

ประสิทธิภาพของแบคทีเรียแลคติก ต่อการเจริญเติบโต การรอดตาย และ ปริมาณแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ในลำไส้ของกุ้งขาวแวนนาไมหลังได้รับเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ในห้องปฏิบัติการ

Efficacy of Lactic Acid Bacteria on growth survival and total number of *Vibrio* spp. in the intestine of Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) after challenged with *Vibrio parahaemolyticus* in laboratory condition

อภิวัฒน์ เหลื่อมสมบุญ¹, อรุณทัย คีตะนันท์¹, พุทธชา พันธุ์สวัสดิ์,
กนกวรรณ เชิดเกียรติพล¹, นิตี ชูเชิด^{1*} และ พงศ์เชษฐ พิชิตกุล²

Aphiwat Lueamsomboon¹, Arunothai keetanon¹, Putsucha Phansawat¹,

Kanokwan Cherdkeattipol¹, Niti chuchrid^{1*} and Phongchate Pichitkul²

บทคัดย่อ: การศึกษาครั้งนี้แบ่งออกเป็น 6 ชุดการทดลอง (ชุดละ 3 ซ้ำ) ใช้กุ้งระยะโพสลาร์วา 12 มาเลี้ยงในถังไฟเบอร์
ขนาด 500 ลิตรอัตราความหนาแน่น 60 ตัว ด้วยอาหารสำเร็จรูปที่ผสม *Lactobacillus plantarum* ซึ่งทำให้ตายด้วย
ความร้อน ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน 3 ระดับคือ 0 (กลุ่มควบคุม), 200 และ 500 พีพีเอ็มทุกวันวันละ 4 มื้อ หลังจาก
60 วัน พบว่าน้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งที่เลี้ยงด้วย *L. plantarum* ที่ระดับ 200 และ 500 พีพีเอ็มมีความแตกต่างกับกลุ่ม
ควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) นอกจากนี้ยังพบมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ระหว่าง
อัตราการรอดตายและอัตราเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (FCR) ของกุ้งขาวแวนนาไมที่เสริมด้วย *L. plantarum* ในอัตราความ
เข้มข้น 200 และ 500 พีพีเอ็มกับกุ้งกลุ่มควบคุมสำหรับการทดสอบความทนทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. จำนวน 30 ตัว
จากแต่ละถังจากการทดลองแรกมาเลี้ยงในถังใหม่ โดยชุดการทดลองที่ 2, 4 และ 6 ใส่เชื้อ *Vibrio parahaemolyticus*
(TISTR 1596) ในปริมาณ 10^6 CFU/ml. หลังจาก 14 วัน พบว่ากุ้งในกลุ่มการทดลองที่ได้รับ *L. plantarum* ในอัตราความ
เข้มข้น 200 และ 500 พีพีเอ็ม และได้รับเชื้อ *V. parahaemolyticus* (TISTR 1596) (กลุ่มการทดลองที่ 4 และ 6) มีอัตรา
การรอดตายสูง (51.11 ± 3.84 และ $52.23 \pm 5.09\%$) และปริมาณแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ในลำไส้ของกุ้งมีปริมาณต่ำกว่า
อย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มควบคุม ซึ่งได้รับเชื้อ *V. parahaemolyticus* (TISTR 1596) (กลุ่มการทดลองที่ 2)

คำสำคัญ: แลคโตบาซิลลัส แพลนทาร์ม, กุ้งขาวแวนนาไม, วัณโรค, พาราอีโมไลติคัส

ABSTRACT: This study was carried out in six treatments (with three replicated). Post larva 12
were stocked into 500-liter fiberglass tanks at a density of 60 PL/tank. Shrimp were fed four times
daily with pelleted feed containing heat killed *Lactobacillus plantarum* at three different doses
including 0 ppm (the control group), 200 ppm and 500 ppm. After 60 days, the average body
weight of shrimp from the group fed with *L. plantarum* at 200 ppm and 500 ppm were significant

¹ ศูนย์วิจัยธุรกิจเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร

Aquaculture Business Research Center, Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Bangkok, Thailand

² ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร

Department of Aquaculture Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Bangkok, Thailand

