



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การศึกษานิตและจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร
ของกุ่มกำมกรามในจังหวัดขอนแก่น และจังหวัดกาฬสินธุ์

โดย ดร. วิชัย สีสาวีรมาศ

เดือน ปี ที่เสร็จโครงการ

มกราคม 2545

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การศึกษานิตและจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร
ของกิ้งก่ามกราคมในจังหวัดขอนแก่น และจังหวัดกาฬสินธุ์

คณะผู้วิจัย

ดร. วิชัย สิลาวรรมาศ

สังกัด

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เดือน ปี ที่เสร็จโครงการ

มกราคม 2545

บทคัดย่อ

จากการศึกษาถึงชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากระบบทางเดินอาหารของกิ้งก่ามกรามที่เพาะเลี้ยงในบ่อเลี้ยงพื้นที่จังหวัดขอนแก่น และจังหวัดกาฬสินธุ์ ในระหว่างเดือนกรกฎาคม 2543 ถึงเดือนมิถุนายน 2544 สามารถตรวจพบชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งสิ้น 3 ชนิด ได้แก่ *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* และ *Pseudomonas aeruginosa* ในรอบที่สองระหว่างเดือนเมษายน 2544 ถึงเดือนกรกฎาคม 2544 ตรวจพบชนิดของเชื้อเพิ่มขึ้นอีก 2 ชนิด คือ *Bacillus megaterium* และ *Bacillus subtilis* ปริมาณเชื้อที่พบในทางเดินอาหารกิ้งก่ามกรามมากที่สุดทั้ง 2 พื้นที่ คือ *S. aureus* โดยที่ในเขตจังหวัดขอนแก่นจะพบอยู่ในช่วง 1.77×10^7 - 2.36×10^7 cfu/g ของน้ำหนักลำไส้ ส่วนในจังหวัดกาฬสินธุ์พบอยู่ระหว่าง 1.02×10^7 - 1.44×10^7 cfu/g ของน้ำหนักลำไส้ ปริมาณเชื้อที่พบว่ามีจำนวนรองลงมา ได้แก่ *P. aeruginosa* และ *B. cereus* ซึ่งในจังหวัดขอนแก่นพบอยู่ระหว่าง 8.48×10^6 - 9.27×10^6 cfu/g และ 2.28×10^6 - 2.59×10^6 cfu/g ของน้ำหนักลำไส้ ตามลำดับ ส่วนในจังหวัดกาฬสินธุ์ พบปริมาณระหว่าง 7.19×10^6 - 1.08×10^6 cfu/g และ 1.61×10^6 - 1.95×10^6 cfu/g ของน้ำหนักลำไส้ ตามลำดับ เมื่อนำเชื้อที่แยกได้ทั้ง 5 ชนิดมาทดสอบหาศักยภาพการยับยั้งเชื้อก่อโรคในกิ้งก่ามกราม คือ *Aeromonas hydrophila* โดยใช้วิธีการซึมผ่านกระดาษกรองและวิธีการซึมผ่านวุ้น พบว่ามีเชื้อเพียงชนิดเดียวคือ *P. aeruginosa* ที่มีบริเวณของการเกิด clear zone inhibition กับเชื้อทดสอบดังกล่าว และให้สารที่มีสีเขียวออกมาตรงส่วนที่มีการยับยั้งด้วย เมื่อนำเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Bacillus* ทั้งหมดไปศึกษาสภาวะของการเพาะเลี้ยงพบว่า สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *B. cereus* อยู่ที่ pH 6.0 และอุณหภูมิ 30 °ซ *B. subtilis* มีอัตราการเจริญสูงสุดอยู่ที่ pH 6.5 และอุณหภูมิ 37 °ซ ส่วน *B. megaterium* มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญที่ pH 6.5 และอุณหภูมิ 40 °ซ เมื่อเพาะเลี้ยงโดยอัตราการเข้าของทุกเชื้ออยู่ที่ 200 รอบต่อนาที ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมของแต่ละเชื้อดังกล่าวจะนำไปสู่การผลิตในระดับขยายส่วนเพื่อที่จะใช้เป็นโปรไบโอติกผสมอาหารทดลองเลี้ยงกิ้งก่ามกรามต่อไป

Abstract

Types and quantity of gastrointestinal microfloras of giant freshwater prawns (*Macrobrachium rosenbergii* de Man) which were cultivated in Khon Kaen and Kalasin provinces were studied. Three strains of the microfloras, which were *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, were found entire the cultivation in both Khon Kaen and Kalasin provinces. Two more strains, which were *Bacillus megaterium* and *Bacillus subtilis*, were found only in the second crop of cultivation in Kalasin province. *S. aureus* was the bacteria which was found in the highest number in both areas. It was found in the range of $1.77 \times 10^7 - 2.36 \times 10^7$ cfu/g and $1.02 \times 10^7 - 1.44 \times 10^7$ cfu/g in Khon Kaen and Kalasin provinces respectively. In Khon Kaen province, *P. aeruginosa* and *B. cereus* were found in the range of $8.48 \times 10^6 - 9.27 \times 10^6$ cfu/g and $2.28 \times 10^6 - 2.59 \times 10^6$ cfu/g respectively. In Kalasin province, *P. aeruginosa* and *B. cereus* were also found in the similar range ($7.19 \times 10^6 - 9.27 \times 10^6$ cfu/g and $1.61 \times 10^6 - 1.95 \times 10^6$ cfu/g respectively). All of the isolated microflora were tested for their ability in growth inhibition of *Aeromonas hydrophila*, the shrimp's pathogenic microorganism, by well diffusion assay and paperdisc plate method. The results showed that only *P. aeruginosa* gave a positive result by producing a clear zone in both methods. The green pigment was also seen in the clear zone. The optimum conditions for growth of the isolated bacteria were examined. The optimum pH for the growth of *B. cereus*, *B. subtilis* and *B. megaterium* were 6.0, 6.5 and 6.5 respectively. The optimum temperatures for the growth of *B. cereus*, *B. subtilis* and *B. megaterium* were 30, 37 and 42^o C respectively. The shaking speed used was 200 rpm for all of the isolated *Bacillus* sp. The optimum condition for the bacterial growth will be used for probiotics production for feeding the freshwater prawns in the next experiments.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
สารบัญ	ค
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
สัญลักษณ์และคำย่อ	ญ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 ขั้นตอนและระเบียบวิธีวิจัย	2
1.4 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
1.6 หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์	3
บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
บทที่ 3 วัสดุ และอุปกรณ์	30
3.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง	30
3.2 กุ้งก้ามกรามที่ใช้ในการทดลอง	30
3.3 เคมีภัณฑ์	30
3.4 ครุภัณฑ์	31
บทที่ 4 วิธีการดำเนินการวิจัย	32
4.1 ขั้นตอนและวิธีการคัดแยกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร ของกุ้งก้ามกราม	32
4.2 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้ จากระบบทางเดินอาหารของกุ้งก้ามกรามเพื่อจะนำมาใช้เป็น Probiotics	40
4.3 การคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรค	40

