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำทั้ง 2 ครั้ง (ตารางที่ 3, 7) นั่นคือ แอมโมเนีย ไนไตรท์ ฟอสเฟต อัลคาไลน์นิตี้ อุณหภูมิ พีเอช ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ และความเค็ม พบว่าคุณภาพน้ำอยู่ในเกณฑ์ที่ปลอดภัยสำหรับการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ สอดคล้องกับ Rengpipat และคณะ (1998a, 2000) ที่รายงานว่าไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) ในด้านคุณภาพน้ำระหว่างกุ้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มโพรไบโอติก ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าโพรไบโอติก *B. subtilis* P11 ที่ใช้ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ไม่ได้ส่งผลในด้านลบต่อคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

การเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 1 เมื่อเลี้ยงกุ้งครบ 120 วัน ตามระยะเวลาที่กำหนดแล้ว ได้ทำการรวบรวมกุ้งบางส่วนจากแต่ละกลุ่มมาทำการทดสอบการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคเรืองแสงด้วย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 ความเข้มข้น 10^7 CFU/ml โดยวิธีการแช่ (immersion technique) พบว่ากุ้งกลุ่มควบคุมมีอัตราการตายสะสมมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 8 และเมื่อครบ 10 วัน

หลังจากเหนี่ยวนำให้เกิดโรค กุ้งมีอัตราการตายสะสมเป็น 86.67% เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กุ้งกลุ่มโพรไบโอติก มีอัตราการตายสะสมเพียง 16.67% หลังจากเหนี่ยวนำเกิดโรคเป็นเวลานาน 10 วัน ซึ่งน้อยกว่ากุ้งกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) (รูปที่ 9) สอดคล้องกับ ศิริเพ็ญ สังข์ชัย (2546) ที่รายงานว่าหลังการทดสอบเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 ความเข้มข้น 10^7 CFU/ml โดยวิธีการแช่ (immersion technique) พบว่ากุ้งกลุ่มควบคุมมี อัตราการตายสะสม 50 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 5 และอัตราการตายสะสมเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 8 ส่วนกุ้งกุลาดำที่ผ่านการเลี้ยงด้วยอาหารผสม *Bacillus* P11 เป็นระยะเวลา 120 วัน มีอัตราการตายน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์หลังจากเหนี่ยวนำเกิดโรคเป็นเวลานาน 10 วัน นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับ Rengpipat และคณะ (2000) ที่รายงานว่าหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V.harveyi* สายพันธุ์ 1526 กุ้งกลุ่มโพรไบโอติกมีการตายสะสม 45.70% น้อยกว่ากลุ่มควบคุมที่มีค่าการตายสะสม 64.70% ซึ่งแต่งต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

การเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 2 เมื่อเลี้ยงกุ้งครบ 80 วัน ตามระยะเวลาที่กำหนดแล้ว ได้ทำการรวบรวมกุ้งบางส่วนจากแต่ละกลุ่มมาทำการทดสอบการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคเรืองแสงด้วย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 ความเข้มข้น 10^7 CFU/ml โดยวิธีการแช่ (immersion technique) พบว่ากุ้งในกลุ่มโพรไบโอติกมีอัตราการตายสะสมน้อยกว่ากุ้งกลุ่มควบคุมอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($P>0.05$) โดยการตายสะสมต่อเวลาของกุ้งกลุ่มโพรไบโอติกช้ากว่ากุ้งกลุ่มควบคุม (รูปที่ 16) สอดคล้องกับ Rengpipat และคณะ (2003) ซึ่งรายงานว่าหลังการทดสอบเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 1526 ความเข้มข้น 10^7 CFU/ml โดยวิธีการแช่ (immersion technique) ในกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในบ่อดินเป็นเวลา 100 วัน พบว่ากุ้งในกลุ่มโพรไบโอติกมีอัตราการตายสะสมน้อยกว่ากุ้งกลุ่มควบคุมอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($P>0.05$) โดยการตายสะสมต่อเวลาของกุ้งกลุ่มโพรไบโอติกช้ากว่ากุ้งกลุ่มควบคุมเช่นกัน และยังสอดคล้องกับ Gildberg และ Mikkelsen (1998) ที่พบว่าเมื่อทำการทดสอบการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคในระดับ in vivo โพรไบโอติกสามารถช่วยทำให้การตายช้าลงเท่านั้น

