วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ปีที่ 28 (ฉบับที่ 2) พฤษภาคม – สิงหาคม พ.ศ. 2566
BURAPHA SCIENCE JOURNAL Volume 28 (No.2) May – August 2023 บทความวิจัย

ผลของโพรไบโอติกต่อการเจริญเติบโต อัตรารอดตาย และความต้านทานต่อเชื้อ *Aeromonas* sp. ในการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*)

Effect of Probiotics on Growth, Survival Rate and Resistance to *Aeromonas* sp. in rearing of Giant Freshwater Prawn (*Macrobrachium rosenbergii*)

มัสธูรา ละใบเด็น[1], ทัศนีย์ นลวชัย[1*], วิญญู บุญประเสริฐ[1] และ ทินวุฒิ ล่องพริก[2]
Matthura Labaiden[1], Thasanee Nonwachai[1*], Winyoo Boonprasert[1] and Tinnawut Longprig[2]
[1] *คณะเทคโนโลยีการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ*
[2] *คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย*
[1] *Faculty of Agricultural Technology and Agro-Industry, Rajamangala University of Technology Suvarnabhumi*
[2] *Faculty of Agriculture, Rajamangala University of Technology Srivijaya*
Received : 27 December 2022
Revised : 11 February 2023
Accepted : 23 February 2023

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของโพรไบโอติกต่างชนิดกันต่อการเจริญเติบโต อัตรารอดตาย และความต้านทานต่อเชื้อ *Aeromonas* sp. ในการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) ขนาด 5 กรัม อัตราความหนาแน่น 22 ตัว/บ่อ (11 ตัว/ตารางเมตร) ในบ่อขนาด 1.5x1.5x1 เมตร วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD) โดยแบ่งเป็น 3 ชุดการทดลอง ๆ ละ 4 ซ้ำ ได้แก่ ชุดการทดลองที่ 1 อาหารสำเร็จรูป (ชุดควบคุม) ชุดการทดลองที่ 2 และ 3 อาหารผสม *Bacillus coagulans* และ *Bacillus aneurinilyticus* (ความเข้มข้นของโพรไบโอติกเท่ากับ 10^8 CFU/g) ตามลำดับ เลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน จากการศึกษาพบว่า กุ้งก้ามกรามที่ได้รับอาหารผสมโพรไบโอติกในชุดการทดลองที่ 2 และ 3 มีน้ำหนักเฉลี่ย, ความยาวเฉลี่ย, ความยาวเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น, อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ และอัตรารอดตาย ดีกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ส่วนความต้านทานต่อเชื้อ *Aeromonas* sp. ของกุ้งก้ามกราม พบว่า กุ้งก้ามกรามในชุดควบคุมมีอัตราการตายสูงที่สุดเท่ากับ 63.33±0.58 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับชุดการทดลองที่ 2 และ 3 ที่มีอัตราการตายเท่ากับ 40.00±1.00และ 36.67±1.15 เปอร์เซ็นต์ คุณภาพน้ำตลอดระยะเวลาการเลี้ยงในทุกชุดการทดลองแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่ากุ้งก้ามกรามที่ได้รับอาหารผสมโพรไบโอติกทั้ง 2 ชนิด สามารถช่วยเพิ่มการเจริญเติบโต อัตรารอดตาย และมีความสามารถต้านทานต่อเชื้อ *Aeromonas* sp. ได้ดีกว่าชุดควบคุม

คำสำคัญ : กุ้งก้ามกราม ; โพรไบโอติก ; *Bacillus coagulans* ; *Bacillus aneurinilyticus* ; *Aeromonas* sp.

Abstract

This study was examined different probiotics on growth, survival rate and resistance to *Aeromonas* sp. in rearing of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). Prawns (size 5 g) were stock in 1.5x1.5x1 meters tanks at density 22 prawns/tank (11 prawns/tank). The experiment was Completely Randomized Design (CRD) and divided in to 3 treatments. Each treatment had 4 replications. The first treatment was commercial pelleted feed (control), the 2nd and 3rd treatments were commercial pelleted feed with *Bacillus coagulans* and *Bacillus aneurinilyticus* (at concentration 10^8 CFU/g) respectively. After cultured for 60 days. The study founded that prawn fed with probiotic in treatment 2 and 3 had an average weight, average length, average length gain, average daily gain, feed conversion ratio and survival rate which were significantly different ($p<0.05$) from control group. In the study of resistance to *Aeromonas* sp. of Giant freshwater prawn, it was found that prawn in control group had highest mortality rate 63.33±0.58 percent, which was significantly different ($p<0.05$) with treatment 2 and 3 that had mortality rates 40.00±1.00 and 36.67±1.15 percent, respectively. For water quality during feed for 60 days in all treatments were not significantly different ($P > 0.05$). From this study demonstrated that prawn fed with diet contain probiotics in the 2 and 3 treatments were able to enhance growth, survival rates and resistance to *Aeromonas* sp. than the control group.

Keywords : gant freshwater prawn; probiotics; *Bacillus coagulans*; *Bacillus aneurinilyticus*; *Aeromonas* sp.

***Corresponding author. E-mail** : tsnnonwachai@gmail.com

บทนำ

กุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) เป็นสัตว์น้ำจืดเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่ง ในประเทศไทยพบกุ้งก้ามกรามชุกชุมในแหล่งน้ำจืดที่ติดทะเล ได้แก่ บริเวณแม่น้ำเจ้าพระยา แม่น้ำท่าจีน แม่น้ำบางประกง ทางภาคใต้พบในแม่น้ำตาปี แม่น้ำปากพนัง แม่น้ำปัตตานี แม่น้ำตรัง แม่น้ำกระบุรี และทะเลสาบสงขลา การเพาะเลี้ยงกุ้งชนิดนี้มีอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะในภาคกลางของประเทศไทย เช่น จังหวัดสุพรรณบุรี นครปฐม พระนครศรีอยุธยา ราชบุรี และปทุมธานี (Trepolaksorn, 2020) การเลี้ยงกุ้งก้ามกรามส่วนใหญ่ เกษตรกรมักใช้การเลี้ยงแบบดั้งเดิม ลงทุนน้อยแต่เลี้ยงกุ้งอย่างหนาแน่น ส่งผลให้มีปัญหาต่าง ๆ เกิดขึ้น เช่น การเจริญเติบโตช้า อัตรารอดตายต่ำ เกิดปัญหาด้านโรคจากเชื้อไวรัสและแบคทีเรีย ส่งผลให้มีการใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะเพื่อการป้องกันโรค ซึ่งการใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะนอกจากจะเป็นการเพิ่มต้นทุนการผลิตแล้วยังส่งผลต่อการตกค้างของสารเคมีและยาในตัวกุ้ง ก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคตามมา (Petjul *et al*., 2018) ปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้เชื้อจุลินทรีย์โพรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้ง เพื่อช่วยเพิ่มการเจริญเติบโต อัตรารอดตาย และช่วยให้กุ้งมีสุขภาพสมบูรณ์แข็งแรง เพิ่มการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน และสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคได้ (Mamdoh *et al*., 2019) ดังนั้นการนำโพรไบโอติกมาใช้ในการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามจึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการช่วยลดการใช้ยาและสารเคมีในระบบการเลี้ยงกุ้ง และยังมีส่วนช่วยเพิ่มผลผลิตและช่วยให้การเลี้ยงกุ้งเกิดความยั่งยืน