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 ผลการวิจัย	42
5.1 ผลของการศึกษาชนิดและปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร ของตัวอย่าง กุ้งก้ามกรามที่เก็บจากฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกราม ใน จ. ขอนแก่น และ จ. กาฬสินธุ์	42
5.2 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ ที่แยกได้จากระบบทางเดินอาหารของกุ้งก้ามกรามเพื่อจะนำมาใช้เป็น Probiotics	52
5.3 ผลของการคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรค	62
บทที่ 6 วิจารณ์ผลการทดลอง	67
บทที่ 7 สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ	71
เอกสารอ้างอิง	72
Output ที่ได้จากโครงการ	81
ภาคผนวก	

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงปริมาณแบคทีเรียที่พบมากในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์	5
ตารางที่ 2 แสดงปริมาณจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารของมนุษย์ในอายุต่างๆ	6
ตารางที่ 3 แสดงปริมาณจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ปีก	7
ตารางที่ 4 แสดงปริมาณจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของสุกร	8
ตารางที่ 5 แสดงคุณสมบัติของจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโพรไบโอติกสำหรับมนุษย์และสัตว์	17
ตารางที่ 6 แสดงสมบัติและกลไกการออกฤทธิ์ของโพรไบโอติก (Probiotics) และสารปฏิชีวนะ (Antibiotics)	19
ตารางที่ 7 แสดงชนิดของจุลินทรีย์ที่สามารถใช้เป็นโพรไบโอติก	20
ตารางที่ 8 แสดงแบคทีเรียที่ใช้เป็นโพรไบโอติกในสุกร	22
ตารางที่ 9 แสดงแบคทีเรียที่ใช้เป็นโพรไบโอติกในไก่	23
ตารางที่ 10 แสดงการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	25
ตารางที่ 11 แสดงการเก็บตัวอย่างกุ้งก้ามกรามจาก จ. ขอนแก่น ในช่วงเดือน กรกฎาคม 2542 ถึง มกราคม 2543	42
ตารางที่ 12 แสดงการเก็บตัวอย่างกุ้งก้ามกรามรอบที่ 1 จาก จ. กาฬสินธุ์ ในช่วงเดือน สิงหาคม 2542 ถึง มิถุนายน 2543	43
ตารางที่ 13 แสดงการเก็บตัวอย่างกุ้งก้ามกรามรอบที่ 2 จาก จ. กาฬสินธุ์ ในช่วงเดือน เมษายน 2543 ถึง กรกฎาคม 2543	44
ตารางที่ 14 แสดงลักษณะการเจริญและการทดสอบทางชีวเคมีของ <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus megaterium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> และ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ที่แยกได้จากลำไส้ของตัวอย่างกุ้งก้ามกรามจาก จ. ขอนแก่น และ จ. กาฬสินธุ์	49

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 แสดงปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ในลำไส้ของมนุษย์ที่เปลี่ยนแปลงไปตามวัย	4
ภาพที่ 2 แสดงวงจรชีวิตของกิ้งก่ามกราคม	10
ภาพที่ 3 แสดงแผนผังปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการคัดเลือกโพรไบโอติก	21
ภาพที่ 4 แสดงบ่อดินที่เกษตรกรใช้ทำการเพาะเลี้ยงกิ้งก่ามกราคม	33
ภาพที่ 5 แสดงการเก็บตัวอย่างกิ้งก่ามกราคมในบ่อโดยใช้สวิงขนาดเล็กส้อมลากไปหั่วบ่อ	34
ภาพที่ 6 แสดงการล้างทำความสะอาดตัวอย่างกิ้งก่ามกราคมที่ส้อมได้จากบ่อ	34
ภาพที่ 7 แสดงวิธีการทำให้ตัวอย่างกิ้งก่ามกราคมหมดสติโดยใช้น้ำแข็ง	35
ภาพที่ 8 แสดงวิธีการตัดเลาะตามลำตัวกิ้งก่ามกราคมเพื่อทำการแยกลำไส้ออกมา	35
ภาพที่ 9 แสดงการบดลำไส้กิ้งก่ามกราคมเพื่อทำการศึกษานิคและจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ในลำไส้ของกิ้งก่ามกราคมในขั้นตอนต่อไป	36
ภาพที่ 10 แสดงการศึกษานิคและจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ในลำไส้กิ้งก่ามกราคมโดยวิธีการ streak plate และ pour plate technique	36
ภาพที่ 11 แสดงการบ่มเชื้อจุลินทรีย์ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน โดยการใช้ anaerobic jar	37
ภาพที่ 12 แสดงปริมาณเชื้อทั้งหมดที่นับได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ NA และ YM ในสภาวะที่มีออกซิเจนจากลำไส้กิ้งก่ามกราคมในบ่อเพาะเลี้ยงของเกษตรกร จ. ขอนแก่น	45
ภาพที่ 13 แสดงปริมาณเชื้อทั้งหมดที่นับได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ NA และ YM ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนจากลำไส้กิ้งก่ามกราคมในบ่อเพาะเลี้ยงของเกษตรกร จ. ขอนแก่น	46
ภาพที่ 14 แสดงปริมาณเชื้อทั้งหมดที่นับได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ NA และ YM ในสภาวะที่มีออกซิเจน ครั้งที่ 1 จากลำไส้กิ้งก่ามกราคมในบ่อเพาะเลี้ยงของเกษตรกร จ. กาฬสินธุ์	46
ภาพที่ 15 แสดงปริมาณเชื้อทั้งหมดที่นับได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ NA และ YM ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ครั้งที่ 1 จากลำไส้กิ้งก่ามกราคมในบ่อเพาะเลี้ยงของเกษตรกร จ. กาฬสินธุ์	47

