วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ปีที่ 29 (ฉบับที่ 1) มกราคม – เมษายน พ.ศ. 2567
BURAPHA SCIENCE JOURNAL Volume 29 (No.1) January – April 2024 บทความวิจัย

ผลของ *Bacillus licheniformis* ต่อการเจริญเติบโต อัตราการรอดตาย และภูมิคุ้มกัน ในการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*)

Effect of *Bacillus licheniformis* on Growth, Survival Rate and Immune of Giant Freshwater Prawn (*Macrobrachium rosenbergii*)

มัสธูรา ละใบเด็น, ทัศนีย์ นลวชัย และ วิญญู บุญประเสริฐ*

Matthura Labaiden, Thasanee Nonwachai and Winyoo Boonprasert*

คณะเทคโนโลยีการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ ประเทศไทย

Faculty of Agricultural Technology and Agro-Industry, Rajamangala University of Technology Suvarnabhumi, Thailand

Received : 5 January 2024, Received in revised form : 26 March 2024, Accepted : 26 March 2024

Available online : 18 April 2024

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์และที่มา : กุ้งก้ามกรามเป็นสัตว์น้ำจืดที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจและมีราคาแพง การเลี้ยงกุ้งก้ามกรามที่หนาแน่นส่งผลให้กุ้งเจริญเติบโตช้า และเกิดโรคระบาดได้ง่าย ปัจจุบันมีการเลี้ยงกุ้งแบบชีวภาพโดยใช้จุลินทรีย์กลุ่ม *Bacillus* spp. ช่วยในการส่งเสริมการเจริญเติบโต และกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้ง การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของ *Bacillus licheniformis* ต่อการเจริญเติบโต อัตราการรอดตาย และภูมิคุ้มกัน ในการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*)

วิธีดำเนินการวิจัย : โดยใช้กุ้งก้ามกรามขนาด 5.23±0.007 กรัม อัตราความหนาแน่น 13 ตัว/บ่อ (25 ตัว/ตารางเมตร) ถังขนาด 0.52×1×0.42 เมตร วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design: CRD) โดยแบ่งเป็น 4 ชุดการทดลอง ๆ ละ 3 ซ้ำ ได้แก่ ชุดการทดลองที่ 1 อาหารสำเร็จรูป (ชุดควบคุม) ชุดการทดลองที่ 2, 3 และ 4 อาหารผสม *B. licheniformis* ปริมาณ 1, 5 และ 10 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ตามลำดับ เลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน บันทึกการเจริญเติบโต อัตราการรอดตาย และศึกษาภูมิคุ้มกัน

ผลการวิจัย : จากการศึกษาพบว่า การเจริญเติบโต และอัตราการรอดตายในการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามที่ได้รับอาหารผสม *B. licheniformis* ในชุดการทดลองที่ 4, 3 และ 2 มีการเจริญเติบโตด้านน้ำหนักเท่ากับ 11.71±0.29, 11.18±0.56 และ 10.41±0.71 กรัม ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ด้านภูมิคุ้มกันของกุ้งก้ามกรามที่ได้รับอาหารผสม *B. licheniformis* ในชุดการทดลองที่ 4 มีปริมาณเม็ดเลือดรวม และความสามารถในกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้งได้ดีกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

สรุปผลการวิจัย : จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่ากุ้งก้ามกรามที่ได้รับอาหารผสม *B. licheniformis* ในปริมาณ 10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโต อัตรารอดตาย และกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ได้ดีกว่าชุดควบคุมที่กินอาหารไม่ผสม *B. licheniformis*

คำสำคัญ : กุ้งก้ามกราม ; โพรไบโอติก ; บาซิลลัส ; ระบบภูมิคุ้มกัน

Abstract

Background and Objectives : Giant freshwater prawn are economic freshwater aquatic species. The intensive prawn culture affects on slow growth and disease outbreaks. Currently, there are biological shrimp farms using microorganism sush as *Bacillus* spp. for enhance shrimp growth and immune. The objective of this study is to determine effects of *Bacillus licheniformis* on growth survival rate and immune of *Macrobrachium rosenbergii* .

Methodology : Prawns (size 5.23±0.007 g) were stocked in 0.52×1×0.42 meters tanks at density 13 prawns/tank (25 prawns/m^2). The experiment was Completely Randomized Design (CRD) and divided in to 4 treatments. Each treatment had 3 replications. The first treatment was commercial pelleted feed (control), the 2^{nd}, 3^{rd} and 4^{th} treatments were commercial pelleted feed with *B. licheniformis* at concentration 1, 5 and 10 g/feed 1 kilograms respectively. The growth, survival rate and immune were recorded during culture for 60 days.

Main Results : Growth and survival rate of prawn in treatment 4, 3 and 2 fed with *B. licheniformis* were 11.71±0.29, 11.18±0.56, and 10.41±0.71 grams, respectively and significantly higher than the control group ($p<0.05$). For the prawn immunity, prawn fed with probiotic in treatment 4 had total hemocyte count and phagocytosis activity better than control group ($p<0.05$).

Conclusions : Prawn fed with diet containing *B. licheniformis* at concentration 10 g/feed 1 kilograms was able to enhance growth, survival rates and immune than the control group.