* Corresponding author: ffitntc@ku.ac.th

higher ($P<0.05$) than the control group. In addition, the survival rate and the feed conversion ratio (FCR) of shrimp fed with *L. plantarum* at 200 ppm and 500 ppm were significant difference ($P<0.05$) with the control group. For challenged trial, 30 shrimp from each tank were randomly stocked into the new tanks. *Vibrio parahaemolyticus* (TISTR 1596) was added into each tank of the experimental group 2, 4 and 6 at the dose of 10^8 CFU/ml. After 14 days, shrimp fed with *L. plantarum* at 200 ppm and 500 ppm and challenged with *V. parahaemolyticus* (TISTR 1596) at the dose of 10^8 CFU/ml (group 4 and 6) had significant higher ($P<0.05$) average survival rate (51.11 ± 3.84 and $52.23\pm5.09\%$) and lower number of *Vibrio* spp. in the intestine than the control group that was infected with *V. parahaemolyticus* (TISTR 1596) (group 2).

Keywords: *Lactobacillus plantarum*, *Penaeus vannamei*, *Vibrio parahaemolyticus*

บทนำ

การเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (*Penaeus vannamei*) เป็นหนึ่งในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่สำคัญที่สุดของประเทศไทย เนื่องจากปัจจุบันจำนวนประชากรโลกที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องทำให้ความต้องการสัตว์น้ำสำหรับบริโภคเพิ่มสูงขึ้นสำหรับการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมซึ่งนิยมเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายในปัจจุบันนั้นถูกนำเข้ามาเลี้ยงในประเทศไทยแทนการเลี้ยงกุ้งกุลาดำเนื่องจากปัญหาโรคกุ้งกุลาดำโตช้า ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2546 (ชลอ และ พรเลิศ, 2547) เนื่องจากกุ้งขาวแวนนาไมเป็นกุ้งที่ได้รับการพัฒนาสายพันธุ์มาอย่างยาวนานและปลอดโรคไวรัสที่สำคัญ ทำให้การเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในปัจจุบันส่วนใหญ่เป็นการเลี้ยงแบบหนาแน่นที่ให้ผลผลิตสูง ซึ่งส่งผลให้กุ้งมีสภาวะเครียด ทำให้กุ้งอ่อนแอและมีความเสี่ยงต่อการป่วยหรือตายจากเชื้อโรคต่างๆ มากขึ้น โดยเฉพาะโรคที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. ทั้งโรคตายด่วนหรือที่เรียกว่า โรคตับอักเสบเฉียบพลัน (AHPND; Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease) (Tran et al., 2013) และโรคสีขาวหรือที่เรียกว่า white feces syndrome ซึ่งสร้างความเสียหายในหลายพื้นที่ของการเลี้ยงในประเทศไทยในปัจจุบัน โดยลักษณะของโรคนี้นั้นจะพบสีขาวลอยบริเวณผิวน้ำที่กุ้งที่เป็นโรคจะพบอาการตัวกลมขนาดไม่สม่ำเสมอ และทยอยตาย กุ้งป่วยพบการลอกหลุดของผนังเซลล์ตับและตับอ่อน และมีอาการติดเชื้อแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอหลายชนิด (*Vibrio* spp.) (มณฑกานต์, 2557; แก้วตา, 2558) สำหรับแนวทางการแก้ไขปัญหาดังกล่าว สามารถ

ทำได้โดยการพยายามลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียวิบริโอ (*Vibrio* spp.) ในน้ำโดยใช้จุลินทรีย์หรือโพรไบโอติก เช่น *Bacillus* spp. หรือ *Lactobacillus* spp. ผสมอาหารให้กุ้งกินเพื่อลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียดังกล่าว เนื่องจากโพรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่ช่วยส่งเสริมโภชนาการที่มีประโยชน์ และส่งผลต่อสรีรวิทยาของสัตว์น้ำ โดยปรับเยื่อผิวและระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายสัตว์น้ำให้อยู่ในสภาพสมดุล ซึ่งเป็นการป้องกันกลุ่มแบคทีเรียฉวยโอกาสและกลุ่มแบคทีเรียที่ก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร และยังใช้เพื่อช่วยในการปรับปรุงคุณภาพของน้ำได้ด้วย (ปาจารย์, 2554; Kumar et al., 2016)

สำหรับการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้คณะผู้วิจัยได้ศึกษาผลของจุลินทรีย์ *Lactobacillus plantarum* ซึ่งถูกทำให้เป็นเซลล์ตาย โดยการให้ความร้อนสูง ต่อการเจริญเติบโต การรอดตาย และปริมาณเชื้อแบคทีเรียในลำไส้ของกุ้งขาวแวนนาไมหลังจากได้รับเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ในห้องปฏิบัติการ โดยผลการวิจัยครั้งนี้จะสามารถใช้เป็นแนวทางในการแก้ปัญหาโรคติดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมของประเทศไทยได้ในอนาคต

วิธีการศึกษา

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design, CRD) แบ่งเป็น 6 ชุดทดลอง (treatment) ในแต่ละชุดการทดลองมี 3 ซ้ำ เลี้ยงกุ้งทดลองเป็นเวลา 60 วัน ซึ่งแบ่งชุดการทดลองเป็นดังต่อไปนี้

ชุดการทดลองที่ 1 กลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย

ชุดการทดลองที่ 2 กลุ่มควบคุมที่ใส่เชื้อ *V. parahaemolyticus* (TISTR 1596) (10^8 CFU/ml.)

ชุดการทดลองที่ 3 อาหารเสริม *Lactobacillus plantarum* ที่ทำให้ตายด้วยความร้อน ในอัตราความเข้มข้น 200 พีพีเอ็ม ไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย

ชุดการทดลองที่ 4 อาหารเสริม *Lactobacillus plantarum* ที่ทำให้ตายด้วยความร้อน ในอัตราความเข้มข้น 200 พีพีเอ็ม ใส่เชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* (TISTR 1596) (10^8 CFU/ml.)

ชุดการทดลองที่ 5 อาหารเสริม *Lactobacillus plantarum* ที่ทำให้ตายด้วยความร้อน ในอัตราความเข้มข้น 500 พีพีเอ็ม ไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย

ชุดการทดลองที่ 6 อาหารเสริม *Lactobacillus plantarum* ที่ทำให้ตายด้วยความร้อน ในอัตราความเข้มข้น 500 พีพีเอ็ม ใส่เชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* (TISTR 1596) (10^8 CFU/ml.)

การเตรียมน้ำและสัตว์ทดลอง

เตรียมน้ำความเค็ม 25 พีพีที ใส่เชื้อด้วยคลอรีน 30 พีพีเอ็ม เปิดเครื่องให้อากาศตลอดเวลาเป็นระยะเวลาประมาณ 3 วัน เพื่อกำจัดคลอรีนให้หมดไปก่อนจะนำมาใช้เลี้ยงกุ้งนำลูกกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาร์วา 9 มาปรับสภาพก่อนเริ่มการทดลองเป็นระยะเวลา 3 วัน โดยมาเลี้ยงในถังไฟเบอร์กลาสขนาดความจุ 500 ลิตร ในน้ำความเค็ม 25 พีพีที เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปสำหรับกุ้ง โดยให้อาหาร 4 ครั้ง/วัน ในเวลาประมาณ 08.00 น. 11.00 น. 14.00 น. และ 17.00 น. มีการให้อาการอย่างเพียงพอ เมื่อได้กุ้งระยะโพสลาร์วา 12 คัดเลือกกุ้งที่มีขนาดใกล้เคียงมาเลี้ยงในถังทดลองขนาด 500 ลิตร ด้วยน้ำความเค็ม 25 พีพีที ปริมาตร 200 ลิตร จำนวน 18 ถัง และใส่กุ้งจำนวนถึงละ 60 ตัว เปิดเครื่องให้อากาศตลอดเวลาระหว่างการเลี้ยง ดูดตะกอนและเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกสัปดาห์

การเตรียมอาหารและการให้อาหาร

อาหารกุ้งที่ใช้ในการศึกษาเป็นอาหารสำเร็จรูปโปรตีนไม่น้อยกว่า 38% จากบริษัทเจริญโภคภัณฑ์อาหาร จำกัด (มหาชน) ให้อาหารวันละ 4 ครั้ง ใช้