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า
ภาพที่ 16 แสดงปริมาณเชื้อทั้งหมดที่นับได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ NA และ YM ในสถานะที่มีออกซิเจน ครั้งที่ 2 จากลำไส้กึ่งก้ำกรามในบ่อเพาะเลี้ยง ของเกษตรกร จ. กาฬสินธุ์	47
ภาพที่ 17 แสดงปริมาณเชื้อทั้งหมดที่นับได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ NA และ YM ในสถานะที่ไม่มีออกซิเจน ครั้งที่ 2 จากลำไส้กึ่งก้ำกรามในบ่อเพาะเลี้ยง ของเกษตรกร จ. กาฬสินธุ์	48
ภาพที่ 18 แสดงจำนวนเชื้อที่นับได้จากลำไส้กึ่งก้ำกราม ในบ่อเพาะเลี้ยง จ. ขอนแก่น ประกอบไปด้วย <i>Staphylococcus aureus</i> (KKNA1), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (KKNA2) และ <i>Bacillus cereus</i> (KKNA3)	50
ภาพที่ 19 แสดงจำนวนเชื้อที่นับได้จากลำไส้กึ่งก้ำกราม ในบ่อเพาะเลี้ยง จ. กาฬสินธุ์ ครั้งที่ 1 ประกอบไปด้วย <i>Staphylococcus aureus</i> (KSNA1), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (KSNA2) และ <i>Bacillus cereus</i> (KSNA3)	51
ภาพที่ 20 แสดงจำนวนเชื้อที่นับได้จากลำไส้กึ่งก้ำกราม ในบ่อเพาะเลี้ยง จ. กาฬสินธุ์ ครั้งที่ 2 ประกอบไปด้วย <i>Staphylococcus aureus</i> (KSNA1.1), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (KSNA1.2), <i>Bacillus cereus</i> (KSNA1.3), <i>Bacillus subtilis</i> (KSNA1.4) และ <i>Bacillus megaterium</i> (KSNA1.5)	51
ภาพที่ 21 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Bacillus cereus</i> ที่อุณหภูมิ 30 °ซ และช่วงอาหารเลี้ยงเชื้อระดับต่าง ๆ	52
ภาพที่ 22 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Bacillus cereus</i> ที่อุณหภูมิ 35 °ซ และช่วงอาหารเลี้ยงเชื้อระดับต่าง ๆ	53
ภาพที่ 23 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Bacillus cereus</i> ที่อุณหภูมิ 37 °ซ และช่วงอาหารเลี้ยงเชื้อระดับต่าง ๆ	53
ภาพที่ 24 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Bacillus cereus</i> ที่อุณหภูมิ 40 °ซ และช่วงอาหารเลี้ยงเชื้อระดับต่าง ๆ	54
ภาพที่ 25 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Bacillus cereus</i> ที่อุณหภูมิ 42 °ซ และช่วงอาหารเลี้ยงเชื้อระดับต่าง ๆ	54

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า
ภาพที่ 26 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Bacillus megaterium</i> ที่อุณหภูมิ 30 °ซ และช่วงอาหารเลี้ยงเชื้อระดับต่าง ๆ	55
ภาพที่ 27 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Bacillus megaterium</i> ที่อุณหภูมิ 35 °ซ และช่วงอาหารเลี้ยงเชื้อระดับต่าง ๆ	56
ภาพที่ 28 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Bacillus megaterium</i> ที่อุณหภูมิ 37 °ซ และช่วงอาหารเลี้ยงเชื้อระดับต่าง ๆ	56
ภาพที่ 29 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Bacillus megaterium</i> ที่อุณหภูมิ 40 °ซ และช่วงอาหารเลี้ยงเชื้อระดับต่าง ๆ	56
ภาพที่ 30 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Bacillus megaterium</i> ที่อุณหภูมิ 42 °ซ และช่วงอาหารเลี้ยงเชื้อระดับต่าง ๆ	57
ภาพที่ 31 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Bacillus subtilis</i> ที่อุณหภูมิ 30 °ซ และช่วงอาหารเลี้ยงเชื้อระดับต่าง ๆ	57
ภาพที่ 32 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Bacillus subtilis</i> ที่อุณหภูมิ 35 °ซ และช่วงอาหารเลี้ยงเชื้อระดับต่าง ๆ	58
ภาพที่ 33 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Bacillus subtilis</i> ที่อุณหภูมิ 37 °ซ และช่วงอาหารเลี้ยงเชื้อระดับต่าง ๆ	58
ภาพที่ 34 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Bacillus subtilis</i> ที่อุณหภูมิ 40 °ซ และช่วงอาหารเลี้ยงเชื้อระดับต่าง ๆ	59
ภาพที่ 35 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Bacillus subtilis</i> ที่อุณหภูมิ 42 °ซ และช่วงอาหารเลี้ยงเชื้อระดับต่าง ๆ	59
ภาพที่ 36 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ที่ อุณหภูมิ 30 °ซ และช่วง pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อระดับต่าง ๆ	60
ภาพที่ 37 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ที่ อุณหภูมิ 35 °ซ และช่วง pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อระดับต่าง ๆ	60
ภาพที่ 38 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ที่ อุณหภูมิ 37 °ซ และช่วง pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อระดับต่าง ๆ	61
ภาพที่ 39 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ที่ อุณหภูมิ 40 °ซ และช่วง pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อระดับต่าง ๆ	61

