4. วิจารณ์ผลการทดลอง

1. การคัดเลือกแบคทีเรียย่อยโปรตีน

สภาพธรรมชาติในบ่อเลี้ยงกุ้งจะมีการหมุนเวียนของไนโตรเจน ซึ่งเรียกว่า วัฏจักรไนโตรเจน ซึ่งแบคทีเรียย่อยโปรตีนเป็นแบคทีเรียที่อยู่ในกระบวนการขั้นต้นที่เปลี่ยนสารอินทรีย์ไนโตรเจนที่มีขนาดใหญ่ให้เป็นกรดอะมิโนหรือให้เป็นสารพวกแอมโมเนีย ทำให้สามารถพบแบคทีเรียพวกนี้ได้ในบ่อเลี้ยงกุ้ง เมื่อนำแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทมาคัดเลือกเบื้องต้นโดยทดสอบหาค่า degree of hydrolysis ซึ่งเป็นวิธีการพื้นฐานที่ใช้กันทั่วไปสำหรับคัดเลือกเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ปล่อยออกนอกเซลล์ แต่ก็ควรพิจารณาการเจริญของเชื้อด้วย (Kazanas, 1968) ดังเช่นการศึกษาเชื้อไอโซเลท W3 ค่า degree of hydrolysis ต่ำสุดในบรรดาเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกเบื้องต้น (รูปที่ 4) แล้ว แต่เมื่อนำมาวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมเอนไซม์ย่อยโปรตีนกลับพบว่าเชื้อแบคทีเรียย่อยโปรตีนไอโซเลท W3 สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนได้มากกว่าเชื้อแบคทีเรียย่อยโปรตีนไอโซเลท W6 W10 และ W310 และเมื่อเลี้ยงไประยะหนึ่งค่ากิจกรรมย่อยโปรตีนไม่แตกต่างจาก W30 ซึ่งให้ค่าสูงสุด (รูปที่ 5) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าในการคัดเลือกเบื้องต้นจะพิจารณาจากค่า degree of hydrolysis เพียงอย่างเดียวไม่ได้ ควรพิจารณาการเจริญเติบโตของเชื้อร่วมด้วยโดยพิจารณาจากขนาดของโคโลนี

2. การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *V. harveyi*

จากการศึกษาพบว่าเชื้อแบคทีเรียย่อยโปรตีนไอโซเลท W3 เป็นเพียงไอโซเลทเดียวที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *V. harveyi* แสดงว่าเชื้อแบคทีเรียย่อยโปรตีนไอโซเลท W3 ผลิตสารบางชนิดออกสู่ภายนอกเซลล์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *V. harveyi* เช่นการศึกษาของ Chythanya และคณะ (2002) พบว่าเชื้อ *Pseudomonas* ไอโซเลท I-2 สามารถผลิตสารออกสู่ภายนอกเซลล์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *V. harveyi* ซึ่งสารที่เชื้อผลิตสามารถทนต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีน เอนไซม์ย่อยไขมัน และเอนไซม์ย่อยแป้ง แม้ปล่อยให้ทำปฏิกิริยาเป็นเวลานานถึง 1 ชั่วโมง และเชื้อชนิดนี้ไม่

เป็นอันตรายต่อกุ้ง นอกจากนี้ Vijayan และคณะ (2006) แยกได้เชื้อ *Pseudomonas* ไอโซเลท PS-102 จากบึงน้ำเค็ม Muttukkadu ในประเทศอินเดีย พบว่าเชื้อดังกล่าวสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *V. harveyi* ซึ่งสารที่ผลิตจากเชื้อนี้มีลักษณะใกล้เคียงกับเชื้อ *Pseudomonas* I-2 คือ ทนต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีน เอนไซม์ย่อยไขมัน และเอนไซม์ย่อยแป้ง และยังทนความร้อน รวมทั้งเชื้อนี้ไม่เป็นอันตรายต่อกุ้งด้วย แต่สารยับยั้งที่สร้างโดยไอโซเลท W3 อาจเป็นสารประกอบพวกโปรตีนเพราะเชื้อผลิตโปรติเอสมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ 2.4 ยูนิตต่อมิลลิลิตร แต่ค่ากิจกรรมจำเพาะ (specific activity) ของเอนไซม์มีค่าต่ำมาก (รูปที่ 14) แสดงว่าโปรตีนส่วนหนึ่งถูกผลิตออกมาไม่ใช่เป็นโปรติเอส แต่อาจเป็นสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งเชื้อ *V. harveyi* (antivibrio substance)

จากการทดสอบความไวของเชื้อ *V. harveyi* ต่อยามาตรฐานที่ใช้ควบคุมจุลินทรีย์ มีรายงานของพุธิตา (2545) ว่าเชื้อ *V. harveyi* จะไวต่อยานอร์ฟอกซาซิน (norfloxacin) และเตทตร้าซัยคลิน (tetracycline) และในปัจจุบันมีการใช้ยาในกลุ่มซัลฟาเสริมฤทธิ์ เช่น กลุ่มซัลฟารวมกับไตรเมทโทพริม (sulphamethoxazole trimethoprin) และกลุ่มควิโนโลน ยาในกลุ่มนี้ เช่น ออกโซลินิคแอซิค (oxolinic acid) และนอร์ฟอกซาซิน (norfloxacin) ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (http://www.shrimpcenter.com/tshrimp003.html, 15/03/2006) ในการศึกษาการตกค้างของยาออกโซลินิคแอซิค (oxolinic acid) ของกาญจนา และคณะ (2536) พบว่า เมื่อป้อนยาในอัตรา 30 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักกุ้ง 1 กิโลกรัม ยาจะตกค้างใน hepatopancreas เป็นเวลานาน 50 วัน ขณะที่ใน haemolymph และกล้ามเนื้อ ยาจะตกค้างอยู่เป็นเวลานาน 24 วัน และ 25 วัน ตามลำดับ และเชื้อไอโซเลท W3 ให้ผลการยับยั้ง *V. harveyi* ได้ใกล้เคียงกับซัลฟาเมททอกซาซิน (sulphamethoxazole) และออกโซลินิคแอซิค (oxolinic acid) (ตารางที่ 1) แสดงถึงความน่าสนใจที่จะใช้ควบคุมเชื้อ *V. harveyi* เพื่อทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะ อย่างไรก็ตาม เนื่องจากวิธีการทดสอบโดยใช้ agar diffusion ดังนั้นคุณสมบัติการละลายได้และขนาดของโมเลกุลของสารยับยั้งและยาอาจมีความแตกต่างกันมากรวมทั้งปริมาณของสารยับยั้งด้วย แต่จากผลการทดลองที่ได้แสดงว่าไอโซเลท W3 สามารถยับยั้ง *V. harveyi* ได้โดยสารที่หลั่งออกมาถูกเจือจางด้วยอาหารที่เลี้ยงและใช้เพียง 70 µl โดยยังไม่ผ่านการทำให้เข้มข้นจึงมีความน่าสนใจที่จะนำไปใช้ศึกษาต่อ

3. สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียย่อยโปรตีนที่คัดเลือกได้

จากผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อไอโซเลท W3 พบว่าเชื้อเจริญได้ดีในอาหาร NB ที่มี 2% NaCl (รูปที่ 8) pH 6.5-7 (รูปที่ 9) ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส (รูปที่ 10) โดยมีการเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที (รูปที่ 11) ซึ่งการเจริญของแบคทีเรียสอดคล้องกับสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของกุ้ง คือ อุณหภูมิที่เจริญได้ดีของกุ้งจะอยู่ในช่วง 28-30 องศาเซลเซียส (http://www.shrimpcenter.com/T-shrimp051.html, 12/03/2006) ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) อยู่ระหว่าง 7.2-8.6 ระดับความเค็มที่เจริญเติบโตได้ดี คือ 10-22 กรัมต่อลิตร หรือ 1%-2.2% (http://www.nicaonline.com/ articles2/site/view_article., 8/03/2006) เนื่องมาจากเชื้อแบคทีเรียย่อยโปรตีนไอโซเลท W3 ที่ผ่านการคัดเลือกแยกมาจากน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งจากจังหวัดปัตตานี จึงเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียย่อยโปรตีนสอดคล้องกับสภาวะการเลี้ยงกุ้งที่ผู้เลี้ยงต้องควบคุมสภาวะภายในบ่อให้เหมาะสมต่อการเจริญของกุ้งที่เลี้ยง

4. การเจริญและการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

จากการเจริญและค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (รูปที่ 13) พบว่าในช่วงการเจริญของเชื้ออยู่ในระยะ log phase ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เริ่มเพิ่มขึ้น เนื่องจากในระยะ log phase เป็นระยะที่เชื้อเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็ว และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีนเพิ่มสูงในระยะ stationary phase ของการเจริญอาจเป็นเพราะเป็นระยะที่อัตราการเจริญและการตายเท่ากัน ทำให้มีการผลิตเอนไซม์มากกว่าระยะ log phase ดังเช่นการศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนของเชื้อ *Pseudomonas maltaphilia* พบว่า ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีนเพิ่มตามการเจริญ และสูงสุดในระยะการเจริญช่วง stationary phase (Boethling, 1975) อีกทั้งการศึกษาของ Jewell (2000) พบว่าการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนของเชื้อ *Burkholderia* สายพันธุ์ 2.2 N เริ่มผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนเมื่อเข้าสู่ระยะ stationary phase และเชื้อจะผลิตเอนไซม์สูงสุดเมื่อเข้าสู่ระยะ late

stationary phase และจากรูปที่ 13 พบว่า pH ในชั่วโมงที่ 10-12 ลดลง และเพิ่มขึ้นและลดลงอีกในชั่วโมงที่ 36 อาจเป็นเพราะแอมโมเนียที่เกิดจากการย่อยสลายโปรตีนและกรดอะมิโนก็ถูกใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนด้วย

5. ลักษณะของโปรติเอสที่ผลิตจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

5.1 อุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีน

ผลการทดลองพบว่าอุณหภูมิที่ทำงานได้ดีของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตโดยไอโซเลท W3 คือ 35 องศาเซลเซียส (รูปที่ 15) โดยที่อุณหภูมิดังกล่าวไม่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงกุ้งเพราะอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงกุ้งขาวจะอยู่ระหว่างอุณหภูมิ 24-32 องศาเซลเซียส(http://www.shrimpcenter.com/T-shrimp051.html, 12/03/2006) แต่บางครั้งอุณหภูมิของน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งจะเพิ่มสูงขึ้นในฤดูร้อน ซึ่งอุณหภูมิของน้ำจะเปลี่ยนแปลงตามฤดูกาลหรืออาจเป็นไปได้ว่าไอโซเลท W3 อาจมาจากดินบริเวณใกล้บ่อเลี้ยง ซึ่งในดินมักมีอุณหภูมิเฉลี่ยสูงกว่าในน้ำ จากการศึกษาแบคทีเรียที่แยกได้จากทะเลพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อโปรติเอสบางครั้งก็ไม่เป็นอุณหภูมิเดียวกันกับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต (Hoyoux *et al.*, 2001; Vazquez *et al.*, 2004) ซึ่ง Vazquez และคณะ (2004) ศึกษาเชื้อ *Pseudomonas* sp. 8 ไอโซเลท ที่เจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส แต่กลับพบว่าอุณหภูมิที่ดีต่อการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีนอยู่ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