ระยะเวลาในการเลี้ยง 60 วัน แบ่งออกเป็น 6 ชุดการทดลอง โดยชุดการทดลองที่ 1 และ 2 หรือกลุ่มควบคุมจะให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปสำหรับกุ้งแล้วผสมด้วยน้ำมันปลาหมักในขณะที่ชุดการทดลองที่ 3 และ 4 จะมีการผสม *Lactobacillus plantarum* ที่ทำให้ตายด้วยความร้อน ในอัตราความเข้มข้น 200 พีพีเอ็ม ในขณะที่ชุดการทดลองที่ 5 และ 6 จะมีการผสม *Lactobacillus plantarum* ที่ทำให้ตายด้วยความร้อน ในอัตราความเข้มข้น 500 พีพีเอ็มโดย *Lactobacillus plantarum* ที่ทำให้เซลล์ตายด้วยความร้อน ที่ใช้ในการศึกษาได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท House Wellness Foods ประเทศญี่ปุ่น สำหรับการผสมเซลล์ตายของ *Lactobacillus plantarum* ทำโดยละลายด้วยน้ำกลั่นและคลุกกลบนอาหารร่วมกับน้ำมันปลาหมักและผึ่งลมให้แห้งก่อนนำไปให้กุ้งกิน

การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย และการศึกษาความต้านทานเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus*

หลังจาก 60 วัน สุ่มกุ้งจำนวน 30 ตัวจากแต่ละถังจากการทดลองแรก มาเลี้ยงในถังใหม่ขนาด 200 ลิตร จัดชุดทดลองเช่นเดียวกับการทดลองแรก เพื่อศึกษาความต้านทานเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* (TISTR 1596) ซึ่งแยกมาจากกุ้งป่วยติดเชื้อแบคทีเรียในพื้นที่ภาคตะวันออกของประเทศไทยโดยศูนย์วิจัยธุรกิจเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำคณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ทำให้กุ้งติดเชื้อ ด้วยวิธีการแช่สารละลายเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* (TISTR 1596) โดยนำเชื้อ *V. parahaemolyticus* (TISTR 1596) ที่เลี้ยงไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA มาละลายในน้ำเกลือบ 1.5 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร วัดค่า Optical Density (OD) ให้ได้ค่า เท่ากับ 0.08 (ปริมาณเชื้อมีค่าเท่ากับ 10^8 CFU/ml.) เพื่อนำไปทดสอบต่อไป โดยชุดการทดลองที่ 1, 3 และ 5 ไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย ในขณะที่ชุดการทดลองที่ 2, 4 และ 6 ใส่เชื้อ *V. parahaemolyticus* (TISTR 1596) 10^8 CFU/ml. ลงในถังเลี้ยงกุ้งแล้วจดบันทึกอัตราการตายของกุ้งเป็นเวลา 14 วัน

การศึกษาปริมาณแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ในลำไส้กุ้ง

เมื่อสิ้นสุดการทดสอบความทนทานของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ศึกษาปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ในลำไส้กุ้ง โดยสุ่มกุ้งจากแต่ละกลุ่มทดลองถึงละ 5 ตัว โดยดิงลำไส้ของกุ้งแต่ละตัวมาใส่ eppendorf ที่มีน้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 1.5 ปริมาณ 100 ไมโครลิตร บดลำไส้ให้ละเอียดแล้วเติมน้ำเกลือความเข้มข้น ร้อยละ 1.5 เพิ่มลงไปอีก 900 ไมโครลิตร แล้วเปิดดูตุ่มมา 100 ไมโครลิตร และ spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose (TCBS) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรีย *Vibrio* spp. บนอาหาร TCBS แล้วนำไปคำนวณหาปริมาณแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ที่พบในลำไส้กุ้งหน่วยเป็น CFU/g

การศึกษาการเจริญเติบโต อัตราการรอดตาย ปริมาณแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ในลำไส้กุ้งหลังจากการทดสอบความทนทานต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรค

ชั่งน้ำหนักกุ้งและนับจำนวนกุ้งที่เหลือในถังทดลอง เมื่อสิ้นสุดการทดลองแล้วนำข้อมูลมาคำนวณอัตราการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตาย รวมกับศึกษาปริมาณแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ใน

ลำไส้กุ้ง โดยข้อมูลที่ได้จะถูกนำมาวิเคราะห์ โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มทดลอง โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ สำหรับกุ้งที่ตายในการทดลองจะถูกนำมาวิเคราะห์สาเหตุการตาย โดยศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตามวิธีการของ Bell and Lighter (1988)