โพรไบโอติก คือ จุลินทรีย์ที่มีชีวิต ซึ่งเมื่อบริโภคเข้าไปในปริมาณที่เหมาะสม จะให้ผลดีต่อสุขภาพ ช่วยเพิ่มภูมิคุ้มกันและป้องกันปลาจากเชื้อโรค มีความปลอดภัยต่อสัตว์น้ำและผู้บริโภค ไม่เป็นเชื้อก่อโรค โพรไบโอติกที่มีศักยภาพในการนำมาใช้ผสมอาหารสัตว์น้ำมีหลายชนิด เช่น *Bacillus* sp., *Lactobacillus brevis*, *L. collinoides, L. coryniformis, L. farciminis, Psychrobacter namhaensis* และ *Pseudomonas fluorescens* เป็นต้น ซึ่งสามารถแยกได้จากทางเดินอาหารของสัตว์น้ำ น้ำและดินในบ่อเลี้ยง (Del'Duca *et al*., 2015; Suwan & Chitmanat, 2017) นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยที่ได้ทำการทดลองนำจุลินทรีย์โพรไบโอติกในสกุล *Bacillus* มาผสมกับอาหารกุ้งเพื่อเลี้ยงลูกกุ้งกุลาดำในอัตราส่วนต่าง ๆ กัน พบว่าลูกกุ้งที่ได้รับโพรไบโอติกมีอัตรารอดตายหลังจากทำให้เกิดโรคโดยเชื้อ *Vibrio harveyi* สูง ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ โดยกุ้งทดลองมีสุขภาพแข็งแรง และเจริญเติบโตได้ดี ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีอัตรารอดตายเพียง 26 เปอร์เซ็นต์ และมีอาการผิดปกติในตับและตับอ่อน และลำไส้ (Petjul *et al*., 2019) Manjula *et al*. (2018) ได้ทำการทดลองนำแบคทีเรียโพรไบโอติก *Bacillus coagulans* เสริมในอาหารให้กุ้งก้ามกราม (*M. rosenbergii*) ระยะ Post-larva กิน พบว่า อาหารที่มีการเจือจางปริมาณเชื้อโพรไบโอติกที่ 10^7 CFU/g สามารถช่วยเพิ่มอัตรารอดตาย การเจริญเติบโตและยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *Streptococcus* spp. และ *Klebsiella* spp. ในกุ้งก้ามกรามระยะ Post-larvaได้ดีที่สุด Bhatnagar & Rathi (2020) ได้ทดลองผสมโพรไบโอติก *Bacillus aneurinilyticus* กับอาหารในการเลี้ยงปลา *Labeo calbasu* เป็นระยะเวลา 90 วัน พบว่า อาหารที่ผสมโพรไบโอติกปริมาณ 3,000 CFU/g สามารถส่งสริมการเจริญเติบโตและกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้กับปลาได้ดีที่สุด

การนำโพรไบโอติกจากเชื้อ *Bacillus coagulans* และ *Bacillus aneurinilyticus* มาใช้เป็นในการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของกุ้ง ทำให้สุขภาพแข็งแรง มีความต้านทานโรคสูงขึ้น ซึ่งจะช่วยลดต้นทุนการผลิตกุ้ง และได้ผลผลิตกุ้งที่ปลอดจากสารเคมีตกค้าง นอกจากนี้ยังส่งผลดีต่อการส่งออก และสร้างความเชื่อมั่นให้กับผู้บริโภคอีกด้วย ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จะทำการศึกษาผลของโพรไบโอติกจากเชื้อ *Bacillus coagulans* และ

Bacillus aneurinilyticus ต่อการเจริญเติบโต อัตราการรอดตาย ความต้านทานต่อเชื้อ *Aeromonas* sp. และการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำในการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการประยุกต์ใช้โพรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การศึกษาผลของโพรไบโอติกต่อการเจริญเติบโต อัตรารอดตาย และความต้านทานต่อเชื้อ Aeromonas sp. ในการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม

1.1 การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely randomized design) โดยแบ่งเป็น 3 ชุดการทดลอง ๆ ละ 4 ซ้ำ ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 อาหารสำเร็จรูป (ชุดควบคุม)

ชุดการทดลองที่ 2 อาหารผสม *Bacillus coagulans* ความเข้มข้น 10^8 CFU/g ผสมลงในอาหารอัตราส่วน 1 เปอร์เซ็นต์ต่ออาหาร 1 kg

ชุดการทดลองที่ 3 อาหารผสม *Bacillus aneurinilyticus* ความเข้มข้น 10^8 CFU/g ผสมลงในอาหารอัตราส่วน 1 เปอร์เซ็นต์ต่ออาหาร 1 kg

1.2 การเตรียมสัตว์ทดลอง

นำกุ้งก้ามกรามที่มีสุขภาพดีปลอดจากโรคที่มีน้ำหนัก 5 กรัม จำนวน 5,000 ตัว มาปรับสภาพในบ่อซีเมนต์ ขนาด 1.5x1.5x1 เมตร จำนวน 5 บ่อ ปล่อยกุ้งบ่อละ 1,000 ตัว ให้อาหารวันละ 3 ครั้ง (เวลา 09.00-10.00 น. 12.00-13.00 น. และ 15.00-16.00 น.) ใช้เครื่องให้อากาศเพื่อควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำให้มีค่ามากกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ณ สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร และอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิเป็นระยะเวลา 7 วัน

1.3 การเตรียมเซลล์แบคทีเรียโพรไบโอติกสำหรับใช้ผสมอาหารในการทดลอง

เตรียมเซลล์ตามวิธีการของ Promnuan & Kiriratnikom (2018) โดยเลี้ยงหัวเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียโพรไบโอติกจากห้องปฏิบัติการโรคและปรสิตสัตว์น้ำ สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ ได้แก่ *Bacillus coagulans* (BCRUS1) และ *Bacillus aneurinilyticus* (BARUS3) โดยจะเลี้ยงเชื้อในอาหาร NB บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงบนเครื่องเขย่า ขยายปริมาณเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บเซลล์โดยนำเชื้อที่ได้ไปหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 rpm 15 นาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส ล้างเซลล์ด้วย phosphate buffer saline (PBS) pH 7 จำนวน 2 ครั้ง ก่อนนำไปใช้ในการทดลอง

1.4 การเตรียมอาหารทดลอง

เตรียมอาหารทดลองโดยใช้อาหารกุ้งก้ามกรามที่มีโปรตีน 35 % นำมาผสมจุลินทรีย์โพรไบโอติก โดยฉีดพ่นเซลล์จุลินทรีย์ในสารละลาย PBS ลงบนอาหารทดลองให้มีปริมาณเซลล์จุลินทรีย์ที่ 10^8 CFU/g โดยวัดความขุ่นของสารแขวนลอย

เทียบกับกราฟความสัมพันธ์ของ OD กับจำนวนเซลล์ ใช้อาหารให้หมดภายใน 24 ชั่วโมง ชุดควบคุมเตรียมโดยผสมอาหารด้วย PBS ที่ไม่มีจุลินทรีย์ในปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ (v/w)