ในส่วนของ pH ของบ่อเลี้ยงกุ้งพบว่าในบ่อเลี้ยงโดยทั่วไปมี pH อยู่ระหว่าง 7.2-8.6 (http://www.nicaonline.com/articles2/site/_view_article., 8/03/2006) ซึ่งจากการทดลอง pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีนอยู่ที่ pH 8 (รูปที่ 14) ซึ่งเป็นลักษณะของ alkaline protease ที่จะทำงานได้ดีที่ pH 6.7-9 (ปราณี, 2543) และ pH 8 อยู่ในช่วง pH ของการเลี้ยงกุ้ง เนื่องมาจากแบคทีเรียย่อยโปรตีนไอโซเลท W3 ได้แยกมาจากน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้ง ซึ่งน้ำภายในบ่อเลี้ยงผู้เลี้ยงจะมีการควบคุมค่าของ pH ให้อยู่ในช่วง 7.2-8.6 เสมอ ทั้งนี้ถ้าสภาพภายในบ่อมีสภาพที่เป็นกรด (pH ต่ำ) ไนไตรทภายในบ่อจะเปลี่ยนเป็นกรดไนตรัส ซึ่งจะทำให้การเจริญของกุ้งชะงัก แต่ถ้าภายในบ่อมีค่า pH ที่สูง

(pH 8.4-9) จะทำให้แอมโมเนียมเปลี่ยนรูปเป็นก๊าซแอมโมเนีย ซึ่งมีพิษต่อกุ้งเช่นกัน (เบญจมินทร์, 2544)

5.2 ผลของอุณหภูมิและ pH ต่อความคงตัวของเอนไซม์

จากการทดลองความคงตัวของเอนไซม์ที่เป็นผลจากอุณหภูมิ (รูปที่ 17) พบว่า ที่อุณหภูมิ 28 30 และ 35 องศาเซลเซียส โปรติเอสมีความคงตัวแม้เวลาผ่านไป 4 ชั่วโมง แล้วก็ตาม แต่ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เมื่อเวลาผ่านไป 4 ชั่วโมง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลง โดยที่อุณหภูมิ 28 30 และ 35 องศาเซลเซียส เป็นช่วงอุณหภูมิของน้ำและเป็นช่วงของอุณหภูมิที่แบคทีเรียโปรตีนไอโซเลท W3 คุ้นเคยจึงทำให้เอนไซม์ที่ผลิตมีความคงตัวที่อุณหภูมิดังกล่าว จึงมีความสามารถย่อยสลายโปรตีนในบ่อเลี้ยงกุ้งได้

สำหรับความคงตัวของโปรติเอสที่ผลิตโดยไอโซเลท W3 เป็นผลจาก pH จากรูปที่ 18 พบว่าที่ pH 7 8 และ 9 ถึงแม้ว่าเมื่อเวลาผ่านไปถึง 4 ชั่วโมง ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ก็ยังคงไม่ลดลง อาจเนื่องมาจากความคุ้นเคยต่อค่า pH ของแบคทีเรียย่อยโปรตีนที่คัดเลือกได้จากบ่อเลี้ยงกุ้งที่มีสภาวะของค่า pH ภายในบ่อเลี้ยงอยู่ระหว่าง 7.2-8.6 (http://www.nicaonline.com/articles2/site/ view_article, 8/03/2006)

จากการทดสอบผลของอุณหภูมิและ pH ต่อความคงตัวของเอนไซม์ ค่ากิจกรรมจากรูปที่ 17 และ 18 แม้เวลาผ่านไป 4 ชั่วโมง ยังคงเพิ่มขึ้น เนื่องมาจากในส่วนใสที่นำมาทดสอบอาจมีส่วนของตัวเซลล์ปนอยู่และเป็นเอนไซม์ที่ไม่ได้ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ดังนั้นจึงควรทำการกรองส่วนใสเพื่อให้ปราศจากเชื้อและทำให้บริสุทธิ์ก่อนที่จะนำมาทดสอบหาความคงตัวของเอนไซม์ และเนื่องจากการศึกษาครั้งนี้ได้ทดลองในช่วงระยะเวลาที่สั้นเกินไป สำหรับการศึกษาครั้งต่อไปควรขยายเวลาการทดสอบออกไป เช่น จาก 4 ชั่วโมงมาเป็น 24-48 ชั่วโมง

7. ผลของตัวยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีน

จากการศึกษาตัวยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อไอโซเลท W3 พบว่า EDTA มีค่า relative activity (158.54%) สูงกว่าชุดควบคุม (100%) และไอออนของโลหะที่ใช้ทดสอบก็มีค่า relative activity สูงกว่า EDTA และชุดควบคุม (รูปที่ 17) แต่ผล

การศึกษาของ Hamamoto และคณะ (1994) Vazquez และคณะ (2004) และ Lama และคณะ (2005) พบว่าเอนไซม์จากเชื้อ *Pseudomonas* ถูกยับยั้งได้โดย EDTA ซึ่ง EDTA จะเข้าไปจับกับอิออนของโลหะภายในโมเลกุลของเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้ (ปราณี, 2543) และในรายงานของ Häse และ Finkelstein (1993) ว่าลักษณะของเอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อ *Pseudomonas* spp. เป็นเอนไซม์ที่มีลักษณะเป็น โปรติเอสโลหะ (metalloprotease) และเป็นโปรติเอสเซรีน (serine protease or alkaline protease) อีกทั้ง Hoshino และคณะ (1997) Chessa และคณะ (2000) Secades และคณะ (2001) และ Vazquez และคณะ (2004) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับลักษณะของเอนไซม์ที่แยกได้จากเชื้อ *Pseudomonas* พบว่า EDTA ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้ แต่ในการศึกษาครั้งนี้เอนไซม์จากเชื้อไอโซเลท W3 เป็นเอนไซม์ที่ไม่บริสุทธิ์ (crude enzyme) และปริมาณของสารยับยั้งที่ใช้ 0.01 mM อาจต่ำเกินไปจึงทำให้ไม่สามารถระบุได้ว่าเอนไซม์จากเชื้อไอโซเลท W3 เป็นเอนไซม์ในกลุ่มโปรติเอสโลหะได้ แต่จากการศึกษาพบว่าเอนไซม์จากเชื้อไอโซเลท W3 ทำงานได้ในช่วง pH ระหว่าง 7-9 ดังนั้นเอนไซม์จากเชื้อไอโซเลท W3 จัดเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม alkaline protease