ผลการศึกษา

จากการเสริม *Lactobacillus plantarum* ที่ทำให้ตายด้วยความร้อนในอาหารสำเร็จรูปในอัตราส่วนที่ต่างกันโดยทดลองเลี้ยงกุ้งด้วยอาหารดังกล่าวเป็นระยะเวลา 60 วันก่อนทดสอบความทนทานต่อเชื้อ *V. parahaemolyticus* (TISTR 1596) พบว่าการเจริญเติบโตอัตราการรอดตายและอัตราเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (FCR) ของกุ้งขาวแวนนาไมที่เสริมด้วย *L. plantarum* ในอัตราความเข้มข้น 200 และ 500 พีพีเอ็ม มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับกุ้งกลุ่มควบคุม ดังแสดงใน Table 1

Table 1 The average body weight, survival and feed conversion ratio (FCR) of Pacific white shrimp at 60 days of feeding with different diets. (before challenged with *V. parahaemolyticus*)

Treatment	Weight (g.)	Survival rate (%)	FCR
Control(without bacteria)	5.81±1.85 ^b	76.67±1.66 ^b	1.93±0.56 ^b
Control (10 ⁸ CFU/ml)	5.82±0.95 ^b	77.78±0.96 ^b	1.80±0.26 ^b
<i>L. plantarum</i> 200 ppm (without bacteria)	7.09±0.83 ^a	87.78±3.47 ^a	1.30±0.20 ^a
<i>L. plantarum</i> 200 ppm (10 ⁸ CFU/ml)	7.22±0.88 ^a	85.00±4.40 ^a	1.33±0.11 ^a
<i>L. plantarum</i> 500 ppm (without bacteria)	7.05±0.90 ^a	88.33±4.41 ^a	1.26±0.15 ^a
<i>L. plantarum</i> 500 ppm (10 ⁸ CFU/ml)	7.02±0.43 ^a	85.00±6.01 ^a	1.33±0.15 ^a

The different alphabets in the same column mean significant difference ($P < 0.05$) Mean+ SD.

หลังจากศึกษาความทนทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* (TISTR 1596) เป็นระยะเวลา 14 วัน พบว่าน้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นของกุ้งทุกกลุ่มการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ดังแสดงใน Table 2 อัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไม กลุ่มการทดลองที่ไม่ได้แช่เชื้อแบคทีเรีย มีอัตราการรอดตายเฉลี่ย 100% กลุ่มที่แช่เชื้อ *V. parahaemolyticus* (TISTR 1596)

ที่ปริมาณ 10^8 CFU/ml. มีอัตราการรอดตายเฉลี่ย (22.22 - 52.23%) อัตราการรอดตายเฉลี่ยของกุ้งที่เสริมด้วย *L. Plantarum* ซึ่งทำให้ตายด้วยความร้อนในอัตราความเข้มข้น 200 พีพีเอ็ม และ 500 พีพีเอ็มนั้นไม่แตกต่างกันและกุ้งทั้งสองกลุ่มมีอัตราการรอดตายเฉลี่ยที่สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ดังแสดงใน Table 3

Table 2 The average weight gain of Pacific white shrimp after challenging with *V. parahaemolyticus*

Treatment	Average weight gain(g)
Control(without bacteria)	0.90±0.47 ^a
Control (10^8 CFU/ml)	0.92±0.68 ^a
<i>L. plantarum</i> 200 ppm (without bacteria)	1.66±0.11 ^a
<i>L. plantarum</i> 200 ppm (10^8 CFU/ml)	1.52±0.59 ^a
<i>L. plantarum</i> 500 ppm (without bacteria)	1.73±1.03 ^a
<i>L. plantarum</i> 500 ppm (10^8 CFU/ml)	1.77±0.29 ^a

The alphabets in the same column mean no significant differences ($P>0.05$) Mean+ SD.

Table 3 The average survival rate of Pacific white shrimp after challenging with *V. parahaemolyticus*

Treatment	Average survival rate (%)
Control(without bacteria)	100.00±0.00 ^a
Control (10^8 CFU/ml)	22.22±3.85 ^c
<i>L. plantarum</i> 200 ppm (without bacteria)	100.00±0.00 ^a
<i>L. plantarum</i> 200 ppm (10^8 CFU/ml)	51.11±3.84 ^b
<i>L. plantarum</i> 500 ppm (without bacteria)	100.00±0.00 ^a
<i>L. plantarum</i> 500 ppm (10^8 CFU/ml)	52.23±5.09 ^b

The different alphabets in the same column mean significant difference ($P<0.05$) Mean+ SD.

สำหรับการศึกษาปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp.) ในลำไส้กุ้งพบว่าไม่มีความแตกต่างกันระหว่างกุ้งทดลองทั้ง 3 กลุ่มที่ไม่มีการแช่เชื้อแบคทีเรีย ในขณะที่กลุ่มที่แช่เชื้อแบคทีเรียในปริมาณ 10^8 CFU/ml. มีปริมาณแบคทีเรีย *Vibrio* spp.) ในลำไส้เฉลี่ยสูงที่สุด โดยกลุ่มควบคุมมีปริมาณแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ในลำไส้ปริมาณมากที่สุด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกุ้งกลุ่มทดลองที่ให้อาหารเสริม *L. plantarum* ซึ่งทำให้ตายด้วยความร้อน ในอัตราความเข้มข้น 200 และ 500 พีพีเอ็ม

การศึกษาค้นครั้งนี้ไม่พบความแตกต่างกันระหว่างปริมาณแบคทีเรีย *Vibrio* spp.) ในลำไส้ของกุ้งที่กินอาหารเสริม *L. Plantarum* ในอัตราความเข้มข้น 200 และ 500 พีพีเอ็ม ดังแสดงใน Table 4

การศึกษายารักษาของกุ้งที่ตายพบลักษณะการติดเชื้อแบคทีเรียในตับและตับอ่อนของกุ้งทดลองได้แก่ การล้อมจับแบคทีเรียโดยเม็ดเลือด (encapsulation) และพบการลอกหลุดของเซลล์ตับและตับอ่อนจำนวนมาก (sloughing of the hepatopancreas cells) ดังแสดงใน Figure 1

Table 4 The average total number of bacteria *Vibrio* spp. (10^6 CFU/g) in the intestine of pacific white shrimp after challenging with *V. parahaemolyticus* for 14 days

Treatment	Total number of <i>Vibrio</i> spp. (10^6 CFU/g) in the intestine
Control(without bacteria)	0.06 ± 0.02^a
Control (10^8 CFU/ml)	0.95 ± 0.05^c
<i>L. plantarum</i> 200 ppm (without bacteria)	0.01 ± 0.01^a
<i>L. plantarum</i> 200 ppm (10^8 CFU/ml)	0.48 ± 0.06^b
<i>L. plantarum</i> 500 ppm (without bacteria)	0.01 ± 0.01^a
<i>L. plantarum</i> 500 ppm (10^8 CFU/ml)	0.49 ± 0.11^b

The different alphabets in the same column mean significant difference ($P < 0.05$) Mean+ SD.

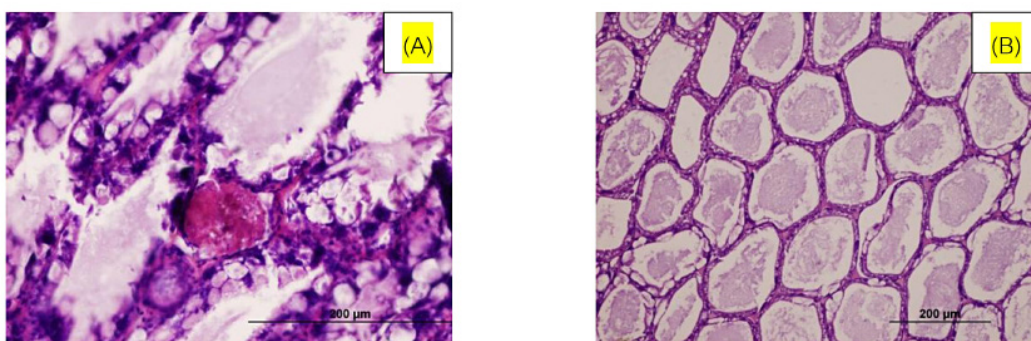


Figure 1 Histopathology by H&E staining of hepatopancreas of infected shrimp showed a sign of bacteria encapsulation (A) and severe sloughing of the hepatopancreas cells. (B) (H&E, bar=200 µm)