1.5 การศึกษาผลของโพรไบโอติกต่อการเจริญเติบโต และอัตรารอดตายของกุ้งก้ามกราม

คัดเลือกกุ้งก้ามกรามขนาด 5 กรัมที่มีสุขภาพแข็งแรง มาเลี้ยงในบ่อซีเมนต์ ขนาด 1.5x1.5x1 เมตร จำนวน 12 บ่อ ใส่กุ้งจำนวนบ่อละ 22 ตัว (11 ตัว/ตารางเมตร) (Wannapat, 2019) ควบคุมอุณหภูมิของน้ำที่ 28±1 องศาเซลเซียส ใช้เครื่องให้อากาศเพื่อควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำให้มีค่ามากกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงกุ้งก้ามกรามโดยให้อาหารตามที่กำหนดไว้ในแต่ละชุดการทดลองวันละ 3 ครั้ง (เวลา 09.00-10.00 น. 12.00-13.00 น. และ 15.00-16.00 น.) ในอัตรา 7 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว ใน 30 วันแรก จากนั้นปรับอัตราการให้อาหารเป็น 5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว พร้อมทั้งบันทึกปริมาณอาหารที่ให้ ดูดตะกอน ระบายของเสียและเปลี่ยนถ่ายน้ำทุก 10 วัน ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำในการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม โดยทำการตรวจวัดค่าแอมโมเนียรวม (total ammonia) ค่าไนไตรท์ (nitrite) ค่าความกระด้าง (hardness) ค่าความเป็นด่าง (alkalinity) ตามวิธีของ APHA *et al.* (1995) วัดค่าออกซิเจนละลาย (dissolved oxygen) (mg/L) โดยใช้เครื่อง YSI model Pro20i วัดค่าความเป็นกรด-เบส (pH) โดยใช้เครื่อง YSI model Pro10 และวัดค่าอุณหภูมิ (temperature) โดยใช้ Glass Thermometer จากบ่อทดลอง โดยสุ่มเก็บตัวอย่างน้ำจากแต่ละชุดการทดลอง ๆ ละ 4 ซ้ำ ก่อนเริ่มต้นการทดลองและทุก ๆ 10 วัน ในระหว่างการเลี้ยงดำเนินการปรับปริมาตรของน้ำในบ่อทดลอง โดยเติมน้ำลงบ่อทดลองในกรณีปริมาณน้ำลดลงมากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ เพื่อรักษาปริมาตรน้ำให้คงที่ตลอดการทดลองตลอดระยะเวลาการเลี้ยง 60 วัน

สุ่มกุ้งจากแต่ละชุดการทดลองจำนวน 20 ตัวต่อชุดการทดลอง เพื่อชั่งน้ำหนัก วัดความยาว (Total length) และนับอัตรารอดตายของกุ้งก้ามกราม ก่อนเริ่มต้นการทดลองและทุก ๆ 10 วันตลอดระยะเวลาการทดลอง 60 วัน หลังจากครบระยะเวลาการเลี้ยงนำข้อมูลที่ได้มาหาค่า น้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น (weight gain) ความยาวเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น (Length gain) อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน (average daily gain) อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (feed conversion ratio) และอัตรารอดตาย (survival rate)

1.6 การศึกษาผลของโพรไบโอติกต่อความต้านทานเชื้อ Aeromonas sp. ของกุ้งก้ามกราม

เมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 60 วัน ทำการสุ่มกุ้งก้ามกรามจากแต่ละชุดการทดลอง เพื่อมาทดสอบผลของโพรไบโอติกต่อความต้านทานต่อเชื้อ *Aeromonas* sp. ของกุ้งก้ามกราม โดยทำการทดลองดังนี้ (Nonwachai, 2010)

1) ปรับสภาพกุ้งที่จะใช้ในการทดลองให้คุ้นเคยกับสภาพตู้กระจกขนาด 24 นิ้ว เป็นเวลา 3 วัน โดยในตู้กระจกจะใส่ ท่อ PVC 1 นิ้ว ยาว 10 เซนติเมตร จำนวนตู้ละ 10 อัน สำหรับเป็นวัสดุหลบซ่อนของกุ้ง เลี้ยงกุ้งทดลองชุดการทดลองละ 10 ตัว ชุดการทดลองละ 3 ตู้ ควบคุมปริมาณแสงโดยการใช้พลาสติกสีดำคลุมรอบตู้ มีการให้อากาศตลอดเวลา ดูดตะกอนและระบายของเสียออกจากตู้ทุกวัน

2) ทำให้กุ้งติดเชื้อโดยฉีดสารละลายเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. ในปริมาณที่ทำให้กุ้งตายประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 48 ชั่วโมง (Nonwachai, 2010) เตรียมสารละลายเชื้อแบคทีเรียโดยนำเชื้อ *Aeromonas* sp. ที่เลี้ยงเชื้อไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA มาละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร ได้ค่า OD ได้ 0.1 ซึ่งมีปริมาณเชื้อเท่ากับ 10^6 CFU/มิลลิลิตร

3) นำกุ้งมาใส่ในถังไฟเบอร์กลาสขนาด 200 ลิตร ใส่กุ้งถังละ 10 ตัว ใส่สาร isoeugenol ความเข้มข้น 95 ppm แช่กุ้งเป็นระยะเวลา 2 นาที ตามวิธีการของ Lorsingkum (2011) จากนั้นทำการฉีดสารละลายเชื้อในกุ้งชุดการทดลองทุกตัว โดยฉีดเชื้อเข้าทางกล้ามเนื้อลำตัวบริเวณรอยต่อระหว่างปล้องที่ 2 และ 3 ของกุ้ง ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตรต่อตัว สำหรับชุดควบคุม (negative control) ซึ่งใส่กุ้งก้ามกรามที่เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปปกติ จำนวน 1 ตู้ ฉีดน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ในปริมาณและตำแหน่งที่ฉีดเท่ากับชุดการทดลองอื่น ๆ (เพื่อเปรียบเทียบระหว่างทำการทดลองว่ากุ้งในทุกชุดการทดลองตายเนื่องจากติดเชื้อ *Aeromonas* sp. ไม่ได้ตายเนื่องจากขั้นตอนการฉีดเชื้อ)

4) จดบันทึกการตายของกุ้งทุกชุดการทดลองเป็นเวลา 7 วัน และเพาะเชื้อแบคทีเรียจาก hepatopancreas ของกุ้งที่แสดงอาการป่วยและใกล้ตาย ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA agar เพื่อเป็นการยืนยันว่ากุ้งที่แสดงอาการป่วยตายด้วยเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้

5) นำตัวอย่างกุ้งที่แสดงอาการป่วยและใกล้ตาย ตรวจยืนยันผลทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ โดยการเก็บตัวอย่างกุ้งมาตรึงด้วยน้ำยา Davidson's fixative โดยฉีดน้ำยาเข้าบริเวณ hepatopancreas และกล้ามเนื้อ แช่ตัวอย่างในน้ำยา Davidson's fixative ที่มีปริมาตรประมาณ 10 เท่าของตัวอย่างกุ้งนานประมาณ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปผ่านกระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อ เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตามวิธีของ Bell & Lightner (1988)

2. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยแบบ (One Way Analysis of Variance) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างชุดทดลอง โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ

ผลการวิจัย

1. การศึกษาผลของโพรไบโอติกต่อการเจริญเติบโต และอัตรารอดตายของกุ้งก้ามกราม

การศึกษาผลของโพรไบโอติกต่อการเจริญเติบโต และอัตรารอดตายของกุ้งก้ามกรามเป็นระยะเวลา 60 วัน พบว่ากุ้งในชุดการทดลองที่ 3 มีน้ำหนักเฉลี่ยดีที่สุดเท่ากับ 11.75±0.25 กรัม แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) กับกุ้งในชุดการทดลองที่ 2 ซึ่งมีน้ำหนักเฉลี่ยเท่ากับ และ 11.08±0.50 กรัม แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับชุดการทดลองที่ 1 ซึ่งมีน้ำหนักเฉลี่ยเท่ากับ 9.09±0.54 กรัม น้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นของกุ้งก้ามกรามในชุดการทดลองที่ 3 มีน้ำหนักเฉลี่ยเพิ่มขึ้นดีที่สุดเท่ากับ 6.52±0.26 กรัม แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) กับชุดการทดลองที่ 3 ซึ่งมีน้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นเท่ากับ 5.86±0.51 กรัม แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับชุดการทดลองที่ 1 ซึ่งมีน้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นเท่ากับ 3.87±0.53 กรัม กุ้งก้ามกรามในชุดการทดลองที่ 3 มีความยาวเฉลี่ยดีที่สุด เท่ากับ 10.13±0.26 เซนติเมตร แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) กับกุ้งในชุดการทดลองที่ 2 ซึ่งมีความยาวเฉลี่ยเท่ากับ 09.92±0.14 เซนติเมตร แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับชุดการทดลองที่ 1 ซึ่งมีความยาวเฉลี่ยเท่ากับ 9.43±0.42 เซนติเมตร ความยาวเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นของกุ้งก้ามกรามในชุดการทดลองที่ 3 มีความยาวเฉลี่ยเพิ่มขึ้นดีที่สุดเท่ากับ