ความแตกต่างจากการทดสอบการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคเรืองแสงด้วย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 จากการทดลอง 2 ครั้งนี้ สาเหตุอาจเกิดขึ้นจากความแตกต่างด้านอายุของกุ้งที่นำมาใช้ทดสอบ กุ้งที่นำมาใช้ในการทดสอบครั้งที่ 1 เลี้ยงในบ่อดินเป็นเวลา 120 วัน อาจมีภูมิคุ้มกันต้านทานการเกิดโรค มากกว่ากุ้งที่นำมาใช้ในการทดสอบครั้งที่ 2 ซึ่งเลี้ยงในบ่อดินเป็นเวลา 80 วัน นอกจากนี้ในการทดสอบการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคครั้งที่ 2 ยังพบโพรไบโอติก *B. subtilis* P11 ในลำไส้กุ้งกลุ่มควบคุมปริมาณ 5.50 Log CFU/ml ซึ่งน้อยกว่าที่พบในลำไส้กุ้งกลุ่มโพรไบโอติกประ

มาณ 2 log cycle (รูปที่ 18) อันเกิดจากการแพร่กระจายของเชื้อระหว่างการเพาะเลี้ยงกุ้ง โพรไบโอติกมีผลช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้กับกุ้งกุลาดำทำให้สามารถต้านทานการเกิดโรคได้ดีขึ้น (อรุญ ธัญญนันท์, 2544) ผลการทดลองครั้งที่ 2 จึงอาจไม่ชัดเจนเท่าครั้งแรก อย่างไรก็ตามจากการทดสอบการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคเรืองแสงด้วย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 ทั้ง 2 ครั้งนี้ สามารถสรุปได้ว่า โพรไบโอติก *B. subtilis* P11 ช่วยเพิ่มความต้านทานของกุ้งกุลาดำต่อการเกิดโรคเรืองแสง และช่วยยืดระยะเวลาการตายของกุ้งเมื่อเกิดโรคเรืองแสงได้

การทดลองเปรียบเทียบความสามารถในการสร้างภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์ จากการทดลองครั้งที่ 1 และ ครั้งที่ 2 หลังการเลี้ยงกุ้งเป็นเวลา 120 วัน และ 80 วัน ตามลำดับ พบว่าปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งในกลุ่มโพรไบโอติก มากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) โดยมีมีปริมาณเม็ดเลือดรวมประมาณ 10^7 cell/ml และลดลงหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค (รูปที่ 12, 19) ส่วนการทดลองเปรียบเทียบความสามารถในการสร้างภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมจากสารน้ำ โดยเปรียบเทียบจากการสร้างสารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในเลือดกุ้ง จากการทดลองครั้งที่ 1 และ ครั้งที่ 2 หลังการเลี้ยงกุ้งเป็นเวลา 120 วัน และ 80 วัน ตามลำดับ พบว่ากุ้งกลุ่มโพรไบโอติกสร้างสารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในเลือดกุ้งโดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งมากกว่ากุ้งกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) และหลังเหนี่ยวนำให้เกิดโรคแล้วกุ้งทั้ง 2 กลุ่มทดลองสร้างสารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียโดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งแบคทีเรียในเลือดมากขึ้น (รูปที่ 13, 20) สอดคล้องกับ Rengpipat และคณะ (2000) ซึ่งรายงานการใช้โพรไบโอติกแบคทีเรีย เพื่อกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน พบว่าสามารถชักนำให้ เปอร์เซ็นต์ฟาโกไซโตซีส ฟาโกไซติก อินเด็กซ์ และปริมาณฟีนอลออกซิเดสในเม็ดเลือดสูงกว่ากลุ่มควบคุม แต่ไม่พบความแตกต่างของปริมาณเม็ดเลือดรวม และฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในทุกกลุ่มทดลอง และหลังการชักนำให้เกิดโรคพบว่า จำนวนเม็ดเลือดรวมลดลง เปอร์เซ็นต์ฟาโกไซโตซีส ฟาโกไซติก อินเด็กซ์ และฤทธิ์ต้านแบคทีเรียมีปริมาณสูงขึ้น และจากการศึกษาของ Panigrahi และคณะ (2005) ซึ่งทำการศึกษาการใช้โพรไบโอติกแบคทีเรีย *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136 ในรูปเซลล์ตาย, เซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่อยู่ในรูปแซ่แข็ง พบว่าการใช้เซลล์ในรูปเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่อยู่ในรูปแซ่แข็งมีผลให้ระบบภูมิคุ้มกันในปลา rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* สูงกว่ากลุ่มที่ให้อาหารปกติ และกลุ่มที่ให้อาหารผสมโพไบโอติกในรูปเซลล์ตายหลังจากหยุดให้อาหารผสมโพรไบโอติกแบคทีเรียดังกล่าว พบว่าระดับภูมิคุ้มกันลดลง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโพรไบโอติกแบคทีเรียสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันกุ้งให้สูงขึ้น