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า
ภาพที่ 40 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ที่ อุณหภูมิ 42 °ซ และช่วง pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อระดับต่าง ๆ	62
ภาพที่ 41 แสดงการยับยั้งเชื้อก่อโรคในกุ้งก้ามกราม <i>Aeromonas hydrophila</i> โดยใช้ส่วนน้ำใสของเชื้อ <i>Staphylococcus aureus</i> (S.a), <i>Bacillus subtilis</i> (B.s), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (P.a), <i>Bacillus megaterium</i> (B.m) และ <i>Bacillus cereus</i> (B.c) หยอดลงบนกระดาศกรอง	63
ภาพที่ 42 แสดงการเปรียบเทียบการยับยั้งเชื้อก่อโรคในกุ้งก้ามกราม <i>Aeromonas hydrophila</i> โดยส่วนน้ำใสของเชื้อ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (P.a) และ <i>Bacillus megaterium</i> (B.m) หยอดลงบนกระดาศกรองความเข้มข้น 100 µl	64
ภาพที่ 43 แสดงการเปรียบเทียบการยับยั้งเชื้อก่อโรคในกุ้งก้ามกราม <i>Aeromonas hydrophila</i> โดยส่วนน้ำใสของเชื้อ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (P.a) และ <i>Bacillus megaterium</i> (B.m) หยอดลงบน กระดาศกรองความเข้มข้น 300 µl	64
ภาพที่ 44 แสดงการเปรียบเทียบการยับยั้งเชื้อก่อโรคในกุ้งก้ามกราม <i>Aeromonas hydrophila</i> โดยส่วนน้ำใสของเชื้อ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (P.a) และ <i>Bacillus megaterium</i> (B.m) หยอดลงบนกระดาศกรองความเข้มข้น 500 µl	65
ภาพที่ 45 แสดงการยับยั้งเชื้อก่อโรคในกุ้งก้ามกราม <i>Aeromonas hydrophila</i> โดยใช้ส่วนน้ำใสของเชื้อ <i>Bacillus megaterium</i> (B.m) , <i>Bacillus cereus</i> (B.c), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (P.a) และ <i>Bacillus subtilis</i> (B.s) เปรียบเทียบกับ Control(อาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth ที่ปราศจากเชื้อ) โดยการหยอดลงในหลุม	65
ภาพที่ 46 แสดงการเกิดสารสีเขียวและบริเวณของการยับยั้งของ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (P.a) โดยวิธีการ streak เชื้อ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (P.a) ลงบนเชื้อ <i>Aeromonas hydrophila</i> (A.h) เปรียบเทียบกับการ streak เชื้อ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (P.a) ลงบนอาหารวุ้นแข็งเพียงชนิดเดียว	66
ภาพที่ 47 แสดงการเกิดสารสีเขียวและบริเวณของการยับยั้งของ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (P.a) โดยวิธีการ streak เชื้อ <i>Aeromonas hydrophila</i> (A.h) ลงบนเชื้อ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (P.a) เปรียบเทียบกับการ streak เชื้อ <i>Aeromonas hydrophila</i> (A.h) ลงบนอาหารวุ้นแข็งเพียงชนิดเดียว	66

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ก.	=	กรัม
ซม.	=	เซนติเมตร
มก.	=	มิลลิกรัม
มม.	=	มิลลิเมตร
มล.	=	มิลลิลิตร
μg	=	ไมโครกรัม
$^{\circ}\text{C}$	=	องศาเซลเซียส
OD	=	Optimal density
sp.	=	1 species
spp.	=	> 1 species

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

กุ้งก้ามกรามเป็นสัตว์น้ำที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ มีราคาแพง เนื้อมีรสชาติดี สามารถประกอบอาหารได้หลายรูปแบบ สามารถดำรงชีพได้ทั้งน้ำกร่อยและน้ำจืด ปัจจุบันความอุดมสมบูรณ์ของกุ้งก้ามกรามในแหล่งน้ำธรรมชาติ มีจำนวนลดลงเนื่องมาจากหลายสาเหตุ เช่น การทำการประมงผิดวิธี ปัญหาจากมลภาวะต่าง ๆ ดังนั้นจึงมีการเพาะเลี้ยงเพื่อชดเชยจากธรรมชาติทำให้การเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามเป็นอาชีพหนึ่งซึ่งทำรายได้ให้กับเกษตรกร

ประเทศไทยมีการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามกันมาแล้วกว่า 40 ปี โดยเริ่มทำการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามครั้งแรกในราวๆ ปี พ.ศ. 2499 แต่การพัฒนาการเลี้ยงยังไม่พัฒนาไปมากนักวิธีการเลี้ยงในปัจจุบันยังเป็นวิธีเดิมกับที่เลี้ยงกันมาเมื่อ 10 ปีก่อน ทำให้ปัญหาและอุปสรรคที่เกิดขึ้นไม่ได้รับการแก้ไข อาทิเช่น ปัญหาถูกกุ้งมีอัตราการรอดต่ำ กุ้งโตช้า ปัญหาโรค เป็นต้น (วิศณุ บุญญาวิวัฒน์, 2541) ปัญหาเกี่ยวกับโรคส่วนใหญ่จะมีสาเหตุมาจากแบคทีเรีย โดยเฉพาะในกลุ่มของ *Aeromonas* และ *Vibrio* มีผลทำให้กุ้งมีอัตราการรอดต่ำ การป้องกันจะมีการใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะ การใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะนี้จะก่อให้เกิดการปนเปื้อนอยู่ในน้ำและสิ่งแวดล้อมซึ่งจะเหนี่ยวนำให้เชื้อแบคทีเรียและเชื้อโรคมมีความต้านทานหรือดื้อยาและสารเคมีสูง จนไม่สามารถควบคุมการเกิดโรคได้ และเมื่อมีการสะสมของยาหรือสารเคมีในการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกราม ก็จะส่งผลกระทบต่อคุณภาพของสัตว์น้ำและรวมไปถึงสิ่งแวดล้อมอีกด้วย ประเทศที่พัฒนาแล้วจะมีการออกกฎหมายต่อต้านการใช้สารเคมีและสารปฏิชีวนะในอาหาร