Keywords : giant freshwater prawn ; probiotics ; *Bacillus ssp.* ; immune system

***Corresponding author. E-mail** : matthura@hotmail.com

บทนำ

กุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) เป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของไทยที่ทำรายได้ให้กับประเทศ โดยในปี พ.ศ. 2565 ผลผลิตกุ้งก้ามกรามจากการเพาะเลี้ยงมีปริมาณ 44,756 ตัน คิดเป็นมูลค่า 8,430 ล้านบาท (Fishery statistics group, 2023) นอกจากนี้ยังมีการส่งออกผลิตภัณฑ์กุ้งก้ามกรามในช่วง 6 เดือนแรกของปี 2566 ไปตลาดต่างประเทศปริมาณ 1,846.5 ตัน คิดเป็นมูลค่า 212.8 ล้านบาท (Pimmadee, 2023) ทำให้มีการเพิ่มปริมาณการผลิตมากขึ้นกว่าเดิม วิธีการเลี้ยงส่วนใหญ่ที่นำมาใช้คือวิธีที่มีการลงทุนน้อย แต่เลี้ยงแบบหนาแน่น ส่งผลให้กุ้งมีอัตราการรอดต่ำ มีการเจริญเติบโตช้า มีสภาพแคระแกร็น ทำให้เกิดโรคระบาดได้ง่าย จึงทำให้มีการใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะเพื่อใช้ในการป้องกันและรักษาโรค ส่งผลให้มีการตกค้างของสารเคมีและยาในตัวกุ้ง ก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค (Labaiden *et al*., 2022) ปัจจุบันมีการเลี้ยงกุ้งแบบชีวภาพ โดยนำจุลินทรีย์โพรไบโอติกมาใช้ในการเลี้ยงกุ้ง จุลินทรีย์ที่สามารถนำมาใช้เป็นโพรไบโอติกได้แก่ *Lactobacillus* sp, *Bacillus* sp. และยีสต์ เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของกุ้ง ช่วยให้กุ้งมีสุขภาพสมบูรณ์แข็งแรง

สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคได้ นอกจากนี้การใช้จุลินทรีย์ในการเลี้ยงกุ้งยังเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม และเป็นทางเลือกเพื่อลดการใช้สารเคมี และยาปฏิชีวนะในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้ (Mamdoh *et al.,* 2019)

แบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* sp. เป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นแท่ง ย้อมติดสีแกรมบวก ทนต่อความร้อน สามารถสร้างเอนโดสปอร์ได้โดยสปอร์ของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. จะทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่าง ๆ ได้ดี มีความปลอดภัยเมื่อนำมาใช้กับสัตว์ และสัตว์น้ำ ซึ่งสามารถคัดแยกได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม เช่น ลำไส้กุ้ง (Kim *et al*., 2020) ระบบทางเดินอาหารของปลา (Santos *et al*., 2021) บ่อเลี้ยงกุ้งก้ามกราม (Petjul *et al*., 2019) เป็นต้น Boonyapakdee *et al*. (2021) ได้ทดลองศึกษาผลของการอนุบาลลูกปูม้าแยกในแก้วพลาสติกร่วมกับการเสริมโพรไบโอติก 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus subtilis, Bacillus licheniformis* และ*Lactobacillus plantarum* ในอาหารสำเร็จรูป ต่อการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายของปูม้าภายในระยะเวลาการทดลอง 5 สัปดาห์ พบว่า โพรไบโอติกทั้งสามสายพันธุ์ให้ผลในทิศทางบวกโดยส่งผลให้อัตราการเจริญเติบโต ได้แก่ ค่าเฉลี่ยน้ำหนักปูที่เพิ่มขึ้นต่อวัน (ADG), น้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น และความกว้างกระดองเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นมีความแตกต่างกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) โดยเฉพาะการเสริม *B. licheniformis* ส่งผลให้การเจริญเติบโตทั้งความยาวและน้ำหนักมีค่าเฉลี่ยมากกว่าชุด ควบคุมมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ มีการนำ *B. licheniformis* มาใช้ในการเลี้ยงปลาเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโต และกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลา เช่น ปลาตะเพียนขาว (*Barbodes gonionotus*) (Phinyo *et al*., 2018), ปลานิลแดง(*Oreochromis niloticus*) (Promnuan & Kiriratnikhom, 2018) นอกจากนี้ยังมีการใช้ *B. licheniformis* ในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนาไม พบว่า สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโต กระตุ้นภูมิคุ้มกัน และต้านทานเชื้อก่อโรค เช่น *Vibrio parahaemolyticus* ได้ (Amoah *et al*., 2020)

การนำโพรไบโอติกจากเชื้อ *B. licheniformis* มาใช้ในการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของกุ้ง ทำให้สุขภาพแข็งแรง มีความต้านทานโรคสูงขึ้น ซึ่งจะช่วยลดต้นทุนการผลิตกุ้ง และได้ผลผลิตกุ้งที่ปลอดจากสารเคมีตกค้าง นอกจากนี้ยังส่งผลดีต่อการส่งออกและสร้างความเชื่อมั่นให้กับผู้บริโภคอีกด้วย ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จะทำการศึกษาผลของโพรไบโอติกจากเชื้อ *B. licheniformis* ต่อภูมิคุ้มกัน การเจริญเติบโต และอัตราการรอดตายในการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการประยุกต์ใช้โพรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การศึกษาผลของ B. licheniformis ต่อการเจริญเติบโต อัตราการรอดตาย และภูมิคุ้มกันในการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม

1.1 การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely randomized design: CRD) โดยแบ่งเป็น 4 ชุดการทดลอง ๆ ละ 8 ซ้ำ โดยใช้สำหรับศึกษาผลของ *B. licheniformis* ต่อการเจริญเติบโต และอัตรารอดตายของกุ้งก้ามกราม จำนวน 4 ซ้ำ และใช้ศึกษาผลของ *B. licheniformis* ต่อระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งก้ามกราม จำนวน 4 ซ้ำ ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูป

ชุดการทดลองที่ 2 เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปผสม *B. licheniformis* 1 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 3 เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปผสม *B. licheniformis* 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 4 เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปผสม *B. licheniformis* 10 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม

1.2 การเตรียมสัตว์ทดลอง

นำกุ้งก้ามกรามที่มีสุขภาพดีปลอดจากโรคที่มีน้ำหนัก 5.23±0.007 กรัม จำนวน 416 ตัว จากฟาร์มเอกชน จังหวัดสุพรรณบุรี มาปรับสภาพในบ่อซีเมนต์ ขนาด 1.5×1.5×1 เมตร ให้อาหารวันละ 3 ครั้ง (เวลา 07.00 น. 13.00 น. และ 19.00 น.) ใช้เครื่องให้อากาศเพื่อควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำให้มีค่ามากกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ณ สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิเป็นระยะเวลา 7 วัน

1.3 การเตรียมเซลล์ B. licheniformis สำหรับใช้ผสมอาหารในการทดลอง ตามวิธีของ Salaipeth (2008)