วิจารณ์

การศึกษาผลของ *L. plantarum* ที่ทำให้ตายด้วยความร้อน ต่อการเจริญเติบโต อัตราการรอดตาย และปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ในลำไส้กุ้งเมื่อทดสอบด้วยเชื้อ *V. parahaemolyticus* พบว่ากุ้งขาวแวนนาที่ได้รับอาหารเสริมด้วย *L. plantarum* 200 และ 500 พีพีเอ็ม มีน้ำหนักเฉลี่ยและอัตราการรอดตายสูงกว่ากลุ่มควบคุมสอดคล้องกับการศึกษาของ Pham et al. (2016) ซึ่งศึกษาผลของอาหารที่เสริมด้วย *L. plantarum* ที่ทำให้ตายด้วยความร้อน ในกุ้งขาวแวนนาไม่พบว่าการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไม่สูงกว่ากลุ่มควบคุม ในขณะที่ Ha et al. (2009) ซึ่งศึกษาผล *L.*

plantarum ที่ทำให้ตายด้วยความร้อน ในกุ้งครุเมะ (*Marsupenaeus japonicus*) รายงานว่ากุ้งที่ได้รับอาหารเสริม *L. plantarum* มีการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายของกุ้งสูงกว่ากลุ่มควบคุมเช่นกัน โดยประสิทธิภาพของ *L. plantarum* ที่ถูกทำให้เป็นเซลล์ตายโดยการให้ความร้อนสูง ต่อการเจริญเติบโตนั้น น่าจะเกิดจาก *L. plantarum* สามารถช่วยเพิ่มเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารของกุ้ง ได้แก่ เอนไซม์ protease, amylase, lipase และ cellulase ซึ่งมีคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์ช่วยย่อยอาหารส่งผลให้กุ้งย่อยและดูดซึมสารอาหารไปใช้ได้เร็วขึ้นจึงส่งผลทำให้กุ้งมีอัตราการเจริญเติบโตดีขึ้น (Wang, 2007) เนื่องจากองค์ประกอบผนังเซลล์ของแบคทีเรีย *L. plantarum* มีส่วนช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของ

กึ่งให้ทำงานมากขึ้นจึงเพิ่มความทนของกุ้งต่อการติดเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* ทำให้กุ้งมีอัตราการรอดตายสูงขึ้น โดย *L. plantarum* สามารถกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยา phenol oxidase ทำให้มีการเพิ่มของปริมาณ pro-phenol oxidase (proPO) ซึ่งเป็นกระบวนการที่สำคัญในการทำลายสิ่งแปลกปลอมและควบคุมการกระจายเชื้อโรคในตัวกุ้งได้นอกจากนี้ *L. plantarum* ยังเพิ่มความสามารถให้เกิดการสร้างแมคโครฟาจ (macrophages cell) เพื่อมาทำลายเชื้อโรคอีกด้วย (Ha et al. 2010)

การศึกษาค้นคว้านี้ยังพบว่า *L. plantarum* มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* ในลำไส้กุ้งหลังจากได้รับเชื้อ *V. parahaemolyticus* ด้วย โดยกุ้งในกลุ่มการทดลองที่ได้รับ *L. plantarum* ในอัตราความเข้มข้น 200 และ 500 พีพีเอ็ม และได้รับเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในปริมาณ 10^8 CFU/ml. (กลุ่มการทดลองที่ 4 และ 6) มีปริมาณแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ในลำไส้ต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มควบคุม ซึ่งได้รับเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในปริมาณ 10^8 CFU/มิลลิลิตร (กลุ่มการทดลองที่ 2) ซึ่งสอดคล้องกับ Mahmoud et al. (2015) ศึกษาประสิทธิภาพของ *L. plantarum* ที่ทำให้ตายด้วยความร้อน ในปลา red sea bream (*Pagrus major*) พบว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริม *L. plantarum* มีปริมาณแบคทีเรียในลำไส้ต่ำเนื่องจาก *L. plantarum* ช่วยเพิ่มปริมาณเอนไซม์ peroxidase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญใช้ในกระบวนการออกซิเดชันเพื่อผลิตสาร hypochlorous acid ที่มีฤทธิ์ยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรียในลำไส้ได้

การศึกษาค้นคว้านี้พบว่าการใช้ *Lactobacillus plantarum* เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการเสริมสร้างสุขภาพที่ดีให้แก่สัตว์น้ำ เพิ่มความต้านทาน และป้องกันเชื้อก่อโรคทำให้สัตว์น้ำแข็งแรงขึ้น รวมทั้งเป็นการลดการใช้ยาปฏิชีวนะ และสารเคมี ป้องกันไม่ให้เกิดปัญหาการดื้อยา และปัญหาการตกค้างของยาปฏิชีวนะและสารเคมีในตัวสัตว์น้ำและในสิ่งแวดล้อม สร้างความมั่นใจให้กับผู้บริโภค และทำให้เกิดความยั่งยืนในอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำต่อไป