6. ลักษณะของแบคทีเรียย่อยโปรตีนที่คัดเลือกได้

6.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อที่คัดเลือกได้

จากผลการศึกษาทางสัณฐานวิทยา สรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อไอโซเลท W3 ที่คัดเลือกได้ พบว่าเป็นเชื้อในจีนัส (Genus) *Pseudomonas* ไม่สามารถระบุ species ได้ แต่จากการวิเคราะห์ 16S rDNA sequence พบว่าคือ *Pseudomonas* sp. pDL01 ซึ่งเมื่อสืบค้นข้อมูลเชื้อดังกล่าวพบว่าเป็นงานวิจัยที่ยังไม่ได้ตีพิมพ์ เชื้อชนิดนี้สามารถพบได้โดยทั่วไปในน้ำทะเล ดังเช่นงานวิจัยของ Than และคณะ (2004) ซึ่งทำการคัดเลือกเชื้อจากน้ำทะเลเป็นจำนวน 14 ไอโซเลท และเมื่อศึกษาถึงคุณสมบัติของเชื้อดังกล่าวพบว่าทั้งหมดเป็น *Pseudomonas* ที่มีคุณสมบัติผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนชนิด alkaline metalloprotease และสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *V. harveyi* ได้ ซึ่งไอโซเลท W3 ผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนชนิด alkaline protease และสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *V. harveyi* ได้ เชื้อ *Pseudomonas* ยังพบได้ในบ่อเลี้ยงกุ้ง (Otta *et al*., 1999; Chythanya *et*

al., 2002) ในเหงือก ผิวหนัง และตับของปลา (Cahill, 1990) เชื้อ *Pseudomonas* เป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่น (normal flora) ในแหล่งน้ำตามธรรมชาติด้วย (Krieg and Holt, 1984) และมีการพบว่าเชื้อ *Pseudomonas* มีความเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารย่อยยากและสารพิษในสิ่งแวดล้อมด้วย (Auling, 1993; Vazquez *et al.*, 2004)

6.2 ผลของยาปฏิชีวนะที่ใช้ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ/*Pseudomonas* ต่อเชื้อไอโซเลท W3

จากการศึกษาการใช้ยาและปฏิชีวนะที่ใช้สำหรับยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบและยาปฏิชีวนะที่ใช้สำหรับควบคุมเชื้อในกลุ่ม *Pseudomonas* ปรากฏว่า ยาทั้ง 2 ชุด (ยาสำหรับควบคุมแบคทีเรียแกรมลบและยาที่ใช้ควบคุม *Pseudomonas*) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อไอโซเลท W3 ได้ ยกเว้น ยา cephalothin (30 μg) ดังตารางที่ 2 และ 3 และเมื่อทดสอบการแตกของเม็ดเลือดแดงพบว่า เชื้อไอโซเลท W3 ก็ไม่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก (รูปที่ 23) ซึ่งจากผลการทดลองทั้ง 2 นี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียย่อยโปรตีนไอโซเลท W3 น่าจะเป็นเชื้อที่มีอยู่ตามธรรมชาติไม่ก่อให้เกิดโรคโดยพิจารณาจากอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อก็เป็นอุณหภูมิของแหล่งน้ำตามธรรมชาติ โดยสายพันธุ์ของ *Psuedomonas* ที่ทำให้เกิดโรคได้ เมื่อเลี้ยงใน blood agar จะทำให้มีการแตกของเม็ดเลือดแดงบนอาหาร blood agar (Champoux *et al.*, 1991) และเชื้อไอโซเลท W3 ไม่ใช้ *Pseudomonas* aeruginosa (ผลจาก 16S rDNA analysis ดูรายละเอียดจากภาคผนวก ค)

จากผลการทดลองที่กล่าวมาแสดงถึงความเป็นไปได้ของเชื้อไอโซเลท W3 ในการย่อยสลายโปรตีน ยับยั้ง *V. harveyi* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคที่สำคัญของกุ้งและเป็นเชื้อที่มีอยู่ในธรรมชาติ จึงได้ทดลองใช้ปรับคุณภาพน้ำและยับยั้ง *V. harveyi* ในการเลี้ยงกุ้งในสภาวะจำลอง

7. การประยุกต์ใช้ไอโซเลท W3 ในสภาวะจำลองบ่อเลี้ยงกุ้ง

7.1 ค่า BOD และ DO ในสภาวะจำลองบ่อเลี้ยงกุ้ง

ในการทดลองเลี้ยงกุ้งในสภาวะจำลองบ่อเลี้ยงกุ้ง โดยมีการเติมและไม่มีการเติมแบคทีเรียย่อยโปรตีนไอโซเลท W3 พบว่าการเปลี่ยนแปลงของค่า BOD ทั้ง 2 ชุดการทดลองมีการเปลี่ยนแปลงไปในทิศทางเดียวกันและค่า BOD ที่ไม่แตกต่างกัน (รูปที่ 24) เนื่องจากการที่กุ้งมีการเจริญเติบโตและปล่อยสิ่งขับถ่ายออกมามากจึงทำให้มีค่า BOD ที่สูง และยังมีการเติมแบคทีเรียย่อยโปรตีนลงไป จึงเป็นการเพิ่มค่า BOD และค่า BOD ทั้งในชุดควบคุมและที่เติมเชื้อมีค่าสูงเกินไปส่งผลให้มีแอมโมเนียมเกิดขึ้นมาก (รูปที่ 26) และไนเตรท (รูปที่ 27) มากตามปริมาณแอมโมเนียม เป็นเพราะมีการให้อากาศตลอดเวลาค่า DO สูง (รูปที่ 25) ส่งเสริมให้เกิดกระบวนการ nitrification และส่งผลทำให้ pH ลดลงในช่วงหลังของการเลี้ยงกุ้ง จากผลการทดลองส่วนนี้อาจกล่าวได้ว่ามีการให้อาหารกุ้งมากไปจึงมีอาหารส่วนหนึ่งเหลือตกค้าง เมื่อไฟฟ้าดับไม่มีการให้อากาศส่งผลให้กุ้งตาย