เลี้ยงเชื้อ *B. licheniformis* ที่คัดแยกได้จากดินในบ่อเลี้ยงกุ้ง จากห้องปฏิบัติการโรคและปรสิตสัตว์น้ำ สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ ในอาหาร Nutrient broth ให้มีปริมาณเซลล์ที่ ระดับ 10^{10} CFU /มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่า ขยายปริมาณเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บเซลล์โดยนำเชื้อที่ได้ไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ที่ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ควบคุมที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และล้างเซลล์ด้วยน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นเติม skim milk powder 20 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเป็นสารตัวกลางในการผยุงเซลล์ให้รอดชีวิตลงในเซลล์ที่ปั่นแยก และผสมให้เข้ากัน นำเซลล์ที่ผสมกันแล้วไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ด้วยเครื่อง Freeze dry และนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

1.4 การเตรียมอาหารทดลอง

นำอาหารเม็ดสำเร็จรูปสำหรับกุ้งโปรตีน 37 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับ *B. licheniformis* ที่เตรียมได้จากข้อ 1.3 ในปริมาณ 1, 5 และ 10 กรัมต่อน้ำหนักอาหาร 1 กิโลกรัม จากนั้นเคลือบอาหารด้วยสารเหนียว (อัลฟ้า สตาชท์) 10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม โดยผสมกันให้ทั่ว ผึ่งให้แห้ง และบรรจุถุง เก็บไว้ในตู้เย็น

1.5 การศึกษาผลของ B. licheniformis ต่อการเจริญเติบโต และอัตรารอดตายของกุ้งก้ามกราม

คัดเลือกกุ้งก้ามกรามน้ำหนักเฉลี่ย 5.23±0.007 กรัม ที่มีสุขภาพแข็งแรงมาเลี้ยงในถังขนาด 0.52×1×0.42 เมตร จำนวน 16 ถัง ใส่กุ้งก้ามกรามจำนวนถังละ 13 ตัว (25 ตัว/ตารางเมตร) (Wannapat, 2019) ใส่สิ่งหลบซ่อน โดยใส่ท่อ PVC ขนาด 2.5 นิ้ว ตัดยาว 4.5 นิ้ว ใส่บ่อละ 10 อัน และให้อากาศตลอดเวลา ให้อาหารตามที่กำหนดไว้ในแต่ละชุดการทดลองวันละ 3 ครั้ง (เวลา 07.00 น. 13.00 น. และ 19.00 น.) ในอัตราการให้อาหาร 5 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักตัว บันทึกปริมาณอาหารที่ให้ ดูดตะกอนทุก ๆ 3 วัน และเปลี่ยนถ่ายน้ำออก 20 เปอร์เซ็นต์ ทุก 7 วัน ตลอดระยะเวลาการเลี้ยง 60 วัน ควบคุมคุณภาพน้ำโดยวัด pH ให้อยู่ในช่วง 7.5-8 ค่าอัลคาไลด์ ให้อยู่ในช่วง 120-150 มิลลิกรัม/ลิตร และค่าแอมโมเนียให้อยู่ในช่วง 0.02-0.06 มิลลิกรัม/ลิตร

สุ่มตัวอย่างกุ้งในแต่ละชุดการทดลองซ้ำละ 5 ตัว เพื่อชั่งน้ำหนัก วัดความยาว (Total length) และนับอัตรารอดตายของกุ้งก้ามกราม ก่อนเริ่มต้นการทดลองและทุก ๆ 15 วัน ตลอดระยะเวลาการทดลอง 60 วัน โดยเมื่อชั่งวัดเสร็จ

แต่ละครั้งนำกุ้งคืนสู่ถังทดลองเดิมแต่ละถัง หลังจากครบระยะเวลาการเลี้ยงนำข้อมูลที่ได้มาหาค่า น้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น (weight gain) ความยาวเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น (Length gain) อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน (average daily gain) อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (feed conversion ratio) และอัตรารอดตาย (survival rate) โดยมีสูตรการคำนวณ ดังนี้

น้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น (weight gain; กรัม)

= น้ำหนักเฉลี่ยเมื่อสิ้นสุดการทดลอง – น้ำหนักเฉลี่ยเมื่อเริ่มการทดลอง

ความยาวเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น (Length gain)

= ความยาวเฉลี่ยเมื่อสิ้นสุดการทดลอง – ความยาวเฉลี่ยเมื่อเริ่มการทดลอง

อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน (average daily gain; กรัม/ตัว/วัน)

$$= \frac{\text{น้ำหนักสุดท้าย-น้ำหนักเริ่มต้น}}{\text{จำนวนวันที่เลี้ยง}}$$

อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (feed conversion ratio; FCR)

$$= \frac{\text{น้ำหนักอาหารที่ใช้ไป (กรัม)}}{\text{น้ำหนักกุ้งที่เพิ่ม (กรัม)}}$$

อัตรารอดตาย (survival rate; เปอร์เซ็นต์)

$$= \frac{\text{จำนวนกุ้งที่เหลือรอดเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (ตัว)}\times 100}{\text{จำนวนกุ้งเมื่อเริ่มการทดลอง (ตัว)}}$$

1.6 การศึกษาผลของ B. licheniformis ต่อระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งก้ามกราม

สุ่มตัวอย่างกุ้งในแต่ละชุดการทดลองซ้ำละ 3 ตัว เพื่อดูดเลือดกุ้งทุก 15 วัน โดยเมื่อดูดเลือดกุ้งเสร็จแต่ละครั้งนำกุ้งคืนสู่ถังทดลองเดิมแต่ละถัง จากนั้นนำตัวอย่างเลือดไปทำการวิเคราะห์ปริมาณของเม็ดเลือดรวม กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือด และกิจกรรมของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้ง (phagocytic activity) โดยมีวิธีการดังนี้

1.6.1 การตรวจนับปริมาณเซลล์เม็ดเลือดรวมของกุ้ง ตามวิธีของ Nonwachai (2012)