สรุปผลการทดลอง

1. โพรไบโอติก *Bacillus subtilis* P11 (BSP11) สามารถช่วยเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตกุ้งกุลาดำได้อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) แต่ไม่มีผลกับการรอดชีวิตของกุ้ง
2. *B. subtilis* P11 สามารถอาศัยและดำรงอยู่รอดชีวิตอยู่รอดได้เป็นอย่างดี ในสภาพแวดล้อมบ่อเลี้ยงกุ้ง และภายในลำไส้กุ้ง
3. เมื่อทดสอบความด้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคเรืองแสงด้วย *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 พบว่ากุ้งที่เลี้ยงในบ่อดินเป็นเวลา 120 วันในการเพาะเลี้ยงครั้งที่ 1 กุ้งกลุ่มโพรไบโอติกมีอัตราการตายสะสมน้อยกว่ากุ้งกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ส่วนกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในบ่อดินเป็นเวลา 80 วันในการเพาะเลี้ยงครั้งที่ 2 กุ้งกลุ่มโพรไบโอติกมีอัตราการตายสะสมน้อยกว่ากุ้งกลุ่มควบคุมอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) แต่มีอัตราการตายช้ากว่าในกุ้งกลุ่มควบคุม
4. การทดลองเปรียบเทียบความสามารถในการสร้างภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์และสารน้ำ พบว่าโพรไบโอติก *B. subtilis* P11 สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งให้สูงขึ้นได้
5. *B. subtilis* P11 มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกที่ดีเหมาะสำหรับการนำไปใช้เลี้ยงกุ้งในระดับอุตสาหกรรม แต่อาจยังด้อยกว่า *Bacillus* S11 โพรไบโอติกที่ได้รับการยืนยันผลก่อนหน้านี้โดย Rengpipat และคณะ (2003) ในแง่การรอดชีวิตของกุ้ง

ข้อเสนอแนะ

จากการทดลองทำการเสริม *Bacillus subtilis* P11 (BSP11) ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำระดับภาคสนาม มีข้อเสนอแนะว่าควรทำการศึกษาเพิ่มเติมดังนี้

1. ศึกษาปริมาณของ *B. subtilis* P11 ที่แน่นอนและปริมาณต่ำสุดอันมีผลเสริมการเจริญเติบโตและกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรคให้แก่กุ้ง
2. ศึกษาการใช้ *B. subtilis* P11 ร่วมกับ *Bacillus* S11 โพรไบโอติกที่ได้รับการยืนยันผลก่อนหน้านี้โดย Rengpipat และคณะ (2003) เป็น mixed culture เสริมในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ
3. ศึกษาหาวัสดุราคาถูกที่จะนำมาใช้เพิ่มจำนวน *B. subtilis* P11 เพื่อเป็นการลดต้นทุนในการผลิต