1.86±0.24 เซนติเมตร แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) กับกุ้งในชุดการทดลองที่ 2 ซึ่งมีความยาวเฉลี่ยเพิ่มขึ้นเท่ากับ 1.66±0.11 เซนติเมตร แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) กับชุดการทดลองที่ 1 ซึ่งมีความยาวเฉลี่ยเพิ่มขึ้นเท่ากับ 1.16±0.42 เซนติเมตร กุ้งก้ามกรามในชุดการทดลองที่ 3 มีอัตราการเจริญเติบโตต่อวันดีที่สุดเท่ากับ 0.11±0.00 กรัมต่อตัวต่อวัน แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) กับกุ้งในชุดการทดลองที่ 2 ซึ่งมีอัตราการเจริญเติบโตต่อวันเท่ากับ 0.10±0.01 กรัมต่อตัวต่อวัน แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) กับชุดการทดลองที่ 1 ซึ่งมีอัตราการเจริญเติบโตต่อวันเท่ากับ 0.06±0.01 กรัมต่อตัวต่อวัน กุ้งก้ามกรามในชุดการทดลองที่ 3 มีอัตรารอดตายเฉลี่ยสูงที่สุดเท่ากับ 75.00±1.50 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) กับกุ้งในชุดการทดลองที่ 2 ซึ่ง มีอัตรารอดตายเฉลี่ยเท่ากับ 73.33±1.15 เปอร์เซ็นต์ แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) กับกุ้งในชุดการทดลองที่ 1 ซึ่ง มีอัตรารอดตายเฉลี่ยเท่ากับ 56.67±1.73 เปอร์เซ็นต์ อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อเฉลี่ยของกุ้งก้ามกราม ในชุดการทดลองที่ 3 มีค่าต่ำที่สุด คือ 1.41±0.22 แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) กับกุ้งในชุดการทดลองที่ 2 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.68±0.34 แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) กับกุ้งในชุดการทดลองที่ 1 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 3.00±0.58 (Table 1)

Table 1 Growth and survival rates of Giant freshwater prawn fed various probiotics over a 60-day period.

Parameter / Treatment	1 (control)	2 (*Bacillus coagulans*)	3 (*Bacillus aneutinilyticus*)
Initial weight (g/body)	5.22±0.13[a]	5.22±0.03[a]	5.23±0.16[a]
Final weight (g/body)	9.09±0.54[b]	11.08±0.50[a]	11.75±0.25[a]
Weight gain (g)	3.87±0.53[b]	5.86±0.51[a]	6.52±0.26[a]
Initial length (cm)	8.27±0.03[a]	8.27±0.09[a]	8.27±0.04[a]
Final length (cm)	9.43±0.42[b]	9.92±0.14[a]	10.13±0.26[a]
Length gain (cm)	1.16±0.42[b]	1.66±0.11[a]	1.86±0.24[a]
Average daily gain (g./body/day)	0.06±0.01[b]	0.10±0.00[a]	0.11±0.01[a]
Survival rate (%)	56.67±1.73[b]	75.00±1.50[a]	73.33±1.15[a]
Feed conversion ratio (FCR)	3.00±0.58[b]	1.68±0.34[a]	1.41±0.22[a]

Note : Different letters in the same row are statistically significantly different. (p<0.05)

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำในการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม พบว่าตลอดระยะเวลาการทดลองเป็นระยะเวลา 60 วันคุณภาพน้ำของทุกชุดการทดลองแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) (Table 2)

Table 2 A 60-day study on the alterations in water quality in prawn aquaculture.

Treatment / Day	Temperature (°C)				
	0	15	30	45	0
1 (control)	26.80±0.08[c]	29.75±0.13[a]	25.08±0.10[a]	27.90±0.29[a]	26.48±0.15[a]
2 (*Bacillus coagulans)*	26.55±0.05[b]	29.53±0.10[b]	24.85±0.13[b]	27.75±0.13[a]	26.55±0.13[a]
3 (*Bacillus aneutinilyticus)*	26.32±0.09[a]	29.70±0.08[a]	24.98±0.13[a]	28.05±0.13[a]	26.48±0.10[a]
P-value	0.00	0.032	0.069	0.428	0.642
Treatment / Day	**Dissolved oxygen (mg/l)**				
	0	15	30	45	60
1 (control)	5.53±0.08[a]	5.37±0.13[a]	6.45±0.21[a]	5.88±0.27[a]	5.95±0.55[a]
2 (*Bacillus coagulans)*	5.56±0.05[a]	5.46±0.29[a]	5.84±0.44[a]	5.60±0.24[a]	6.15±0.37[a]
3 (*Bacillus aneutinilyticus)*	5.49±0.04[a]	5.44±0.23[a]	6.20±0.39[a]	5.77±0.25[a]	6.18±0.25[a]
P-value	0.333	0.832	0.106	0.110	0.692
Treatment / Day)	**pH**				
	0	15	30	45	60
1 (control)	7.51±0.02[a]	7.59±0.08[a]	7.61±0.28[a]	8.44±0.14[a]	8.25±0.12[a]
2 (*Bacillus coagulans)*	7.54±0.02[a]	7.65±0.07[a]	7.76±0.09[a]	8.47±0.07[a]	8.28±0.07[a]
3 (*Bacillus aneutinilyticus)*	7.55±0.00[a]	7.62±0.09[a]	7.60±0.37[a]	8.37±0.09[a]	8.23±0.11[a]
P-value	0.092	0.554	0.654	0.589	0.773
Treatment / Day	**Total ammonia (mg-N/l)**				
	0	15	30	45	60
1 (control)	0.06±0.02[a]	0.02±0.00[a]	0.02±0.00[a]	0.04±0.02[a]	0.02±0.01[a]
2 (*Bacillus coagulans)*	0.06±0.01[a]	0.02±0.00[a]	0.02±0.00[a]	0.03±0.01[a]	0.02±0.00[a]
3 (*Bacillus aneutinilyticus)*	0.08±0.04[a]	0.02±0.00[a]	0.02±0.00[a]	0.03±0.01[a]	0.02±0.00[a]
P-value	0.611	0.622	1.000	0.933	0.622
Treatment / Day	**Nitrite (mg-N/l)**				
	0	15	30	45	60
1 (control)	0.02±0.00[a]	0.00±0.00[a]	0.31±0.25[a]	0.12±0.11[a]	0.04±0.06[a]
2 (*Bacillus coagulans)*	0.20±0.00[a]	0.00±0.00[a]	0.07±0.07[a]	0.15±0.15[a]	0.03±0.03[a]
3 (*Bacillus aneutinilyticus)*	0.01±0.00[a]	0.00±0.00[a]	0.09±0.02[a]	0.16±0.11[a]	0.04±0.04[a]

P-value	0.936	0.000	0.091	0.980	0.941
Treatment / Day)	Hardness (mg/l as $CaCO_3$)				
	0	15	30	45	60
1 (control)	70.47±0.63[a]	50.50±4.43[a]	80.50±1.00[a]	60.50±1.00[b]	70.50±1.00[a]
2 (*Bacillus coagulans)*	70.72±0.61[a]	44.00±20.00[a]	90.00±1.15[a]	60.50±1.00[ab]	80.00±1.63[a]
3 (*Bacillus aneutinilyticus)*	70.52±0.29[a]	100.50±1.00[b]	80.50±1.91[a]	60.00±0.00[a]	80.00±1.63[a]
P-value	0.793	0.002	0.849	0.060	0.856
Treatment / Day	Alkalinity (mg/l as $CaCO_3$)				
	0	15	30	45	60
1 (control)	241.00±17.16[a]	280.50±8.39[a]	268.50±20.62[a]	252.00±39.83[a]	349.00±17.32[a]
2 (*Bacillus coagulans)*	231.25±11.95[a]	281.00±13.32[a]	286.00±40.50[a]	317.50±7.19[a]	349.50±12.15[a]
3 (*Bacillus aneutinilyticus)*	233.25±6.23[a]	280.50±16.60[a]	242.00±21.73[a]	315.50±42.47[a]	333.00±11.60[a]
P-value	0.536	0.998	0.154	0.394	0.218