ในสภาวะปกติการย่อยสลายสารอินทรีย์จนกระทั่งได้สารที่เสถียรที่ไม่สลายตัวอีก อาจใช้เวลามากคืออย่างน้อยประมาณ 20 วัน (เบญจมินทร์, 2544) ซึ่งจะมีลักษณะที่สอดคล้องกับผลการทดลองที่ค่า BOD ลดลงในวันที่ 20 ของการทดลอง แต่ก็ยังมีค่าสูงด้วยเหตุผลที่กล่าวมาแล้ว

7.2 ปริมาณของแอมโมเนียที่เกิดขึ้นในสภาวะจำลองบ่อเลี้ยงกุ้ง

เนื่องจากสิ่งขับถ่าย อาหารกุ้งที่เหลือมีส่วนประกอบหลักเป็นอินทรีย์ไนโตรเจน ผลจากการย่อยสลายโดยแบคทีเรียย่อยโปรตีน ทำให้เกิดแอมโมเนียหรือแอมโมเนียมขึ้นกับ pH ซึ่งในการทดลองนี้อยู่ในรูปแอมโมเนียมและมีค่า pH ต่ำกว่า 9 (เบญจมินทร์, 2544) จากการวัดค่าแอมโมเนียมในตู้ทดลองทั้ง 2 ชุดการทดลอง (ชุดที่ไม่ใส่แบคทีเรียย่อยโปรตีนและชุดที่ใส่แบคทีเรียย่อยโปรตีน) พบว่าค่าแอมโมเนียมที่วัดได้มีค่าใกล้เคียงกันยกเว้นบางช่วงของการทดลองและเป็นไปในทิศทางเดียวกัน (รูปที่ 26) เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงชุดที่มีการเติมแบคทีเรียจะมีค่าของแอมโมเนียมมากกว่าชุดที่ไม่มีการเติมแบคทีเรีย เนื่องจากมีการใส่แบคทีเรียย่อยโปรตีนลงไป ทำให้ค่าของแอมโมเนียมมีค่าสูง ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณของแบคทีเรียย่อยโปรตีนในตู้ทดลอง (รูปที่ 30) และอยู่ในระยะที่กุ้งมีการเจริญเติบโตจึงมีสิ่งขับถ่ายมากส่งผลให้มีปริมาณแอมโมเนียมในตู้ทดลองมาก ซึ่งจากบทความที่กล่าวใน http://www.shrimpcenter.com/page000495.html

(16/04/2006) ว่าในบ่อที่ควบคุมให้จุลินทรีย์ (heterotropic) มีบทบาทสำคัญในบ่อเลี้ยงกุ้ง ถึงแม้จะมีปริมาณของแอมโมเนียสูงก็จะไม่ส่งผลกระทบต่อการเจริญของกุ้ง ซึ่งจากผลการทดลองนี้พบว่าแอมโมเนียมีค่าสูงเกินค่าที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของกุ้งคือไม่เกิน 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (http://www.kungthai.com/KungThai/con_detail.php?id=19, 2/05/2006) แนวทางหนึ่งที่จะลดปริมาณแอมโมเนียในบ่อเลี้ยงกุ้งคือการเติมแหล่งคาร์บอน (C) ลงไป จุลินทรีย์จะนำคาร์บอนมาเป็นแหล่งพลังงานและดึงไนโตรเจน (แอมโมเนีย) ในน้ำมาเป็นส่วนประกอบในการสร้างตัวเซลล์ (http://www.shrimpcenter.com/page000495.html, 16/04/2006) แต่ของการทดลองนี้ส่งผลกระทบเพราะไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอน ถึงแม้มีการให้อากาศมากพอ และปริมาณแอมโมเนียที่มากเกินไปส่งผลให้กุ้งเจริญได้ไม่ดีเท่าที่ควร

7.3 ปริมาณ NO_3^- ที่เกิดขึ้นในสภาวะจำลองบ่อเลี้ยงกุ้ง

จากกราฟที่แสดงปริมาณไนเตรทในตู้ทดลอง (รูปที่ 27) พบว่าปริมาณของไนเตรทมีค่าที่เพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาของการเลี้ยงและเป็นไปในทิศทางเดียวกันทั้งชุดควบคุมและเติมไอโซเลท W3 แต่ที่ 24 และ 32 วันของการเลี้ยงปริมาณของไนเตรทในชุดที่มีการใส่แบคทีเรียย่อยโปรตีนมีปริมาณที่มากกว่าเล็กน้อยพอสังเกตได้ ปริมาณไนเตรทที่มากขึ้น เนื่องจากการออกซิไดซ์แอมโมเนียมไปเป็นไนไตรท์และเปลี่ยนไนไตรท์เป็นไนเตรท (nitrification) ซึ่งเห็นได้จากรูปที่ 26 และ 27 ที่ช่วงเวลาที่ 24 และ 32 วันของการเลี้ยงที่ปริมาณของแอมโมเนียมลดลงสอดคล้องกับปริมาณไนเตรทที่เพิ่มขึ้นแสดงว่ากระบวนการไนตริฟิเคชัน (nitrification) เกิดขึ้นมากภายในบ่อเลี้ยงกุ้ง เพราะมีการให้ออกซิเจน (DO) อยู่ในระดับ 6-8 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 25) ดังนั้นไนเตรทจึงสะสมมากขึ้นเรื่อยๆภายในบ่อเลี้ยงกุ้ง การเกิดกระบวนการไนตริฟิเคชันทำให้เกิด H^+ และ NO_3^- ส่งผลให้ pH ลดลงมาก และในการลดปริมาณไนเตรททำโดยการถ่ายน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้ง (http://www.shrimpcenter.com/page 000495.html, 16/04/2006) ซึ่งในการทดลองนี้ไม่ได้ทำ จึงอาจเป็นเหตุผลหนึ่งที่ทำให้กุ้งโตช้า