บันทึกข้อมูลการเก็บเม็ดเลือดของกุ้งก้ามกรามโดยทำการสุ่มตัวอย่างกุ้งแต่ละชุดการทดลองซ้ำละ 3 ตัว เพื่อดูดเลือดกุ้งจากบริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 3 ของกุ้งแต่ละตัวด้วยเข็มฉีดยาขนาด 24G และกระบอกฉีดยาขนาด 3 มล. ซึ่งภายในบรรจุสารป้องกันเลือดแข็งตัว (anticoagulant) โดยผสม 30% Tri-sodium citate ลงไปด้วยในอัตราส่วน 1: 2 (ใช้เลือด 1 มล. : 30% tri-sodium citrate 1 มล.) หลังจากนั้นใช้ micropipette ดูดสารละลายเลือดกุ้งจำนวน 20 ไมโครลิตร นำไปนับจำนวนเม็ดเลือดทั้งหมด โดยใช้สไลด์นับเม็ดเลือด (hemacytometer) และคำนวณปริมาณเม็ดเลือดที่นับได้โดยรายงานเป็นจำนวนเซลล์/มล. และรายงานเป็นเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือด

1.6.2 การทดสอบทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้ง ตามวิธีของ Supamattaya et al. (2020)

เตรียมสารละลายเชื้อ *Aeromonas hydrophila* โดยนำเชื้อที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วมาปั่นล้างด้วยน้ำเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นเทส่วนใสทิ้งแล้วนำตะกอนที่ได้มาละลายในน้ำเกลือปลอดเชื้อที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยเตรียมน้ำเกลือประมาณ 10 มล. (หรือมากจนเกินพอสำหรับใช้ในการทดลองครั้งนั้น ๆ) จากนั้นนำสารละลายเชื้อที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร ให้ได้ค่า OD ประมาณ 0.08-0.1 บันทึกค่า OD ที่เลือกใช้ เจาะเลือดกุ้งแต่ละตัวจากแอ่งเลือดบริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 3 โดยใช้สารป้องกันการแข็งตัวของเลือดในอัตราส่วน 1: 2 (ใช้เลือด 1 มล. : 30% tri-sodium citrate 1 มล.) หลังจากนั้นนำมาแยกซีรั่มออกจากเม็ดเลือดกุ้ง โดยหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 1,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใสด้านบนมาใช้นำซีรั่มมาเจือจางโดยใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวเจือจางในระดับ 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 และ 1:32 โดยปรับปริมาตรในการเจือจางให้ได้หลอดละ 0.5 มล. นำสารละลายเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ มาเติมในหลอดทดลองที่เจือจางซีรั่มในแต่ละความเข้มข้นไว้แล้ว เติมสารละลายเชื้อแบคทีเรียปริมาณ 0.1 มล. และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำส่วนผสมแต่ละหลอดมานับปริมาณเชื้อแบคทีเรียทำการเจือจางส่วนผสมแต่ละหลอด โดยใช้น้ำเกลือปลอดเชื้อที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ใช้วิธี spread plate ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) จดบันทึกค่าของการเจือจางซีรั่มที่สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียลงได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 3 ชั่วโมง โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใช้น้ำเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ 0.5 มล. รวมกับสารละลายแบคทีเรีย 0.1 มล.

1.6.3 กิจกรรมของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเซลล์เม็ดเลือดกุ้ง ตามวิธีของ Itami et al. (1994)

เจาะเลือดกุ้งแต่ละตัวจากแอ่งเลือดบริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 3 โดยใช้สารป้องกันการแข็งตัวของเลือด ในอัตราส่วน 1:2 (ใช้เลือด 1 มล. : 30% tri-sodium citrate 1 มล.) หลังจากนั้นนำมาแยกซีรั่มออกจากเม็ดเลือดกุ้ง โดยหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อแยกเซลล์เม็ดเลือดกุ้ง โดยนำส่วนใสด้านบนทิ้ง ทำการล้างตะกอนเม็ดเลือด โดยเติม shrimp saline 2-3 มล. โดยใช้ pipette ดูดขึ้นลง เบา ๆ เพื่อให้สารละลายเข้ากัน หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที โดยมีการควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส โดยทำเช่นนี้ 2 ครั้ง ละลายตะกอนเม็ดเลือดใน shrimp saline 1 มิลลิลิตร และ ใช้ pipette ดูดขึ้นลงเบา ๆ เพื่อให้สารละลายเข้ากัน

นำสารละลายที่ได้ผสมกับ trypan blue ในอัตราส่วน 1:1 โดยใช้ trypan blue 50 ไมโครลิตร และสารละลายเม็ดเลือด 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำมา 50 ไมโครลิตร นับจำนวนเม็ดเลือดกุ้งใน hemocytometer แล้วนำมาคำนวณให้ได้เซลล์ประมาณ 1 × 10^6 เซลล์ต่อมล. นำสารละลายเซลล์เม็ดเลือดปริมาตร 200 ไมโครลิตร เลี้ยงบน cover glass โดยกระจายทิ้ง ไว้ 20 นาที หยดสารละลาย heat-killed yeast 2 มิลลิลิตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วย shrimp saline 5 ครั้ง หยดน้ำยา fixative 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ทิ้งให้แห้ง 20-60 นาที ย้อมด้วยสี dip quick นำไปวิเคราะห์ข้อมูลโดยการนับจำนวนเซลล์ โดยสุ่มนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดทั้งหมด 200 เซลล์ ในแต่ละ cover glass นับเซลล์เม็ดเลือดที่กินเซลล์ยีสต์ และไม่กินเซลล์ยีสต์เข้าไป

2. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ย One Way Analysis of Variance ตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด และ เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างชุดทดลอง โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ผลการวิจัย

1.1 การศึกษาผลของ B. licheniformis ต่อการเจริญเติบโต และอัตรารอดตายของกุ้งก้ามกราม

จากการศึกษาผลของโพรไบโอติกในปริมาณที่แตกต่างกันในการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามพบว่า เมื่อเลี้ยงกุ้งก้ามกรามครบ 60 วัน กุ้งก้ามกรามที่ได้กินอาหารผสม *B. licheniformis* ปริมาณ 10 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีน้ำหนักเฉลี่ยสูงที่สุดเท่ากับ 11.71±0.29 กรัม ไม่แตกต่างกับกุ้งที่ได้กินอาหารผสม *B. licheniformis* ปริมาณ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ซึ่งมีน้ำหนักเฉลี่ยเท่ากับ 11.18±0.56 กรัม ($p>0.05$) แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับกุ้งก้ามกรามที่กินอาหารผสม *B. licheniformis* ปริมาณ 1 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม และอาหารไม่ผสม *B. licheniformis* ซึ่งมีน้ำหนักเฉลี่ยเท่ากับ 8.92±0.51 กรัม และ 10.44±0.71 กรัม ตามลำดับ ($p<0.05$)