Note : Different letters in the same column are statistically significantly different. ($p<0.05$)

2. การศึกษาผลของโพรไบโอติกต่อความต้านทานเชื้อ Aeromonas sp. ของกุ้งก้ามกราม

การศึกษาผลของโพรไบโอติกต่อความต้านทานต่อเชื้อ *Aeromonas* sp. ของกุ้งก้ามกราม โดยบันทึกการตายของกุ้งทุกชุดการทดลองเป็นเวลา 7 วัน ผลการทดลองพบว่า กุ้งก้ามกรามในชุดควบคุมมีอัตราการตายสูงที่สุดเท่ากับ 63.33±0.58 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับชุดการทดลองที่ 2 (อาหารผสม *Bacillus coagulans*) และ 3 (อาหารผสม *Bacillus aneurinilyticus*) ซึ่งมีอัตราการตายของกุ้งก้ามกรามอยู่ที่ 40.00±1.00 และ 36.67±1.15 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังนั้นจะเห็นได้ว่ากุ้งก้ามกรามที่ได้รับอาหารผสมโพรไบโอติกในชุดการทดลองที่ 2 (อาหารผสม *Bacillus coagulans*) และ 3 (*Bacillus aneurinilyticus*) มีความสามารถต้านทานต่อเชื้อ *Aeromonas* sp. ได้ดีกว่าชุดควบคุม (Table 3) ทั้งนี้หลังการฉีดเชื้อพบว่ากุ้งก้ามกรามจะเริ่มมีการตายหลังจากได้รับเชื้อ 24 ชั่วโมง กุ้งจะเคลื่อนไหวช้า ตัวมีสีซีด ไม่ตอบสนองต่อสิ่งเร้าและตายในที่สุด การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อของกุ้งที่ป่วยและใกล้ตายพบการตอบสนองของเซลล์โดยการเกิดสาร melanin ขึ้นบริเวณที่มีรอยสีดำแทรกอยู่ในกล้ามเนื้อ (Figure1-2)

Table 3 Mortality rate (percent) of Giant freshwater prawn fed with different probiotic after infection *Aeromonas* sp. for a period of 7 days.

Treatment	Mortality rate (percent)
1 (control)	63.33±0.58[b]
2 (*Bacillus coagulans)*	40.00±1.00[a]
3 (*Bacillus aneutinilyticus)*	36.67±1.15[a]

Note: Different letters in the same column are statistically significantly different. ($p<0.05$)

Figure 1 Appearance of Giant freshwater prawn after infection with *Aeromonas* sp.

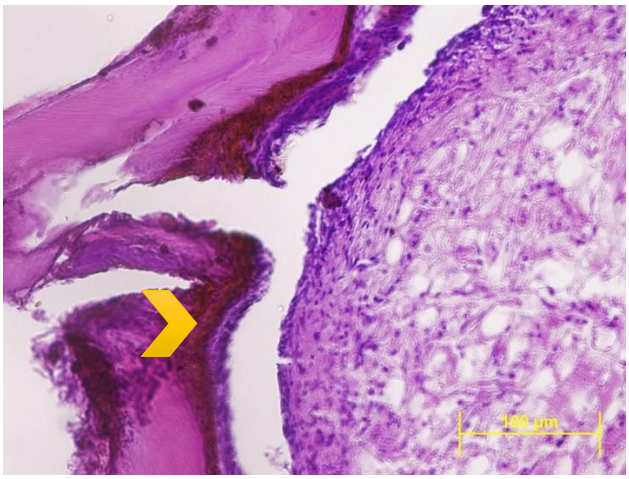

Figure 2 Melanin in muscle tissue.

วิจารณ์ผลการวิจัย

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่ากุ้งก้ามกรามที่ได้รับอาหารผสมโพรไบโอติกในชุดการทดลองที่ 2 (อาหารผสม *Bacillus coagulans*) และ 3 (*Bacillus aneutinilyticus*) มีการเจริญเติบโต และ อัตรารอดตาย สูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Wang *et al.* (2012) ที่พบว่า กุ้งขาวแปซิฟิก (*Litopenaeus vannamei*) ที่ได้รับอาหารผสม *Bacillus aneutinilyticus* มีน้ำหนักสุดท้าย (6.42±0.13 กรัม) น้ำหนักเพิ่มต่อวัน (0.111±0.002 กรัมต่อตัวต่อวัน) และอัตรารอดตาย (87.11±3.42 เปอร์เซ็นต์) เพิ่มขึ้นกว่าชุดควบคุมที่ไม่ได้รับอาหารผสม *Bacillus coagulans* เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 50 วัน เช่นเดียวกับการทดลองของ Amoah *et al.* (2019) พบว่ามีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

($p<0.05$) ของน้ำหนักสุดท้าย อัตราน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (WGR) อัตราการเติบโตจำเพาะ (SGR) และอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (FCR) ของกุ้งขาวแปซิฟิก (*Litopenaeus vannamei*) ที่ได้รับการเสริม *Bacillus coagulans* ที่ $1x10^8$ CFU ในอาหารเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (without probiotic)

Manjula *et al.* (2018) ได้ทำการทดลองนำแบคทีเรียโพรไบโอติก *Bacillus coagulans* เสริมในอาหารให้กุ้งก้ามกราม (*M. rosenbergii*) ระยะ Post-larva กิน พบว่า อาหารที่มีการเจือจางปริมาณเชื้อโพรไบโอติกที่ 10^7 CFU/g สามารถช่วยเพิ่มอัตรารอดตาย การเจริญเติบโตและยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *Streptococcus* spp. และ *Klebsiella* spp. ในกุ้งก้ามกรามระยะ Post-larvaได้ดีที่สุด Bhatnagar & Rathi (2020) ได้ทดลองผสมโพรไบโอติก *Bacillus aneurinilyticus* กับอาหารในการเลี้ยงปลา *Labeo calbasu* เป็นระยะเวลา 90 วัน พบว่า อาหารที่ผสมโพรไบโอติกปริมาณ 3,000 CFU/g สามารถส่งสริมการเจริญเติบโตและกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้กับปลาได้ดีที่สุด

Akhil *et al.* (2016) รายงานประสิทธิภาพของ *Bacillus coagulans* ต่อการเจริญเติบโต การใช้อาหาร การทำงานของเอนไซม์ย่อยอาหาร การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันโดยธรรมชาติ และความต้านทานโรคของกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) พบว่าการเสริม *Bacillus coagulans* เป็นโพรไบโอติกในอาหารกุ้งที่ปริมาณ 10^9 CFU/g สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโต การใช้อาหาร การทำงานของเอนไซม์ย่อยอาหาร การตอบสนองโดยกำเนิด และความต้านทานโรคของกุ้งก้ามกรามได้

มีรายงานการคัดแยก *Bacillus aneurinilyticus* (synonym: *Aneurinibacillus aneurinilyticus*) จากทางเดินอาหารของปลาเพื่อใช้เป็นโพรไบโอติก เช่นการศึกษาของ Bhatnagar & Rathi (2020) ที่รายงานการใช้ *Bacillus aneurinilyticus* ที่คัดแยกได้จากกระเพาะอาหารของปลา *Labeo calbasu* พบว่า การผสม *Bacillus aneurinilyticus* ปริมาณ 3000 CFU/g ในอาหารปลา สามารถเพิ่มการเจริญเติบโตและภูมิคุ้มกันให้กับปลา *Labeo calbasu* ได้ Bhatnagar & Dhillon (2019) รายงานว่า *Bacillus aneurinilyticus* มีส่วนช่วยในการเพิ่มการเจริญเติบโต กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน และช่วยต้านทานเชื้อ *A. hydrophila*