การนำเชื้อจุลินทรีย์เป็น โพรไบโอติก (probiotics) เสริมสร้างให้กุ้งแข็งแรงจึงน่าจะเป็นทางเลือกใหม่ในการลดการใช้สารปฏิชีวนะลงได้ ซึ่งการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีการใช้โพรไบโอติกไม่แพร่หลายนัก และโดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้โพรไบโอติกสำหรับการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามยังมีน้อยมากเมื่อเทียบกับกุ้งกุลาดำ กุ้งก้ามกรามกำลังมีแนวโน้มที่จะถูกพัฒนาให้เป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งเพราะเป็นสัตว์น้ำที่ความต้องการของผู้บริโภคทั้งภายในและภายนอกประเทศ

ปัจจุบันนี้ได้หันมาใช้วิธีชีวภาพบำบัดซึ่งเป็นการควบคุมและป้องกันโรคโดยวิธีตามธรรมชาติเป็นการใช้จุลินทรีย์เป็นโพรไบโอติกที่มีประโยชน์ไปยังการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อโรคในสัตว์เลี้ยง การใช้เอนไซม์ หรือผลิตภัณฑ์ที่สกัดได้จากแบคทีเรียใส่ลงในน้ำหรืออาหารเพื่อป้องกันโรคหรือเพื่อกระตุ้นให้สัตว์น้ำเจริญเติบโตได้ดีขึ้น (สนธิ แดงสกุล & ลีลา เรืองแป้น, 2541)

วิธีการนี้เป็นที่ยอมรับกันก็เนื่องมาจาก การใช้โพรไบโอติก หรือการใช้จุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ผสมในอาหารสัตว์เพื่อควบคุมจุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร จะทำให้

สัตว์มีสุขภาพที่ดีขึ้น การใช้ประโยชน์จากอาหารดีขึ้น ลดความเครียด การเจริญเติบโตและผลผลิตของสัตว์ดีขึ้นจึงจัดเป็นตัวกระตุ้นการเจริญเติบโตได้ดีอีกวิธีการหนึ่ง

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1.2.1 ศึกษาชนิดและปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของกิ้งก่ามกราคมในวัยต่าง ๆ
- 1.2.2 ศึกษาสภาพของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากระบบทางเดินอาหารของกิ้งก่ามกราคมแต่ละชนิดเพื่อที่จะใช้เป็นโพรไบโอติกทดลองเลี้ยงกิ้งก่ามกราคมต่อไป

1.3 ขั้นตอนและระเบียบวิธีวิจัย

- 1.3.1 ติดต่อเกษตรกรผู้ทำการเพาะเลี้ยงกิ้งก่ามกราคม เพื่อขอซื้อลูกกิ้งก่ามกราคมตั้งแต่เริ่มเพาะเลี้ยง (post larvae) จนถึงสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง (adult) โดยทำการติดต่อกับเกษตรกร 2 จังหวัด ได้แก่ เกษตรกรในจังหวัดขอนแก่น และ เกษตรกรในจังหวัดกาฬสินธุ์
- 1.3.2 ทำการสุ่มตัวอย่างกิ้งก่ามกราคมในบ่อเพาะเลี้ยงในทั้ง 2 จังหวัด โดยทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 14 วัน จากนั้นนำกิ้งก่ามกราคมมาทำการแยกเอาเฉพาะลำไส้เพื่อศึกษาเชื้อจุลินทรีย์
- 1.3.3 ศึกษาชนิดและปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากลำไส้ของกิ้งก่ามกราคมที่สุ่มตัวอย่างมาจากบ่อเพาะเลี้ยงของทั้ง 2 จังหวัด ตั้งแต่เริ่มต้นเลี้ยง (post larvae) จนกระทั่งสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง (adult)
- 1.3.4 เปรียบเทียบชนิดและปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากลำไส้ของกิ้งก่ามกราคมในแต่ละช่วงอายุของการเพาะเลี้ยงและบ่อเพาะเลี้ยงในแต่ละพื้นที่
- 1.3.5 นำเชื้อแต่ละชนิดที่แยก (isolate) และจำแนก (identify) ได้จากระบบทางเดินอาหารของกิ้งก่ามกราคม มาศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต เพื่อผลิตให้ได้ปริมาณที่มากพอสำหรับการใช้เป็นโพรไบโอติก
- 1.3.6 สรุปและเขียนรายงาน

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

- 1.4.1 ศึกษาถึงชนิดและปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในระบบทางเดินอาหารของกิ้งก่ามกราคมในระยะตั้งแต่เริ่มเพาะเลี้ยง (post larvae) จนเจริญเป็นตัวเต็มวัย (adult) จากตัวอย่างกิ้งก่ามกราคมที่เก็บจากฟาร์มเพาะเลี้ยงของเกษตรกรในจังหวัดขอนแก่น และจังหวัดกาฬสินธุ์ ระยะเวลาประมาณ 4-6 เดือน

1.4.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต ได้แก่ อุณหภูมิ pH และจำนวนรอบของการเขย่าในการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากระบบทางเดินอาหารของกิ้งก่ามกราคมแต่ละชนิดเพื่อที่จะนำมาผลิตเป็นโพรไบโอติกให้ได้ในปริมาณที่มากพอสำหรับการทดลองเลี้ยงกิ้งก่ามกราคมในระดับห้องปฏิบัติการ

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ทำให้ทราบถึงชนิดและปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของกิ้งก่ามกราคมในระยะตั้งแต่เริ่มเพาะเลี้ยง (post larvae) จนเจริญเป็นตัวเต็มวัย (adult)

1.5.2 ทำให้ทราบวิธีการแยก (isolation) และการจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ (identification) แต่ละชนิดจากระบบทางเดินอาหารของกิ้งก่ามกราคม