กุ้งก้ามกรามที่กินอาหารผสม *B. licheniformis* ปริมาณ 10 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีความยาวเฉลี่ยสูงที่สุดเท่ากับ 10.13±0.32 เซนติเมตร ไม่แตกต่างกับกุ้งที่กินอาหารผสม *B. licheniformis* ปริมาณ 1 และ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ซึ่งมีความยาวเฉลี่ยเท่ากับ 9.87±0.24 และ 9.93±0.17 เซนติเมตร ตามลำดับ ($p>0.05$) แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกุ้งก้ามกรามที่กินอาหารสำเร็จรูปไม่ผสม *B. licheniformis* ซึ่งมีความยาวเฉลี่ยเท่ากับ 9.36±0.49 เซนติเมตร ($p<0.05$)

กุ้งก้ามกรามที่กินอาหารผสม *B. licheniformis* ปริมาณ 10 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีน้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นดีที่สุด มีค่าเท่ากับ 6.48±0.31 กรัม แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับกุ้งก้ามกรามที่กินอาหารผสม *B. licheniformis* ปริมาณ 1 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม และกินอาหารไม่ผสม *B. licheniformis* ซึ่งมีน้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นเท่ากับ 5.21±0.1 กรัม และ 3.66±0.43 กรัม ตามลำดับ ($p<0.05$) ความยาวเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น และอัตราการเจริญเติบโตตัวต่อวัน (ADG) ในทุกชุดการทดลองไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) ส่วนอัตราการแลกเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (FCR) ของกุ้งก้ามกรามที่กินอาหารผสม

B. licheniformis ปริมาณ 10, 5 และ 1 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีค่าเท่ากับ 1.01±0.06 , 1.20±0.14 และ 1.30±0.09 ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกุ้งก้ามกรามที่กินอาหารไม่ผสม *B. licheniformis* ที่มีค่าเท่ากับ 1.76±0.29 ($p<0.05$) อัตราการรอดตายของกุ้งก้ามกรามที่กินอาหารไม่ผสม *B. licheniformis* และผสม *B. licheniformis* ในปริมาณ 1, 5 และ 10 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีค่าเท่ากับ 91.11±1.15, 93.33±1.15, 95.56±058 และ 95.56±0.58 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) (Table 1)

Table 1 The growth performance and survival rates of giant freshwater prawn fed experimental diets for 60 days

parameter	Treatment			
	1	2	3	4
Initial weight (g/body)	5.26±0.12^{a}	5.20±0.01^{a}	5.24±0.10^{a}	5.23±0.04^{a}
Final weight (g/body)	9.92±0.51^{c}	10.41±0.71^{b}	11.18±0.56^{ab}	11.71±0.29^{a}
Weight gain (g)	3.66±0.43^{c}	5.21±0.71^{b}	5.94±0.66^{ab}	6.48±0.31^{a}
Initial length (cm)	8.27±0.04^{a}	8.25±0.06^{a}	8.25±0.05^{a}	8.29±0.09^{a}
Final length (cm)	9.36±0.49^{b}	9.87±0.24^{ab}	9.93±0.17^{ab}	10.13±0.32^{a}
Length gain (cm)	1.10±0.46^{a}	1.62±0.18^{a}	1.67±0.13^{a}	1.84±0.37^{a}
Average daily gain (g./body/day)	0.06±0.01^{a}	0.09±0.01^{a}	0.10±0.01^{a}	0.11±0.01^{a}
Feed conversion ratio (FCR)	1.76±0.29^{b}	1.30±0.09^{a}	1.20±0.14^{a}	1.01±0.06^{a}
Survival rate (%)	91.11±1.15^{a}	93.33±1.15^{a}	95.56±058^{a}	95.56±0.58^{a}

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

1.2 การศึกษาประสิทธิภาพของโพรไบโอติคต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งก้ามกราม

1. ปริมาณเม็ดเลือดรวม (Total hemocytes count)

หลังจากเลี้ยงกุ้งก้ามกรามด้วยอาหารผสม *B. licheniformis* ในปริมาณที่ต่างกัน เป็นระยะเวลา 60 วัน พบว่ากุ้งก้ามกรามที่กินอาหารผสม *B. licheniformis* ปริมาณ 10 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีปริมาณเม็ดเลือดรวมเฉลี่ยสูงที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 3.13±0.31 x 10^{6} cell/ml แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับ กุ้งก้ามกรามที่กินอาหารผสม *B. licheniformis* ปริมาณ 5 และ 1 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม และกินอาหารไม่ผสม *B. licheniformis* โดยมีปริมาณเม็ดเลือดรวมเฉลี่ยเท่ากับ 3.05±0.27, 3.01±0.21 และ 2.63±0.16 x 10^{6} cell/ml ตามลำดับ (Table 2)

Table 2 Total hemocytes count (x10^6 cell/ml) of giant freshwater prawn fed experimental diets for 60 days

Treatment / Day	Total hemocytes count (x10^6 cell/ml)				
	0	15	30	45	60
1 (Control)	2.12±0.29^{a}	2.27±0.32^{b}	2.39±0.18^{b}	2.51±0.23^{c}	2.63±0.16^{c}
2 (1 g/ Kg feed)	2.21±0.34^{a}	2.39±0.34^{ab}	2.53±0.23^{ab}	2.76±0.27^{b}	3.01±0.21^{b}
3 (5 g/ Kg feed)	2.25±0.52^{a}	2.50±0.29^{ab}	2.61±0.32^{a}	2.98±0.24^{a}	3.05±0.27^{b}
4 (10 g/ Kg feed)	2.31±0.24^{a}	2.62±0.35^{a}	2.63±0.27^{a}	3.03±0.24^{a}	3.13±0.31^{a}

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

2. กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของเม็ดเลือด (Bactericidal activity)