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำในการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม พบว่าอุณหภูมิของน้ำที่ใช้ในการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามอยู่ในช่วงระหว่าง 24.85-29.75 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นระดับอุณหภูมิที่ค่อนข้างต่ำจึงส่งผลต่อการเจริญเติบโตและอัตรารอดตายของกุ้ง โดยเฉพาะกุ้งในชุดควบคุมที่ไม่ได้รับโพรไบโอติกที่มีอัตรารอดตายหลังจากการเลี้ยงกุ้ง 60 วัน อยู่ที่ 56.67±1.73 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับชุดการทดลองที่ได้รับโพรไบโอติก ทั้งนี้อุณหภูมิของน้ำที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของกุ้งก้ามกรามควรอยู่ในช่วง 28-31 องศาเซลเซียส โดยอุณหภูมิของน้ำที่เหมาะสมที่สุด คือ 30 องศาเซลเซียส (Suwanthet, 2003)

ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำในกลุ่มที่มีการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกจะมีค่าลดลงเล็กน้อย เนื่องจากจุลินทรีย์เหล่านี้ใช้ออกซิเจนในการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่มีอยู่ในมวลน้ำ ส่งผลให้ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำต่ำลงเล็กน้อย เนื่องจากในการทดลองมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำเพื่อปรับปรุงคุณภาพน้ำอยู่จึงทำให้ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำไม่มีความ

แตกต่างกัน ดังนั้นการใช้จุลินทรีย์ในปริมาณที่มากจึงไม่มีผลกระทบต่อคุณภาพน้ำ สำหรับการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามถ้าระบบการเลี้ยงมีปริมาณออกซิเจนอย่างเพียงพอ และระหว่างการทดลองมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำส่งผลให้ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำไม่มีความแตกต่างกันระหว่างชุดการทดลอง Boyd (1989) กล่าวว่า ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงกุ้งควรมีค่าระหว่าง 5-6 ppm

ค่าความเป็นกรดเป็นด่างในกลุ่มที่มีการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกจะมีค่าลดลงเล็กน้อย เนื่องจากจุลินทรีย์เหล่านี้ใช้ออกซิเจนในการย่อยสลายสารอินทรีย์ส่งผลให้ค่าความเป็นกรดเป็นด่างของน้ำต่ำลงเล็กน้อย ประกอบกับน้ำที่ใช้ในการทดลองมีค่าความเป็นด่างอยู่ในช่วง 231±11.95-349.50±12.15 มิลลิกรัมต่อลิตร ของแคลเซียมคาร์บอเนต ซึ่งค่าความเป็นด่างระดับดังกล่าวสามารถช่วยต้านทานการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดเป็นด่างได้ ดังนั้นการใช้จุลินทรีย์ในปริมาณที่มากจึงไม่มีผลกระทบต่อคุณภาพน้ำ สำหรับการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม ถ้าระบบการเลี้ยงมีปริมาณออกซิเจนอย่างเพียงพอ และระหว่างการทดลองมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำส่งผลให้ค่าความเป็นกรดเป็นด่างไม่มีความแตกต่างกันระหว่างชุดการทดลอง

ปริมาณแอมโมเนียรวมของชุดการทดลองที่เลี้ยงด้วยโพรไบโอติกกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) โดยปริมาณแอมโมเนียรวม ชุดการทดลองที่ 1 อยู่ในช่วง 0.02±0.00 ถึง 0.06±0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร ชุดการทดลองที่ 2 อยู่ในช่วง 0.02±0.00 ถึง 0.06±0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร และชุดการทดลองที่ 3 อยู่ในช่วง 0.02±0.00 ถึง 0.08±0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เนื่องมาจากโพรไบโอติกที่เติมลงไปในอาหารเป็นแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติช่วยในการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่เป็นของเสียได้เพราะสามารถผลิตสารที่สามารถหลั่งออกมานอกเซลล์เพื่อย่อยสลาย สารอินทรีย์ได้หลายชนิด (Suwanpinit & Suwanpinit, 2009) Armstrong *et al.* (1978) รายงานว่า ค่า LC_{50} ที่ 24 และ 144 ชั่วโมงของปริมาณแอมโมเนียรวม (Total ammonia nitrogen) ต่อกุ้งก้ามกรามวัยอ่อนมีค่าเท่ากับ 115 และ 40 ppm นอกจากนั้น Cheng & Chen (2002) พบว่า แอมโมเนียของน้ำตั้งแต่ 1.28 ppm หรือสูงกว่านี้จะเสริมให้ความรุนแรงของแบคทีเรียกลุ่ม *Lactococcus garvieae* ต่อกุ้งก้ามกรามวัยอ่อนเพิ่มขึ้น โดยปริมาณแอมโมเนียรวมที่มีอยู่ในระดับสูงจะเป็นสาเหตุให้อัตรารอดของลูกกุ้งวัยอ่อน และผลผลิตกุ้งก้ามกรามในบ่อลดลง ซึ่ง Limsuwan & Chanratchakul (2004) พบว่าระดับความเข้มข้นของแอมโมเนียในรูป NH_3 ทำให้สัตว์น้ำตาย โดยปกติอยู่ในช่วง 0.4-2.0 ppm ซึ่งค่าแอมโมเนียระหว่าง 0.1-0.4 ppm จะทำให้กุ้งโตช้า และระดับแอมโมเนียที่ปลอดภัยต่อการเลี้ยงกุ้งควรน้อยกว่า 0.1 ppm

ปริมาณไนไตรท์ของชุดการทดลองที่เลี้ยงด้วยโพรไบโอติก กับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เลี้ยงด้วยโพรไบโอติกแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($p>0.05$) ชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมโพรไบโอติก ระหว่างการเลี้ยงจะเกิดการสะสมของสารอินทรีย์และของเสียเพิ่มมากขึ้นเนื่องจากปริมาณแบคทีเรียหรือจุลินทรีย์ที่มีไม่เพียงพอต่อการย่อยสลายสารอินทรีย์จึงทำให้ปริมาณแอมโมเนียสูงขึ้นในช่วงท้ายของการทดลอง ซึ่งจากการศึกษาที่พบว่า *Bacillus* spp. มีผลต่อคุณภาพน้ำในการเลี้ยงกุ้ง โดยเฉพาะปริมาณแอมโมเนียรวมและไนไตรท์-ไนโตรเจน (Sae-eiah, 2006; Somboon *et al.*, 2009) แต่ในการทดลองนี้ปริมาณไนไตรท์ของชุดการทดลองที่มีการเลี้ยงด้วยโพรไบโอติก กับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมโพรไบโอติกไม่มีความแตกต่างกัน

เนื่องจากตลอดการทดลองมีการถ่ายน้ำเพื่อปรับปรุงคุณภาพน้ำทำให้ปริมาณไนไตรท์-ไนโตรเจนลดลง ซึ่งปริมาณไนไตรท์-ไนโตรเจน ในช่วงดังกล่าวไม่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของกุ้งก้ามกราม (Tangkrock-olan & Thongtiam, 2010) ประกอบกับมีปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำค่อนข้างสูงตลอดช่วงการทดลอง ปริมาณออกเจนที่ละลายน้ำ 5-6 มิลลิกรัม ต่อลิตร ช่วยลดความเป็นพิษของไนไตรท์-ไนโตรเจนได้

ความกระด้างรวมของทั้ง 3 ชุดการทดลอง แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($p>0.05$) และค่าความกระด้างอยู่ในระดับต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานเล็กน้อย เนื่องจากน้ำที่นำมาใช้ทดลองเป็นน้ำประปาซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 75-150 มิลลิกรัมต่อลิตร ของแคลเซียมคาร์บอเนต :โดยเหตุที่ทำให้ปริมาณความกระด้างของน้ำประปามีค่าต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานเล็กน้อย เนื่องมาจากในรอบปีปริมาณความกระด้างของน้ำประปาจะมีค่าแตกต่างกันไปตามฤดูกาล และปริมาณน้ำฝน