1.5.3 ทราบถึงสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดที่แยกได้จากระบบทางเดินอาหารของกิ้งก่ามกราคม

1.5.4 ทราบถึงศักยภาพของการใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากระบบทางเดินอาหารของกิ้งก่ามกราคมเป็นโพรไบโอติกสำหรับเลี้ยงกิ้งก่ามกราคม

1.5.5 หากสามารถใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะสมกับการใช้เป็นโพรไบโอติกอาจนำไปสู่การลดการใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะในการจัดการการเพาะเลี้ยงกิ้งก่ามกราคมของเกษตรกร ซึ่งจะช่วยลดสารเคมีตกค้างในกิ้งก่ามกราคม อันเป็นเหตุให้นำผลเสียมาสู่ผู้บริโภค และยังช่วยลดปัญหาสารเคมีตกค้างในสิ่งแวดล้อมอีกด้วย

1.6 หน่วยงานที่น่าผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

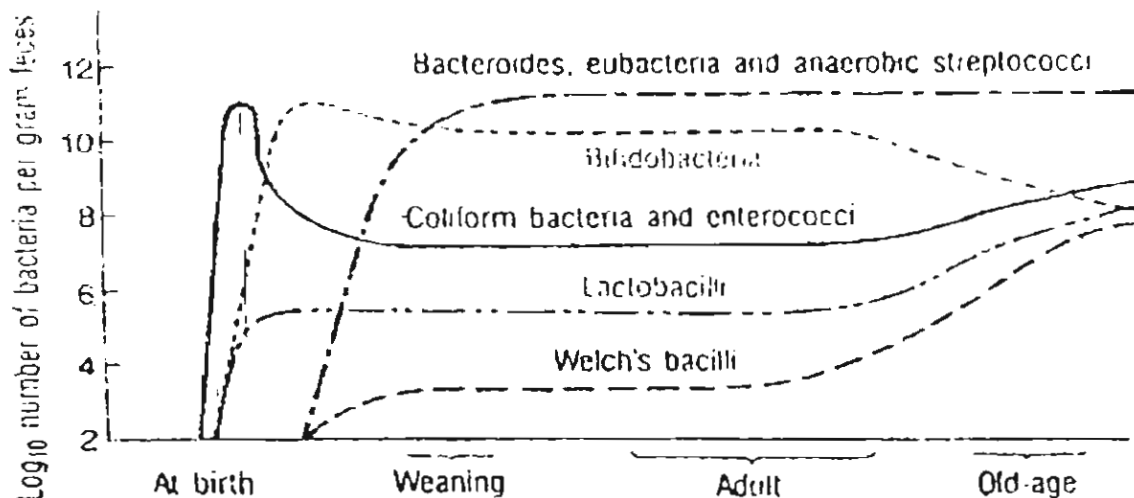
1.6.1 เกษตรกรผู้ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงกิ้งก่ามกราคมในประเทศไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งเกษตรกรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยผลการทดลองจะนำไปสู่การประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงและเพิ่มประสิทธิภาพของผลผลิตของกระบวนการเพาะเลี้ยงกิ้งก่ามกราคม

1.6.2 โครงการผลิตบัณฑิต ระดับมหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี ที่สามารถใช้เป็นโครงการวิทยานิพนธ์สำหรับผลิตนักศึกษาปริญญาโทของมหาวิทยาลัย

บทที่ 2

วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในร่างกายของมนุษย์และสัตว์ที่มีสุขภาพปกติจะมีจุลินทรีย์หลายชนิดอาศัยอยู่เป็นจำนวนมาก ตั้งแต่ปาก กระเพาะอาหาร และลำไส้ ซึ่งมีชื่อเรียกรวมกันว่า ระบบทางเดินอาหาร (Gastrointestinal = GI tract) ชนิดและปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ที่พบในร่างกายจะมีความสัมพันธ์กับอายุ โดยเฉพาะในลำไส้ของมนุษย์ ดังรูปที่ 1 (David & Dallas, 1991 อ้างถึงใน วิเชียร สิลาวรรมาศ, 2541)



ภาพที่ 1 ปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ในลำไส้ของมนุษย์ที่เปลี่ยนแปลงไปตามวัย

จะเห็นว่า ปริมาณเชื้อ *Bacteroides*, *Eubacteria* และ *anaerobic streptococci* มีปริมาณคงที่เมื่ออยู่ในวัยผู้ใหญ่-ผู้สูงอายุ ปริมาณเชื้อ *Bifidobacteria* มีปริมาณลดลงในวัยสูงอายุ ปริมาณเชื้อ *Coliform bacteria* และ *enterococci* มีปริมาณลดลงในวัยรุ่นและคงที่จนถึงวัยผู้ใหญ่ แต่จะเพิ่มขึ้นในวัยสูงอายุ ปริมาณเชื้อ *lactobacilli* มีปริมาณคงที่จนถึงวัยผู้ใหญ่ และจะเพิ่มมากขึ้นในวัยสูงอายุ ปริมาณเชื้อ *Welch's bacilli* ซึ่งพบในปริมาณน้อยที่สุด มีปริมาณคงที่จนถึงวัยผู้ใหญ่ และจะเพิ่มมากขึ้นในวัยสูงอายุ

จุลินทรีย์ดังกล่าวเกิดขึ้นหลังจากที่มนุษย์เกิดมา เมื่อมนุษย์เจริญเติบโตขึ้น จุลินทรีย์เหล่านี้จะเกิดการเปลี่ยนแปลงทั้งชนิดและปริมาณ ซึ่งเป็นการปรับตัวเพื่อความเหมาะสม และเพิ่มปริมาณมากขึ้นในแหล่งที่อยู่นั้นๆ ในที่สุดก็กลายเป็นจุลินทรีย์ปกติของร่างกาย (normal microflora) จุลินทรีย์เหล่านี้ส่วนมากจะเป็นแบคทีเรีย และมีปริมาณแตกต่างกันตามอวัยวะที่อาศัยอยู่

ตารางที่ 1 ปริมาณแบคทีเรียที่พบมากในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ (Tannock, 1992)