หลังจากเลี้ยงกุ้งก้ามกรามด้วยอาหารผสม *B. licheniformis* ในปริมาณที่ต่างกัน เป็นระยะเวลา 60 วัน พบว่ากุ้งก้ามกรามที่กินอาหารผสม *B. licheniformis* ปริมาณ 1, 5 และ 10 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีค่าอัตราส่วนการเจือจางต่ำที่สุดของซีรัมที่สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรีย 50 เปอร์เซ็นต์เท่ากับ 1 : 4 ซึ่งดีกว่ากุ้งก้ามกรามที่กินอาหารสำเร็จรูปไม่ผสม *B. licheniformis* โดยมีค่าอัตราส่วนการเจือจางต่ำที่สุดของซีรัมที่สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรีย 50 เปอร์เซ็นต์เท่ากับ 1 : 2 (Table 3)

Table 3 Bactericidal activity of giant freshwater prawn fed experimental diets for 60 days

Treatment / Day	Bactericidal activity				
	0	15	30	45	60
1 (Control)	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2
2 (1 g/ Kg feed)	1:2	1:2	1:4	1:4	1:4
3 (5 g/ Kg feed)	1:2	1:2	1:4	1:4	1:4
4 (10 g/ Kg feed)	1:2	1:2	1:4	1:4	1:4

3. กิจกรรมของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้ง (Phagocytotic activity)

หลังจากเลี้ยงกุ้งก้ามกรามด้วยอาหารผสม *B. licheniformis* ในปริมาณที่ต่างกัน เป็นระยะเวลา 60 วัน พบว่ากุ้งก้ามกรามที่กินอาหารผสม *B. licheniformis* ปริมาณ 10 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีกิจกรรมของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้งสูงที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 22.13±1.77 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กุ้งก้ามกรามที่กินอาหารผสม *B. licheniformis* ปริมาณ 5 และ1 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม และกินอาหารไม่ผสม *B. licheniformis* ซึ่งมีค่าเฉลี่ยกิจกรรมของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้งเท่ากับ 20.13±1.77, 19.20±1.66และ 15.33±2.23 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Table 4)

Table 4 Phagocytotic activity (%) of giant freshwater prawn fed experimental diets for 60 days

Treatment / Day	Phagocytotic activity (%)				
	0	15	30	45	60
1 (Control)	10.00±1.85^{a}	12.00±1.85^{a}	13.60±2.41^{b}	14.67±2.35^{c}	15.33±2.23^{c}
2 (1 g/ Kg feed)	10.53±1.77^{a}	12.67±2.09^{a}	15.20±2.11^{a}	17.40±1.68^{b}	19.20±1.66^{b}
3 (5 g/ Kg feed)	10.13±1.77^{a}	12.53±1.77^{a}	16.13±1.60^{a}	18.00±1.69^{ab}	20.13±1.77^{b}
4 (10 g/ Kg feed)	10.40±1.72^{a}	12.80±1.47^{a}	16.67±1.95^{a}	19.07±1.67^{a}	22.13±1.77^{a}

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

วิจารณ์ผลการวิจัย

แบคทีเรียในตระกูล *Bacillus* spp. เข้ามามีบทบาทอย่างมากในอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้ง ซึ่งมีหน้าที่ในการใช้เป็นโพรไบโอติกเพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยอาหาร ทำให้กุ้งโตเร็ว หรือใส่ลงในน้ำ เพื่อใช้ย่อยสลายสารอินทรีย์ในบ่อกุ้ง ทำหน้าที่บำบัดน้ำเสียหรือให้กุ้งกินเพื่อใช้ข่มเชื้อแบคทีเรียที่เป็นอันตราย เป็นตัวสำคัญของสารเสริมชีวนะในกุ้งโดยนำมาทดแทนการใช้สารเคมีฆ่าเชื้อในการควบคุมบำบัด และรักษาคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้ง (Liu *et al.*, 2012; Monier *et al.*, 2023) จากการศึกษาผลของ *B. licheniformis* ที่ผสมในอาหารในปริมาณที่ต่างกัน ต่อการเจริญเติบโต และอัตราการรอดตายของกุ้งก้ามกรามเป็นระยะเวลา 60 วัน ในครั้งนี้ พบว่า กุ้งก้ามกรามที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *B. licheniformis* 10 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม (ชุดการทดลองที่ 4) มีการเจริญเติบโตด้านน้ำหนักเฉลี่ยเท่ากับ 11.71±0.29 กรัม และน้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น เท่ากับ 6.48±0.31 กรัม ซึ่งดีกว่าชุดควบคุมที่ไม่ได้เลี้ยงด้วยอาหารผสม *B. licheniformis* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) สอดคล้องกับการศึกษาของ Abarike *et al.*, (2018) ที่พบว่า การให้อาหารปลานิลที่ผสม *B. licheniformis* 10 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของปลานิลได้ดี และเมื่อเสริม *B. licheniformis* ในความเข้มข้นระดับต่างๆ คือ 10^{5} 10^{6} 10^{7} และ 10^{8} CFU/กิโลกรัมอาหาร ในอาหารปลานิลแดง เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ผสมโพรไบโอติก พบว่า ปลานิลแดงหลังจากได้รับอาหารเสริม *B. licheniformis* ที่ระดับความเข้มข้น 10^{5} CFU/กิโลกรัมอาหาร มีการเจริญเติบโต การใช้ประโยชน์จากอาหารสูงกว่าอาหารทดลองอื่นๆ (Promnuan, & Kiriratnikhom, 2018) และเมื่อผสม *B. licheniformis* ร่วมกับ *B. subtilis* ปริมาณ 1.5×10^{6} CFU/กรัม ในอาหารให้กุ้งขาวแวนาไมกิน และเลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน พบว่า กุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสม *B. licheniformis* ร่วมกับ *B. subtilis* มีการเจริญเติบโตดีกว่าชุดควบคุมที่กินอาหารไม่ผสมโพรไบโอติกทั้ง 2 ชนิด และกุ้งที่ได้รับอาหารผสม *B. licheniformis* ยังมีความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดีอีกด้วย (Abdollahi-Arpanahi *et al.*, 2018) นอกจากนี้ Chen *et al.*, (2020) ได้ทดลองเลี้ยงกุ้งขาวแวนาไมให้กินอาหารผสม *B.licheniformis* กับ mannan oligosaccharide เป็นระยะเวลา 60 วัน พบว่า กุ้งขาวแวนาไมที่ได้รับอาหารผสม *B. licheniformis* กับ mannan oligosaccharide มีการเจริญเติบโตและมีการแสดงออกของยีนที่กระตุ้นภูมิคุ้มกัน ได้แก่ catalase (CAT), glutothion

peroxidase (GPX), superoxide dismutase (SOD), penaeidin -3a (Pen-3a) และ heat shock protein (Hsp-70) ดีกว่าชุดควบคุมที่กินอาหารไม่ผสมโพรไบโอติก