7.4 อุณหภูมิ pH และความเค็มภายในสภาวะจำลองบ่อเลี้ยงกุ้ง

ในการทดลองครั้งนี้ทำการทดลองในช่วงฤดูฝนซึ่งอากาศค่อนข้างเย็นจึงทำให้อุณหภูมิในตู้ทดลองอยู่ในช่วง 24-26 องศาเซลเซียส ซึ่งไม่ค่อยเหมาะสมต่อการเจริญ

ของกุ้งและเชื้อ *Pseudomonas* sp. W3 ด้วย แต่ยังทำให้น้ำทะเลที่ใส่ในการทดลองระเหยออกไปบ้างจึงทำให้ความเค็มของน้ำเพิ่มขึ้นจาก 25 กรัมต่อลิตร ไปเรื่อยๆจนเป็น 32.6 กรัมต่อลิตร ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิและความเค็มยังอยู่ในช่วงที่เจริญได้ของกุ้ง (http://www.shrimpcenter.com/T-shrimp051.html, 12/03/2006) สำหรับการเปลี่ยนแปลงของ pH จะอยู่ในช่วง 6.5-8 โดยที่ในช่วงวันที่ 0-24 ของการเลี้ยงกุ้ง pH ภายในตู้อยู่ระหว่าง 6.9-8 และในช่วงวันที่ 28-32 ของการเลี้ยง pH จะอยู่ในช่วง 6.5-6.97 ซึ่งในช่วงวันที่ 0-24 ค่า pH ภายในตู้เลี้ยงยังคงอยู่ในช่วงที่กุ้งเจริญได้ (http://www.nicaonline.com/articles2/site/ view_article, 8/03/2006) แต่ในช่วงหลังของการเลี้ยงกุ้งพบว่าค่า pH ลดต่ำลงมากคือ เหตุผลหลักจากการเกิดไนตริฟิเคชันดังที่กล่าวมาแล้ว และอาจมีสาเหตุเนื่องจากการเกิดตะกอนและการย่อยสลายสารอินทรีย์ของจุลินทรีย์ภายในตู้เพาะเลี้ยงดังสมการ

$$\text{สารอินทรีย์} + O_2 \xrightarrow{\text{จุลินทรีย์}} CO_2 + H_2O + \text{เซลล์จุลินทรีย์ใหม่} + \text{สารที่เสถียร}$$

$$CO_2 + H_2O \longrightarrow H_2CO_3 \longrightarrow HCO_3^- + H^+$$

$$2NH_3 + 3O_2 \xrightarrow{\text{จุลินทรีย์}} 2NO_2^- + 2\,H_2O + 2\,H^+$$

$$2NO_2^- + O_2 \xrightarrow{\text{จุลินทรีย์}} 2NO_3^-$$

ซึ่งคาร์บอเนต ไฮโดรเจนอิออน และไนเตรททำให้ pH ต่ำไม่เหมาะกับการเลี้ยงกุ้งเพราะทำให้กุ้งอ่อนแอและการเจริญเติบโตชะงัก (เบญจมินทร์, 2544)

7.5 ปริมาณเชื้อในสภาวะจำลองบ่อเลี้ยงกุ้ง

7.5.1 ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด (HPC)

จากการนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดภายในตู้ทดลองที่มีการเติมเชื้อ *Pseudomonas* sp. W3 และไม่มีการเติมเชื้อแบคทีเรีย (รูปที่ 28) พบว่าที่จุดเริ่มต้นของชุดการทดลองทั้ง 2 ชุด จำนวนของเชื้อแบคทีเรียมีปริมาณที่แตกต่างกันเพราะการเติมเชื้อ แต่เมื่อเวลาผ่านไปเป็นเวลา 4 วัน จำนวนของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ชุดการทดลองมีปริมาณที่ใกล้เคียงกันและหลังจากนั้นมีปริมาณเพิ่มขึ้น เนื่องมาจากในตู้ที่มีการเติมเชื้อ *Pseudomonas* sp. W3 มีการปรับตัวให้เหมาะสมต่อสภาวะแวดล้อมภายในตู้ทดลองที่มี

สภาพที่แตกต่างจากสภาวะที่เลี้ยงภายในห้องทดลอง และสำหรับชุดที่ไม่เติมเชื้อการมีแบคทีเรียเกิดขึ้นภายในตู้เป็นการปนเปื้อนจากอุปกรณ์และวัสดุ เช่น น้ำที่ใช้ภายในตู้ที่เลี้ยงรวมทั้งมากับตัวกุ้งที่ใช้ทดลองก็เป็นได้ และในชุดการทดลองที่มีการเติมเชื้อ *V. harveyi* และอีกชุดที่มีการเติมทั้งเชื้อ *V. harveyi* และเชื้อ *Pseudomonas* sp. W3 และชุดที่ไม่มีการเติมเชื้อแบคทีเรีย (รูปที่ 29) ปริมาณของเชื้อภายในตู้ก็มีปริมาณใกล้เคียงกัน ยกเว้นที่จุดเริ่มต้นการเลี้ยงก็ด้วยเหตุดังที่กล่าวมาแล้ว แต่พอสังเกตได้ว่าชุดที่ไม่เติมเชื้อมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดสูงสุดตามด้วยชุดที่เติมเชื้อ W3 และ *V. harveyi* และต่ำสุดในตู้ที่เติม *V. harveyi* เพียงอย่างเดียวทำให้ *V. harveyi* เจริญได้ดีผู้แข่งขันน้อยหรือตัวควบคุมไม่มี (รูปที่ 31) และเป็นการแสดงว่าการเติมเชื้อลงไม่ว่าจะเป็นไอโซเลท W3 หรือ *V. harveyi* หรือทั้ง 2 เชื้อ เชื้อที่เติมลงไปส่วนหนึ่งยังคงมีการเจริญเติบโต และกิจกรรมของเชื้อส่งผลต่อคุณสมบัติทางเคมี-กายภาพของน้ำในตู้เลี้ยงดังที่กล่าวมาแล้ว และยังมีผลต่อการเจริญเติบโตของกุ้ง ซึ่งจะกล่าวต่อไป