ระบบทางเดินอาหาร	จีโนส	ปริมาณ
ปาก	<i>Streptococcus</i> <i>Veillonella</i> <i>Neisseria</i>	
กระเพาะและลำไส้เล็ก	<i>Lactobacillus</i> <i>Streptococcus</i>	10^2
ลำไส้ใหญ่	<i>Bifidobacterium</i> <i>Bacteroides</i> <i>Eubacterium</i> <i>Peptostreptococcus</i>	10^9

แม้ถ้าศึกษาถึงรายละเอียดตามอายุของมนุษย์ตั้งแต่แรกเกิดจนถึงวัยผู้สูงอายุ (86 ปี) จะพบชนิดและปริมาณจุลินทรีย์ต่าง ๆ ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 จุลินทรีย์ในทางเดินอาหารของมนุษย์ในอายุต่างๆ (Tannock, 1992)

จุลินทรีย์	ทารก 1-4 วัน	ทารก 5-90 วัน	เด็ก 4-6 ปี	ผู้ใหญ่ 20-64 ปี	ผู้สูงอายุ 65- 86 ปี
แบคทีเรียทั้งหมด ^a	10.1	10.5	10.8	10.8	10.5
ต้องการ O ₂ หรือต้องการ O ₂ บ้างเล็กน้อย					
<i>Enterobacteria</i>	9.3	8.8	8.0	8.2	7.8
<i>Streptococcus</i>	8.5	8.1	7.8	7.7	8.2
<i>Lactobacillus</i>	6.4	7.3	7.0	6.7	8.0
<i>Staphylococcus</i>	6.2	6.8	4.0	4.4	4.3
Yeast	3.5	4.0	4.2	3.7	4.6
ไม่ต้องการ O ₂					
<i>Bacteroides</i>	8.6	8.2	10.4	10.3	10.0
Eubacteria	0	9.7	9.9	9.9	9.5
<i>Bifidobacterium</i>	9.3	9.9	10.1	9.8	9.4
<i>Peptococcus</i>	0	9.0	8.1	8.9	7.7
<i>Clostridium perfringens</i>	5.9	6.9	5.7	4.8	6.6
<i>Veillonella</i>	5.6	6.3	5.2	4.8	6.1

^alog colony forming unit (cfu)

ในสัตว์เช่นสัตว์ปีกและสุกร มีปริมาณจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 3 และ 4 ตามลำดับ

ตารางที่ 3 ปริมาณจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ปีก (Tannock, 1992)

ทางเดินอาหาร	จุลินทรีย์	ปริมาณ (cfu/g)
ปาก	Lactobacilli	10^9
	Streptococci	10^6
	<i>Escherichia coli</i>	10^2
ลำไส้เล็ก	Lactobacilli	10^8
	Streptococci	10^4
	<i>E.coli</i>	10^2
ลำไส้ใหญ่	Lactobacilli	10^9
	Streptococci	10^7
	<i>E.coli</i>	10^6
	Yeasts	10^2
	Obligate anaerobics*	10^{10}

*Anaerobic cocci; *Eubacterium* sp., *Clostridium* sp., *Gemmiger* sp., *Fusobacterium* sp., และ *Bacteroides* sp.

ตารางที่ 4 ปริมาณจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของสุกร (Tannock, 1992)

ทางเดินอาหาร	จุลินทรีย์	ปริมาณ (cfu/g)
กระเพาะ	Lactobacilli	10^9
	Streptococci	10^6
	<i>Escherichia coli</i>	10^2
	Yeasts	10^4
ลำไส้เล็ก	Lactobacilli	10^7
	Streptococci	10^4
	<i>E. coli</i>	10^4
	Yeasts	10^4
ลำไส้ใหญ่	Lactobacilli	10^9
	Streptococci	10^7
	<i>E. coli</i>	10^7
	Yeasts	10^4
	Obligate anaerobics*	10^{10}

*Eubacterium; *Clostridium* sp., *Propionibacterium* sp., *Peptococcus* sp., *Megasphaera* sp., และ *Bacteroides* sp.

ชนิดและปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารนอกจากจะเปลี่ยนแปลงตามอายุแล้ว ยังเปลี่ยนแปลงตามชนิดของอาหารที่บริโภคอีกด้วย Canganella และคณะ (1992) พบว่าเชื้อแบคทีเรียพวกที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต ที่พบในระบบลำไส้ของกระต่ายที่ให้อาหารต่างชนิดกัน คือ อาหารเม็ด หญ้าแห้ง (Hay) และอาหารผสมระหว่างอาหารเม็ดกับหญ้าแห้ง (Hay) มีความแตกต่างกัน ในกระต่ายที่ให้อาหารผสม จะมีเชื้อ *Enterococcus faecalis*, *E. avium*, *E. faecium* และ *E. deruns* ซึ่งเป็นแบคทีเรียพวกที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต อยู่ในปริมาณที่สูงกว่าเชื้อตัวอื่น ส่วนในช่องทวารและลำไส้ใหญ่ จะมีเชื้อพวก *Enterobacter cloacae* และ *E. aerogenes* อยู่ 10 % และ 25% ของเชื้อทั้งหมด ในขณะที่มี *Staphylococcus intermedius*, *S. epidermidis* และ *S. lentus* อยู่ 11 % ของแบคทีเรียทั้งหมดที่แยกได้จากลำไส้ใหญ่

จุลินทรีย์ที่พบในอวัยวะต่าง ๆ ของคนและสัตว์นี้ สามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ

ประเภทที่ 1 จุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค (pathogenic) ได้แก่ กลุ่มของ *Salmonella*, *Shigella* และ *Vibrio* ทำให้ท้องเสีย การเจริญเติบโตลดลง ฯลฯ