จากผลการศึกษาด้านระบบภูมิคุ้มกันครั้งนี้แสดงให้เห็นว่ากุ้งก้ามกรามที่ได้รับอาหารผสม *B. licheniformis* ในอัตราส่วนที่แตกต่างกันส่งผลให้กุ้งก้ามกรามมีระบบภูมิคุ้มกันที่ดีกว่าชุดควบคุม โดยเฉพาะกุ้งก้ามกรามที่ได้กินอาหารผสม *B. licheniformis* ปริมาณ 10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีปริมาณเม็ดเลือดรวม ความเข้มข้นของซีรัมของกุ้งก้ามกรามที่สามารถลดปริมาณเชื้อ *A. hydrophila* และกิจกรรมของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้ง ดีที่สุด สอดคล้องกับการศึกษาของ Gobi *et al*. (2018) ที่พบว่า การเสริม *B. licheniformis* ในอาหาร 10^7 CFU/g ให้ปลาหมอเทศกินสามารถต้านทานเชื้อ *A. hydrophila* ได้ Li *et al*. (2007) รายงานว่าการเสริมจุลินทรีย์ *B. licheniformis* ในอาหารกุ้งขาว พบว่า ช่วยทำให้ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ในทางเดินอาหารกุ้งลดลง และยังมีผลทำให้ total hemocyte counts, phenoloxidase และ superoxide dismutase activities ของกุ้งสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่า *B. licheniformis* (DAB1) และ *Pseudomonas aeruginosa* (DAP1) มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในกุ้งอินเดีย (*Fenneropenaeus indicus*) และยังพบว่า เชื้อ DAB1 และ DAP1 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *V. parahaemolyticus* มากกว่าสายพันธุ์อื่น (Vinoj *et al*., 2013) ทั้งนี้เนื่องจาก *Bacillus* spp. เป็นจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะแบคเทอริโอซิน (Bacteriocin) ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก โดยมีกลไกในการสร้างสารยับยั้งเชื้อจุลชีพได้ 4 กลุ่มดังนี้ 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 (Jueliang, 2011) นอกจากนี้ *Bacillus* spp. ยังมีความสามารถในการย่อยโปรตีนที่มีโครงสร้างซับซ้อนที่ย่อยสลายได้ยาก เช่น เคราติน (keratin) ได้ดี (Cladera-Olivera *et al*., 2004; Andriani *et al*., 2017) นอกจากนี้ *Bacillus* ssp. ยังผลิตเอนไซม์อีกหลายชนิด เช่น ไลเปส (Lipase), อะไมเลส (Amylase), ซูเครส (Sucrase), โปรติเอส (Protease) และ เปปติเดส (Peptidase) เป็นต้น ซึ่งเอนไซม์ที่หลั่งออกมาเหล่านี้สามารถยับยั้งแบคทีเรียในกลุ่มแกรมลบได้ (Arguelles-Arias *et al*., 2009)

จากการศึกษาครั้งนี้จะเห็นว่ากุ้งก้ามกรามที่กินอาหารผสม *B. licheniformis* มีน้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น อัตราการแลกเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ อัตราการรอดตาย ปริมาณเม็ดเลือดรวม กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของเม็ดเลือด และกิจกรรมของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้งได้ดีกว่ากุ้งก้ามกรามที่กินอาหารในชุดควบคุมที่ไม่ผสม *B. licheniformis* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ทั้งนี้ควรมีการศึกษาการใช้ *B. licheniformis* ร่วมกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นในการศึกษาครั้งต่อไป เนื่องจากมีรายงานว่าการใช้แบคทีเรียโพรไบโอติก โดยเฉพาะกลุ่มสร้างสปอร์ (combination of spore forming bacteria) สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้สูงกว่าการ ใช้เชื้อเพียงชนิดเดียว (Jueliang, 2011) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

สรุปผลการวิจัย

กุ้งก้ามกรามที่ได้กินอาหารผสม *B. licheniformis* ปริมาณ 10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม สามารถเพิ่มการเจริญเติบโต อัตราการรอดตาย ได้ดีกว่ากุ้งก้ามกรามที่กินอาหารในชุดควบคุมที่ไม่ผสม *B. licheniformis* และยังสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้านปริมาณเม็ดเลือดรวม กิจกรรมของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดได้ดีกว่าชุดการทดลองที่กินอาหารผสม *B. licheniformis* ปริมาณอื่นๆ อีกด้วย

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับงบประมาณสนับสนุน “งบประมาณสนับสนุนงานมูลฐาน (Fundamental Fund) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2565 จากกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม” เลขทะเบียนการอนุมัติให้ ดำเนินการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ (คกส.มทร.สุวรรณภูมิ) ปี 2565 เลขที่ IAU-RUS65-02

เอกสารอ้างอิง

Abarike, E. D., Cai, J., Lua, Y., Yu, H., Chen, L., Jian, J., Tang, J., Jun, L., & Kuebutornye F. K.A. (2018). Effects of a commercial probiotic BS containing *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* on growth, immune response and disease resistance in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, *82*, 229–238

Abdollahi-Arpanahi, D., Soltani, E., Jafaryan, H., Soltani, M., Naderi-Samani, M., & Campa-Córdovae, A. I. (2018). Efficacy of two commercial and indigenous probiotics, *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* on growth performance, immuno-physiology and resistance response of juvenile white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*, *496*(1), 43-49

Amoah, K., Dong, X., Tan, B., Zhang, S., Chi, S., Yang, Q., Liu, H., Yang, Y., & Zhang, H. (2020). Administration of probiotic *Bacillus licheniformis* induces growth, immune and antioxidant enzyme activities, gut microbiota assembly and resistance to *Vibrio parahaemolyticus* in *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition*, *26*(5), 1-19.