7.5.2 ปริมาณแบคทีเรียย่อยโปรตีน

เมื่อทำการนับปริมาณของเชื้อแบคทีเรียย่อยโปรตีนในตู้การทดลองที่มีการเติมเชื้อ *Pseudomonas* sp. W3 และไม่มีการเติมเชื้อแบคทีเรีย (รูปที่ 30) ปริมาณของเชื้อแบคทีเรียย่อยโปรตีนก็มีปริมาณที่ใกล้เคียงกัน เนื่องจากแบคทีเรียย่อยโปรตีนสามารถพบได้ในบ่อเลี้ยงกุ้ง (บ่อดิน) แบคทีเรียย่อยโปรตีนจัดอยู่ในกลุ่มผู้ย่อยสลายในบ่อเลี้ยงกุ้ง (เบจมินทร์, 2544) และอาจเป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ในกลุ่ม ammonifying bacteria ที่อยู่ในวัฏจักรไนโตรเจน โดยจะย่อยสารอินทรีย์ไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียหรือแอมโมเนียม (ดวงพร, 2545) แต่เนื่องจากไอโซเลท W3 ไม่มีเอนไซม์ย่อยยูเรีย (Urease) ที่จะทำให้เกิดแอมโมเนีย (NH_3) (ตามตารางที่ 2) แต่ปริมาณแอมโมเนียม (NH_4^+) ของชุดที่เติมเชื้อสูงกว่าชุดที่ไม่เติม ในบางจุด (รูปที่ 26) แสดงว่าอาจเกิดจากกรดอะมิโนที่ได้จากการย่อยโดยไอโซเลท W3 ส่งเสริมการเจริญของ proteolytic bacteria ที่มี เอนไซม์ย่อยยูเรีย (urease) จากผลการทดลองนี้แสดงว่า การเติมแบคทีเรียย่อยโปรตีนเพื่อคาดหวังว่าจะช่วยเรื่องการย่อยสลายสารอาจไม่จำเป็น และควบคุมยากที่จะบรรลุวัตถุประสงค์ในการควบคุมคุณภาพน้ำ วิธีที่ง่ายกว่าในการจัดการคือ การให้อาหารในปริมาณที่พอเหมาะให้กุ้งกินหมด เพื่อให้ระบบนิเวศเข้าสู่สมดุลได้ภายในระยะเวลาที่สั้น

7.5.3 ปริมาณ *V. harveyi*

สำหรับการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *V. harveyi* ที่ก่อโรคในกุ้งโดยเชื้อ *Pseudomonas* sp. W3 เมื่อเปรียบเทียบปริมาณของเชื้อ *V. harveyi* ในชุดการทดลองที่มีการเติมเชื้อ *V. harveyi* เพียงอย่างเดียวลงไปในตู้ทดลองกับชุดที่เติมทั้งเชื้อ *Pseudomonas* W3 และเชื้อ *V. harveyi* พบว่าชุดที่มีการเติมเชื้อทั้ง 2 ชนิด ปริมาณ *V. harveyi* ลดลงอยู่ในช่วง 0.94-1.66 log CFU/ml ที่วันที่ 12 และ 32 ของการเลี้ยงกุ้ง (รูปที่ 31) แสดงว่า *Pseudomonas* sp. W3 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *V. harveyi* ได้ และพบว่าการมี *V. harveyi* ในน้ำเลี้ยงกุ้งมากย่อมมีโอกาสที่ไปจู่โจมกุ้งทำให้กุ้งติดเชื้อได้ ซึ่งจำนวนของเชื้อ *V. harveyi* ที่ก่อให้เกิดโรคกับกุ้งในระยะ post larva ของกุ้งขาวคือ 10^5 CFU/ml ทำให้เกิดโรค negricans และโรคเรืองแสงในกุ้งขาว (Robertson *et al*., 1998; Aguirre-Guzmán *et al*., 2001) ซึ่งสังเกตได้จากการพบการเรืองแสงของกุ้งในตู้ที่ไม่มีการเติม *Pseudomonas* sp. W3 ส่งผลให้การเจริญเติบโตของกุ้งต่ำกว่าชุดที่มีการเติม *Pseudomonas* sp. W3 (รูปที่ 32) และการที่พบว่ามีกุ้งตายในตู้ที่เติมเฉพาะเชื้อ *V. harveyi* เมื่อเลี้ยงไปได้ 2 วัน โดยตายถึง 40% ก็เป็นช่วงที่เชื้อ *V. harveyi* มีปริมาณสูงถึง 2.8 x 10^5 CFU/ml แต่ในชุดการทกลองที่มีเชื้อ *Pseudomonas* sp. W3 อยู่ด้วยพบกุ้งตายในวันที่ 4 ของการเลี้ยง และมีการตายน้อยกว่า (35%) แม้ว่าปริมาณเชื้อ *V. harveyi* ที่เวลาดังกล่าวไม่ต่างกัน แสดงว่าสารยับยั้งที่หลั่งออกมาโดย *Pseudomonas* sp. W3 ทำให้เชื้อ *V. harveyi* อ่อนแอก็เป็นได้จึงไม่อาจจู่โจมกุ้งได้ดีเท่าที่ควรมีนักวิจัยจำนวนมากศึกษาเกี่ยวกับการใช้เชื้อแบคทีเรียซึ่งผลิตสารปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *V. harveyi* ซึ่งแบคทีเรียดังกล่าวได้แก่ เชื้อ *Bacillus* ซึ่งเป็นที่ยอมรับในระดับอุตสาหกรรม ถึงแม้ว่าเชื้อ *Bacillus* ไม่ได้เป็นเชื้อประจำถิ่นในทะเล (Gullian *et al.*, 2004; Rengpipat *et al.*, 2000) และยังมีการค้นพบว่าเชื้อที่แยกได้จากทะเลมีจำนวนน้อยที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้ ซึ่งเชื้อจากทะเลที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะส่วนใหญ่จะอยู่ในจีนัส (Genus) *Alteromonas* (Dopazo *et al.*, 1988; Tanasomwang *et al.*, 1998; Gullian *et al.*, 2004) และจากรายงานการศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *V. harveyi* ของ Chythanya และคณะ (2002) Than และคณะ (2004) และ Vijayan และคณะ (2006) พบว่าเชื้อที่แยกได้จากทะเลเป็นเชื้อในจีนัส (Genus) *Pseudomonas* ซึ่ง Than และคณะ (2004) ยังได้