สรุป

การศึกษาค้นคว้านี้พบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารเสริม *L. plantarum* 200 และ 500 พีพีเอ็ม มีการเจริญเติบโต อัตราการรอดตายสูงกว่ากลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตามคณะผู้วิจัยไม่พบความแตกต่างของการการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายของกุ้งในกลุ่มที่เสริมด้วย *L. plantarum* 200 และ 500 พีพีเอ็ม ดังนั้นเมื่อพิจารณาปริมาณที่ใช้และต้นทุนที่จะเพิ่มขึ้นแล้ว การใช้ *L. plantarum* 200 พีพีเอ็ม จึงเป็นอัตราความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุด

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณศูนย์วิจัยธุรกิจเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมงมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่สนับสนุนงบประมาณสำหรับใช้ในการทำงานวิจัยครั้งนี้ให้สำเร็จด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- แก้วตา ลิ่มเฮง. 2558. การศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับโรคซีขาวในฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในพื้นที่จังหวัดเพชรบุรี. แก่นเกษตร. 43(1) (ฉบับพิเศษ): 581-587.
- ชลอ ลิ่มสุวรรณ และ พรเลิศ จันทรรักษ์กุล. 2547. อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย. สนับสนุนการจัดการพิมพ์โดยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เพื่อเฉลิมพระเกียรติพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวภูมิพลอดุลยเดช เนื่องในวโรกาสพระราชพิธีมหามงคลเฉลิมพระชนมพรรษา 5 ธันวาคม พ.ศ. 2547. บริษัท เมจิคพับลิเคชั่น จำกัด, กรุงเทพฯ
- ปจรรย์ จือเหลียง. 2554. ผลของแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัส (*Bacillus* spp.) ในการควบคุม *Vibrio harveyi* และอัตราการรอดในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) ในห้องปฏิบัติการ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- มณฑกานต์ สมบูรณ์. 2557. การศึกษาสาเหตุการเกิดโรคซีขาวในกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*). วิทยานิพนธ์ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิตมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

- Bell, T. A., and D. V. Lightner. 1988. A Hand Book of Normal Penaeid Shrimp Histology. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.
- Kumar, V., S. Roy., D. K. Meena, and U. K. Sarkar. 2016. Application of probiotics in shrimp aquaculture: importance, mechanisms of action, and methods of administration. Review in Fisheries Science & Aquaculture. 24: 342-368.
- Ha T.T., K. Shunsuke, T. Shin-ichi, I. Manabu, Y. Saichiro, R. Tongjun, H. Yoshitaka, and D. T. P. Nguyen. 2009. Effects of Heat-killed *Lactobacillus plantarum* Supplemental Diets on Growth Performance, Stress Resistance and Immune Response of Juvenile Kuruma Shrimp, *Marsupenaeus japonicus* Bate. Aquaculture Sci. 57: 175-184.
- Ha T.T., K. Shunsuke, and F.T. Rex. 2010. Effects of Dietary Heat-killed *Lactobacillus plantarum* on Larval and Post-larval Kuruma Shrimp, *Marsupenaeus japonicus* Bate. World aquaculture society. 41: 15-27.
- Mahmoud A.O.D., K. Shunsuke, I. Manabu, and Y. Saichiro. 2015. Interaction effects of dietary supplementation of heat-killed *Lactobacillus plantarum* and β -glucan on growth performance, digestibility and immune response of juvenile red sea bream, *Pagrus major*. Fish & Shellfish Immunology. 44: 29-36.
- Pham M. D., N. T. Hua, T.T.H. Tran, Tuyet Hoa, H.M. Hong, T.T. Chau, and M.A. Cao. 2016. Effect of heat-killed *Lactobacillus plantarum* strain L-137 on growth performance and immune response of white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) via dietary administration. International Journal of Scientific and Research Publications. 6: 270-280
- Tran, L. H., L.L. Nunan, R.M. Redman, L.L. Mohny, C.R. Pantoja, K. Fitzsimmons, and D. V. Lightner. 2013. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. Dis Aquat Org. 105: 45-55.
- Wang, Y.B. 2007. Effect of probiotic on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*. Aquaculture. 269: 259-264.