Andriani, Y., Safitri, R., Rochima, E., & Fakhrudin, S. D. (2017). Characterization of *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* potentials as probiotic bacteria in Vanamei shrimp feed (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931). *Nusantara Bioscience*, *9*(2), 188-192

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.

Boonyapakdee, A., Boonnom, S., Silarudee, K., Silarudee, S., & Limheng, K. (2021). The effects of probiotics supplementation on growth and survival rate of blue swimming crablets (*Portunus pelagicus*). *Khon kaen Agriculture Journal Suppl*, *49*(1), 140-144 (in Thai)

Chen M., Chen, X.Q., Tian, L.X., Liu, Y.J. & Niu, J. (2020). Beneficial impacts on growth, intestinal health, immune responses and ammonia resistance of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed dietary synbiotic (mannan oligosaccharide and *Bacillus licheniformis*). *Aquaculture Reports*, 17-100408

Cladera-Olivera, F., Caron, G.R., & A. Brandelli. (2004). Bacteriocin-like substance production by *Bacillus licheniformis* strain P40. *Microbiology*, *38*(4), 251-256

Fishery Statistics Group. (2023). *Statistics of freshwater aquaculture production 2022*. Fisheries development policy and planning division. Department of fisheries. No. 9/2023. (in Thai)

Gobi, N., Vaseeharan B., Chenb J.C., Rekhaa, R., Vijayakumar S., Anjugam, M., & Iswarya, A. (2018). Dietary supplementation of probiotic *Bacillus licheniformis* Dahb1 improves growth 2 performance, mucus and serum immune parameters, antioxidant enzyme activity as well as 3 resistances against *Aeromonas hydrophila* in tilapia *Oreochromis mossambicus. Fish & Shellfish Immunology*, *74*, 501-508

Itami, T., Takahashi, Y., Tsuchihira, E., Igasu , H., & Kondo, M. (1994). Enhancement of disease resistance of Kuruma prawn *Penaeus japonicus* and increase in phagocytic activity of prawn hemocytes after oral administration of B-1,3-glucan (*Schizophyllan*). In *Proceeding of the Third Asian Fisheries Forum Singapore*. (pp. 375-378). The Asian Fisheries Society Manila, Philippines.

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)

Kim, Y. O., Mahboob, S., Viayaraghavan, P., Biji, D., Al-Ghanim, Al-Misned, K. A., F., & Kim, H. (2020). Growth promoting activity of *Penaeus indicus* by secondary metabolite producing probiotic bacterium *Bacillus subtilis* isolated from the shrimp gut. *Journal of King Saud University – Science*, *32*(2), 1641-1646.

Labaiden, M., Nonwachai, T., Boonprasert, W., & Longprig, T. (2022). Effect of probiotics on growth, survival Rate and resistance to *Aeromonas* sp. in rearing of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). *Burapha Science Journal*, *28*(2), 1285-1302. (in Thai)

Li, K., Zheng,T., Tian, Y., Xi, F., Yuan, J., Zhang , G., & Hong, H.. (2 0 0 7). Beneficial effects of *Bacillus licheniformis* on the intestinal microflora and immunity of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *biotechnology letter*, *29*, 525-530

Liu C-H., Chiu C-H., Wang S-W., & Cheng W. (2012). Dietary administration of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, enhances the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper (*Epinephelus coioides*). *Fish & Shellfsh Immunology, 33*(4), 699–706

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.

Monier,M. N., Kabary, H., Elfeky, A., Saadony, S., Abd El-Hamed, N. N. B., Eissa, M. E. H., & Eissa, E.S.H. (2023). The effects of *Bacillus* species probiotics (*Bacillus subtilis* and *B. licheniformis*) on the water quality, immune responses, and resistance of white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) against *Fusarium solani* infection. *Aquaculture International*, *31*(6), 3437–3455

Nonwachai, T. (2012). *Effect of Dissolved oxygen, ammonia and pH level on feed intake, growth, survival, non-specific immune characteristic of Pacific white shrimp (Litopenaeus vavvamei) and challenged with Vibrio harveyi.* Thesis of Doctor of philosophy (Fisheries Science). Kasetsart university. Bangkok. (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)

Phinyo, M., Thinjan, P., & Inyawiler, W. (2018). Use of Coconut Residue and *Bacillus licheniformis* in Feed for Silver Barb. *Burapha Science Journal*, *23*(2), 1165-1177. (in Thai)

Pimmadee, S. (2023). *Situation of giant freshwater prawn and products in the first 6 months of 2023*. Fisheries Economy group, Fisheries development policy and planning division. Department of fisheries. (in Thai)

Promnuan, K., & Kiriratnikhom, 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 University Journal*, *21*(2), 43-50. (in Thai)

Salaipeth, L. (2008). *Development of probiotic product for application in white shrimp (Litopenaeus vannamei).* The master thesis of science in biotechnology, Prince of Songkla University.

Santos, R. A., Oliva-Teles, A., Pousão-Ferreira, P., Jerusik, R., Saavedra, M.J., Enes, P., & Serra, C. R. (2021). Isolation and characterization of fish-gut *Bacillus* spp. as source of natural antimicrobial compounds to fight aquaculture bacterial diseases. *Marine Biotechnology*, *23*(2), 276-293.

Supamattaya, K., Raungsri, J., Kiriratnikom, S., & Suanyuk, N. (2020). The immune system in black tiger shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius :VI, Effect of diseases on immuno-physiological function and blood components in black tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius) *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, *22* (Suppl.), 615-621 (in Thai)

Vinoj, G., Vaseeharan, B., DavidJayaseelan, B., Rajakumaran, P., & Ravi, C. (2013). Inhibitory effects of *Bacillus licheniformis* (DAB1) and *Pseudomonas aeruginosa* (DAP1) against *Vibrio parahaemolyticus isolated* from *Fenneropenaeus indicus. Aquaculture*, *21*, 1121-1135.

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