ค่าปริมาณความเป็นด่างของน้ำเลี้ยงกุ้งก้ามกราม ทั้ง 3 ชุดการทดลองแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($p>0.05$) ทั้งนี้ปริมาณความเป็นด่างของทุกชุดการทดลองอยู่ในช่วง 231±11.95-349.50±12.15 มิลลิกรัมต่อลิตรของแคลเซียมคาร์บอเนต ซึ่งเป็นค่าที่ค่อนข้างสูงเนื่องจากน้ำที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้เป็นน้ำบาดาล ค่าความเป็นด่างระดับดังกล่าวสามารถช่วยต้านทานการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดเป็นด่างได้ การใช้จุลินทรีย์ในปริมาณที่มากจึงไม่มีผลกระทบต่อคุณภาพน้ำ สำหรับการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามถ้าระบบการเลี้ยงมีปริมาณออกซิเจนอย่างเพียงพอ และระหว่างการทดลองมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำส่งผลให้ค่าความเป็นกรดเป็นด่างไม่มีความแตกต่างกันระหว่างชุดการทดลอง ซึ่งสอดคล้องกับ Duangsawat & Somsiri (1985) กล่าวว่าปริมาณความเป็นด่างของน้ำเป็นตัวช่วยไม่ให้แหล่งน้ำมีการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดเป็นด่างของแหล่งน้ำเกิดขึ้นเร็วเกินไป โดยปริมาณความเป็นด่างที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงกุ้งควรมีค่ามากกว่า 80 ppm จากการศึกษาพบว่าปริมาณความเป็นด่างในน้ำของทั้ง 3 ชุดการทดลองอยู่ในช่วงที่เหมาะสม

การศึกษาผลของโพรไบโอติกต่อความต้านทานต่อเชื้อ *Aeromonas* sp. ของกุ้งก้ามกรามพบว่า กุ้งก้ามกรามในชุดควบคุมมีอัตราการตายสูงที่สุด หลังการฉีดเชื้อกุ้งก้ามกรามจะเริ่มมีการตายหลังจากได้รับเชื้อ 24 ชั่วโมง โดยกุ้งที่ป่วยจะไม่กินอาหาร เคลื่อนไหวช้า ตัวมีสีซีด ไม่ตอบสนองต่อสิ่งเร้าและตายในที่สุด หลังการฉีดเชื้อ 3 วันจะสังเกตเห็นการเกิดรอยสีดำแทรกอยู่ในกล้ามเนื้อบริเวณที่ฉีดเชื้อเข้าไป นอกจากนี้ยังสังเกตพบสะเก็ดแผลสีดำบริเวณลำตัวกุ้ง หลังจากการฉีดเชื้อพบว่าอัตราการตายของกุ้งก้ามกรามจะคงตั้งแต่วันที่ 3 โดยไม่พบการตายของกุ้งเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการทดลอง การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อของกุ้งที่ป่วยและใกล้ตายพบการตอบสนองของเซลล์โดยการเกิดสาร melanin ขึ้นบริเวณที่มีรอยสีดำแทรกอยู่ในกล้ามเนื้อ สอดคล้องกับรายงานของ Nonwachai (2010) ที่รายงานลักษณะภายนอกของกุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรียว่า กุ้งจะเริ่มแสดงอาการป่วยเกิดขึ้นหลังจากได้รับเชื้อแบคทีเรียเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยกุ้งป่วยมีสีเข้มขึ้นกว่าปกติ และไม่มีปฏิกิริยาตอบสนองต่อสิ่งเร้าต่าง ๆ ไม่ว่ายน้ำ และตายในที่สุด โดยจะสังเกตเห็นการเกิด melanin สีดำแทรกอยู่ในกล้ามเนื้อบริเวณที่ฉีดเชื้อเข้าไป และเมื่อนำเนื้อเยื่อบริเวณกล้ามเนื้อที่เกิด melanin สีดำแทรกอยู่มาศึกษาทางด้านพยาธิสภาพ พบการตอบสนองของเซลล์เม็ดเลือด โดยเซลล์เม็ดเลือดล้อมรอบบริเวณเนื้อเยื่อที่ถูกทำลาย ทั้งนี้ Jueliang (2011)

รายงานว่า แบคทีเรียในสกุล *Bacillus* สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อจุลชีพได้ โดยแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มแรกคือ Cyclic oligopeptides เช่น Bacitracin มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ในแบคทีเรียแกรมบวก กลุ่มที่สองคือ Linear or Cyclic oligopeptides เช่น Tyrothricin, Gramicidins มีฤทธิ์รบกวนการทำหน้าที่ของ cell membrane ในแบคทีเรียแกรมบวก และ Polymixins มีฤทธิ์รบกวนการทำหน้าที่ของ cell membrane ในแบคทีเรียแกรมลบ กลุ่มที่สาม คือ Basic peptides เช่น Ediens ซึ่งจะไปยับยั้งการรวมกันของ small ribosome subunit ในแบคทีเรียแกรมลบ และกลุ่มสุดท้ายคือ Aminoglycoside antibiotic ซึ่งมีผลต่อการทำงานของไรโบโซม แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สามารถผลิตสาร antibiotic ได้ คือ bacitracins สารพวกนี้จะมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง peptidoglycan ซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ของแบคทีเรียอื่นได้ และมีการศึกษาสาร extra-cellular metabolite พบว่า *Bacillus amyloliquefaciens* และ *Bacillus subtilis* สามารถสร้างสารในกลุ่ม cyclic-antibiotic ที่เป็น Iturin A ซึ่งเป็นสารโพลีเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อรา (Antifungal Agent) นอกจากนี้ *Bacillus amyloliquefaciens* ยังผลิตเอ็นไซม์อีกหลายชนิด เช่น ไลเปส (Lipase), อะไมเลส (Amylase), ซูเครส (Sucrase), โปรติเอส (Protease) และ เปปติเดส (Peptidase) เป็นต้น (Arguelles-Arias *et al*., 2009) ซึ่งเอนไซม์ที่หลั่งออกมาเหล่านี้สามารถยับยั้งแบคทีเรียในกลุ่มแกรมลบได้

จากการศึกษาครั้งนี้จะเห็นได้ว่า กุ้งก้ามกรามที่เลี้ยงด้วยจุลินทรีย์โพรไบโอติก สามารถช่วยเพิ่มอัตราการเจริญเติบโต อัตรารอดตาย และเพิ่มความต้านทานต่อเชื้อ *Aeromonas* sp. ของกุ้งก้ามกรามได้ดีกว่ากุ้งในชุดควบคุม โดยกุ้งก้ามกรามที่ได้รับโพรไบโอติกทั้ง *Bacillus coagulans* และ *Bacillus aneutinilyticus* จะมีน้ำหนักเฉลี่ย ความยาวเฉลี่ย ความยาวเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น (Length gain), อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน (average daily gain), อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (feed conversion ratio) และอัตรารอดตาย (survival rate) ที่ดีกว่ากุ้งในชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งนี้ควรมีการศึกษาการใช้ *Bacillus coagulans* และ *Bacillus aneurinilyticus* ร่วมกันในการศึกษาขั้นต่อไป เนื่องจากมีรายงานว่าการใช้แบคทีเรียโพรไบโอติก โดยเฉพาะกลุ่มสร้างสปอร์ (combination of spore forming bacteria) สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้สูงกว่าการใช้เชื้อเพียงชนิดเดียว (Jueliang, 2011) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

สรุปผลการวิจัย

กุ้งก้ามกรามที่เลี้ยงด้วยจุลินทรีย์โพรไบโอติกทั้ง 2 สายพันธุ์ได้แก่ *Bacillus coagulans* และ *Bacillus aneurinilyticus* ที่มีความเข้มข้น 10^8 CFU/g ผสมลงในอาหารอัตราส่วน 1 เปอร์เซ็นต์ต่ออาหาร 1 kg สามารถช่วยเพิ่มอัตราการเจริญเติบโต อัตรารอดตาย และเพิ่มความต้านทานต่อเชื้อ *Aeromonas* sp. ของกุ้งก้ามกรามได้ดีกว่ากุ้งในชุดควบคุม

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิที่สนับสนุนทุนวิจัยจากงบประมาณกองทุนส่งเสริมงานวิจัย ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2564 ประเภททุนวิจัยตามยุทธศาสตร์ของมหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

Akhil, G., Geetika, V., &. Paromita, G. (2016). Growth performance, feed utilization, digestive enzyme activity, innate immunity and protection against *Vibrio harveyi* of freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* fed diets supplemented with *Bacillus coagulans*. *Aquaculture International*, *24,* 1379–1392.