รายงานอีกว่าเชื้อที่แยกได้จากทะเลพวก *Pseudomonas* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแกรมลบได้ดีกว่าเชื้อแกรมบวก และสำหรับการศึกษานี้ผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ และการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก สนับสนุนว่า *Pseudomonas* sp. W3 น่าจะเป็นเชื้อที่มีอยู่ตามธรรมชาติมากกว่าจะเป็นเชื้อที่ไปปนเปื้อนอยู่ในธรรมชาติซึ่งมีความน่าสนใจสำหรับการนำไปศึกษาต่อ

7.6 การเจริญเติบโตของกุ้งที่เลี้ยงในสภาวะจำลองบ่อเลี้ยงกุ้ง

7.6.1 ผลการเติมเชื้อไอโซเลท W3 เพื่อรักษาคุณภาพน้ำ

จากการเจริญของกุ้งในชุดที่มีการเติมแบคทีเรียย่อยโปรตีนลงไปเมื่อเทียบกับชุดที่ไม่มีการเติมแบคทีเรียพบว่าการเจริญเติบโตของกุ้งทั้ง 2 ชุดมีค่าที่ใกล้เคียงกัน ทำให้สรุปได้ว่าการเติมแบคทีเรียย่อยโปรตีนไอโซเลท W3 ไม่กระทบต่อการเจริญของกุ้ง และจากรูปที่ 30 พบว่าในวันที่ 30 ของการเลี้ยงจะมีอัตราการเจริญต่อวันโดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์เท่ากับ 9.41% ซึ่งมีอัตราการเจริญของกุ้งใกล้เคียงกับชุดควบคุม (9.44%) ซึ่งเป็นสาเหตุมาจากค่าที่สูงของ BOD แอมโมเนีย (NH_4^+) ไนเตรท (NO_3^-) เกินค่าที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกุ้ง ขณะที่อุณหภูมิก็ต่ำกว่าค่าที่เหมาะสมต่อการเจริญของกุ้ง และ pH ที่ต่ำในช่วงหลังของการเลี้ยง (อยู่ในช่วง 6.5-6.97) การที่ pH อยู่ในช่วงดังกล่าว มีข้อดีคือ ทำให้พวกสารอนินทรีย์ไนโตรเจนอยู่ในรูปแอมโมเนียมที่ไม่มีพิษต่อกุ้ง แต่ pH ที่ต่ำมากก็ส่งผลเสียทำให้กุ้งเกิดอาการเครียด การกินอาหารสะดุด และภูมิคุ้มกันลดลงได้ ซึ่งผลของอาการดังกล่าวทำให้การเจริญของกุ้งชะงักได้ (เบจมินทร์, 2544) จากผลที่กล่าวมาเป็นผลที่เกิดเป็นลูกโซ่จากการมีสารอินทรีย์มากดังที่กล่าวมาแล้วในช่วงต้น แสดงว่าการเติมเชื้อเพื่อรักษาคุณภาพน้ำยากในการจัดการเพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์

7.6.2 ผลการเติมเชื้อไอโซเลท W3 เพื่อควบคุม *V. harveyi*

เมื่อวัดการเจริญของกุ้งในตู้ที่มีการเติมเชื้อแบคทีเรียย่อยโปรตีนไอโซเลท W3 เท่านั้น พบว่าการเจริญมีลักษณะเช่นเดียวกับในตู้ที่ไม่มีการเติมเชื้อ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับตู้ที่มีการเติมเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. W3 รวมกับ *V. harveyi* และอีกชุดที่เติม *V. harveyi* เพียงชนิดเดียว พบว่าอัตราการเจริญของกุ้งของตู้ที่มีการเติมเชื้อแบคทีเรีย 2 ชนิดสูงกว่าตู้ที่เติมเชื้อ *V. harveyi* เพียงชนิดเดียวและสูงกว่าชุดทดสอบอื่นๆด้วย

เนื่องจากเมื่อกุ้งติดเชื้อ *V. harveyi* กุ้งจะมีอาการ ไม่กินอาหาร สีซีดลง และเกิดการเรืองแสงในเวลากลางคืน (http://www.kungthai.com/KungThai/ con_detail.php? id=28, 15/03/2006) ซึ่งพบในการทดลองนี้ และเหตุผลของการติดเชื้อ *V. harveyi* ได้กล่าวมาแล้ว จากการทดลองแสดงว่าการเติมเชื้อที่ควบคุม *V. harveyi* ได้ทำให้กุ้งมีอัตราการเจริญดีกว่าชุดการทดลองอื่นๆ เพราะกุ้งแข็งแรงกว่าเนื่องจากไม่มีเชื้อโรค และแสดงว่าในธรรมชาติย่อมมีเชื้อ *V. harveyi* อยู่แม้ว่าในการทดลองนี้ไม่ได้ตรวจนับ *V. harveyi* ในชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อ ดังนั้นการป้องกันการติดเชื้อจึงเป็นสิ่งจำเป็นที่ควบคู่กับการรักษาคุณภาพน้ำให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกุ้ง