Amoah, K., Huang, Q.C., Tan, B.P., Zhang, S., Chi, S.Y., Yang, Q.H., Liu, H.Y. & Dong, X.H. (2019). Dietary supplementation of probiotic *Bacillus coagulans* ATCC 7050, improves the growth performance, intestinal morphology, microflora, immune response, and disease confrontation of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*, *87,* 796–808.

APHA, AWWA & WEF. (1995). *Standard methods for the examination water and wastwater*. (20th ed). Maryland: United Book Press.

Arguelles-Arias, A., Ongena, M., Halimi, B., Lara, Y., Brans, A., Joris, B., & Fickers, P. (2009). *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and mother secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. *Microbial Cell Factories*, *8*(63), 1-12.

Armstrong, D.A., Chippendale, D., knight, A.W. & Colt, J.E. (1978). Interaction of ionized and un-ionized ammonia on short-term survival and growth of prawn larvae, *Macrobrachium rosenbergii*. *The Biological Bulletin*, *154,* 15-31.

Bell, T.A. & Lightner D.V. (1988). *A Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology*. Lawreence, Kansas: Allen Press, Inc.

Bhatnagar, A., & Dhillon, O. (2019). Characterization, screening, and application of bacteria with probiotic properties isolated from the gut of *Labeo calbasu* (Hamilton). *Fisheries & Aquatic Life*, *27*, 178 - 189.

Bhatnagar, A., & Rathi, P. (2020). Dosage determination of autochthonous probiotic bacterium *Aneurinibacillus aneurinilyticus* for the optimum growth and immunostimulation of *Labeo calbasu* (Hamilton, 1822). *Annals of Biology*, *36*(1), 81-87.

Boyd, C.E. (1989). *Water quality management and aeration in shrimp farming*. Alabama: Auburn University.

Cheng, W. & Chen, J.C. (2002). The virulence of Enterrococus Freshwater Prawn *Macrobrachium rosenbergii*. and It is Immune Resistance Under Ammonia Stress. *Fish and Shellfish Immunology, 12*, 97-109.

Del'Duca, A., Cesar, E.D., & Abreu, C.P. (2015). Bacterial community of pond's water, sediment and in the guts of tilapia (*Oreochromis niloticus*) juveniles characterized by fluorescent in situ hybridization *technique. Aquac. Res, 46,* 707- 715.

Duangsawat, M. & Somsiri, J. (1985). *Water Properties and Analytical Methods for Fisheries Research*. Bangkok: Department of Fisheries. (in Thai)

Jueliang, P. (2011). *Application of Spore-forming Bacteria for Controlling Pathogenic Bacteria Vibrio harveyi in Litopenaeus vannamei Culture*. Master dissertation. Bangkok: Kasetsart University.(in Thai)

Limsuwan, C. & Chanratchakul, P. (2004). *Shrimp farming industry in Thailand*. Bangkok: Magic Publication Co., Ltd. (in Thai)

Lorsingkum T. (2011). *Evaluation of Isoeugenol as an Anesthetic for Pacific White Shrimp (Litopenaeus vannamei)*. Master dissertation. Bangkok: Kasetsart University. (in Thai)

Mamdoh, Y.J., Idres, A.A., Mamdouh, A.H., & Sambhu, C. (2019). Probiotics as alternative control measures in shrimp aquaculture: A review. *Journal of Applied Biology &Biotechnology*, *7*(3), 69-77.

Manjula, S., Saravana Bhavan, P., Karthik, M., Anitha, D., Kalpana, R. & Manjula T. (2018). Survival, Growth, Activities of Digestive Enzymes, Concentrations of Basic Biochemical Constituents and Competitive Exclusion of Pathogenic Bacteria in Bacillus Coagulans Supplemented Diet Fed Macrobrachium Rosenbergii Post-Larvae. *International Journal of Research Studies in Science, Engineering and Technology*, *12*, 9-22.

Nonwachai T. (2010). *Growth, survival and non-specific immune characteristics of pacific white shrimp (Litopenaeus vannamei) fed with algal meal containing diets and challenged with Vibrio harveyi*. Master dissertation. Bangkok: Kasetsart University. (in Thai)

Petjul, K., Kulvitit, K., Tankrathok, A., & Suebchompoo, P. (2018). A study of probiotic microorganisms from giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii* de Man) pond in Kalasin province. *KHON KAEN AGR. J.*, *46*(5), 955-964. (in Thai)

Petjul, K., Tankrathok, A.& Chaisemsaeng, P. (2019). Screening of Protease Producing Probiotic Bacteria of Giant Freshwater Prawn (*Macrobrachium rosenbergii* de Man) on Pond Culture in Kalasin Province. *Koch Cha Sarn Journal of Science*, *40*(2), 31-44. (in Thai)

Promnuan K. & Kiriratnikom S. (2018). Effect of Different Levels of *Bacillus licheniformis* Supplements in Diets on Growth Performance, Feed Utilization and Intestinal Bacteria of Hybrid Red Tilapia. *Thaksin.J.* , *21*(2), 43-50. (in Thai)

Sae-eiah, W. (2006). Effects of application of Bacillus sp. on water quality and yield of black tiger shrimp in Farming in low salinity water Master's thesis, Kasetsart University, Bangkok. (in Thai)

Somboon, M., Limsuwan, C., Chuchard, N. & Chanratchakul, P. (2009). Effect of three different groups of Bacillus on Vibrio spp. water quality and survival rate in larval rearing of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) In *Proceeding of 47th Kasetsart University Annual Conference: Fisheries*. (pp. 178-187). Bangkok: Kasetsart University. (in Thai)

Suwan, C., & Chitmanat, C. (2017). The application of probiotics for Tilapia culture. *Chiang Mai Veterinary Journal*, *15*(1), 15-24. (in Thai)

Suwanpinit, N. & Suwanpinit, P. (2009). *General Microbiology*. Bangkok: Chulalongkorn publishing house University. (in Thai)

Suwanthet, S. 2003. Techniques for *Giant Freshwater Prawn* hatching and nursery in Thailand. Bangkok: Department of Fisheries. (in Thai)

Tangkrock-olan, N. & Thongtiam, K. (2010). Effects of Salinity and Nitrite on Hemolymph Osmolality and Nitrite Uptake of Hemolymph of White- Leg Shrimp, *Litopenaeus vannamei* Boone, 1931. *Burapha Sci. J.* ,*15*(2), 20-28. (in Thai)

Trepolaksorn, P. (2020). *Study on Costs and Returns of Giant Freshwater Prawn Culture and Giant Freshwater Prawn with Pacific white Shrimp Culture in Suphanburi Province*. Satun: Satun Fisheries Provincial Office Department of Fisheries. (in Thai)

Wang, Y., Fu, L. & Lin J. (2012). Probiotic (*Bacillus coagulans*) Cells in the Diet Benefit the White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of Shellfish Research*, *31,* 885-860.

Wannapat, N. (2019). *Guidebook to* Freshwater prawn *breeding under biosecurity systems.* Freshwater Aquaculture Research and Development Division: Department of Fisheries. (in Thai)