ประเภทที่ 2 จุลินทรีย์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค (non-pathogenic) จะให้ประโยชน์ในการควบคุมปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคไม่ให้มีมากจนเป็นอันตรายต่อคนหรือสัตว์ รักษาระดับความสมดุลของกิจกรรมเอนไซม์เพื่อลดปริมาณการเกิดสารพิษ และสารก่อมะเร็ง ทำให้ร่างกายอยู่ในระดับสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร แต่ถ้าในคนหรือสัตว์ที่อ่อนแอจะทำให้เชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคมียิ่งมีปริมาณมากขึ้นจนแสดงอาการของโรคต่างๆ

การเกิดประโยชน์หรือโทษต่อร่างกายสัตว์จากจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของเอนไซม์ที่ร่างกายมนุษย์และจุลินทรีย์ผลิตออกมา เอนไซม์ดังกล่าวจะเป็นตัวทำให้เกิดสารพิษต่างๆ แก่ร่างกายของมนุษย์และสัตว์ในขณะที่ร่างกายอ่อนแอซึ่งอาจทำให้เกิดสารพิษพวกอะมีน (amines) และฟีนอล (phenols) จากการย่อยสลายกรดอะมิโน เป็นผลให้เกิดมะเร็งต่ออวัยวะต่างๆ เอนไซม์ที่สำคัญได้แก่ β - Glycosidases, β - Glucuronidase, Nitrate reductase, Azoreductase และ Nitroreductase ฯลฯ

เมื่อใดก็ตามที่จุลินทรีย์ดังกล่าวถูกรบกวนจากปัจจัยต่างๆ ทั้งที่ตั้งใจหรือไม่ตั้งใจของมนุษย์และสัตว์ เช่น การบริโภคอาหารไม่ครบห้าหมู่ ความเครียดและการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างพร่ำเพรื่อ ก็จะทำให้สูญเสียภาวะสมดุลของจุลินทรีย์ไป ดังนั้น การศึกษาถึงชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ในแต่ละวัย ทำให้เราทราบถึงระดับสมดุลของจุลินทรีย์ในแต่ละระยะเวลาของการเจริญ ซึ่งจะช่วยให้เราสามารถควบคุมการเจริญเติบโตของสัตว์ได้

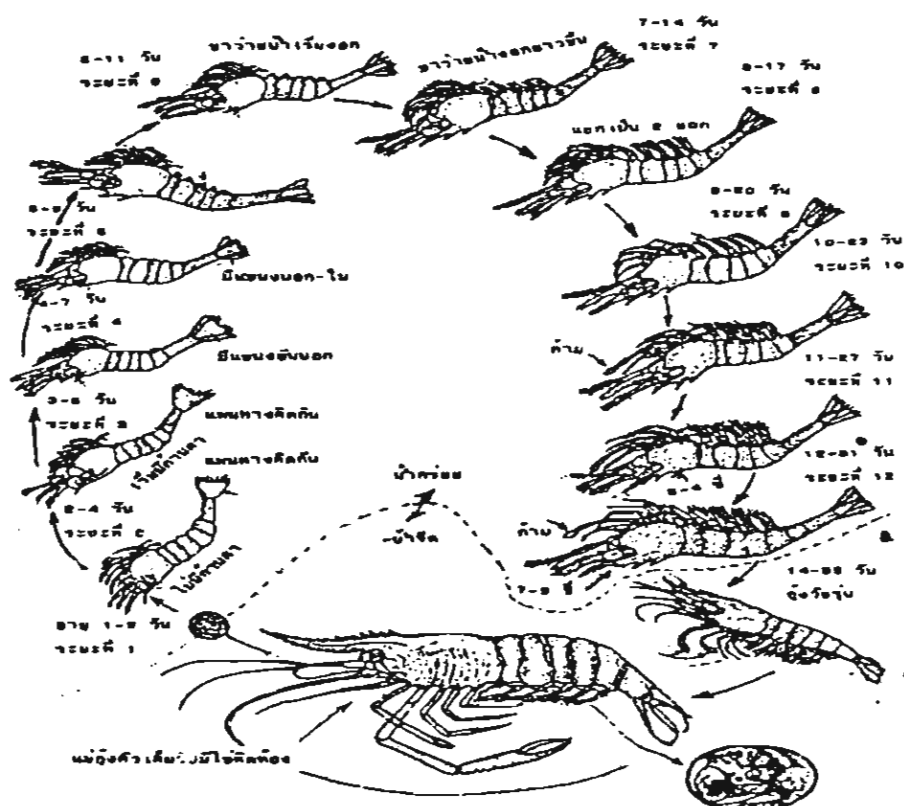
ชีววิทยาของกุ้งก้ามกราม

กุ้งก้ามกรามเป็นกุ้งน้ำจืดที่มีขนาดใหญ่ที่สุดของประเทศไทยมีชื่อสามัญว่า Giant Freshwater Prawn และมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Macrobrachium rosenbergii* de Man อยู่ในวงศ์ Palaemonidae มีชื่อเรียกที่รู้จักกันอีกหลายชื่อคือ กุ้งนาง กุ้งหลวง กุ้งก้ามเหือง กุ้งแหน่ กุ้งใหญ่

ลักษณะภายนอก

กุ้งก้ามกรามมีเปลือกหุ้มตัว ลำตัวแบ่งออกได้ 3 ส่วน คือ หัว ออก และท้อง ส่วนหัวและอกรวมกันเป็นปล้องเดียว บนเปลือกคลุมหัวทางส่วนหน้ามีหนาม 2 อัน สองข้างแก้มมีปล้องปรากฏให้เห็นชัดเจน มีลักษณะแบนข้างยาว เรียว โคนกริหน้าและนูน ตรงกลางโค้งแอ่นลง ปลายงอนขึ้น มีหยักคล้ายฟันเลื่อย สันกริล่างมีหยักประมาณ 10-14 หยัก สันกริบนมีหยักประมาณ 12-15 หยัก ตามีก้านยาวยื่นออกนอกเข้าตาเคลื่อนไหวไปมาได้ (บรรจง เทียนสงารักษ์, 2535)

วงจรชีวิต



ภาพที่ 2 แสดงวงจรชีวิตของกุ้งก้ามกราม ที่มา : ชุติศักดิ์ แสงธรรม (2532)

ตามวัฏจักรชีวิต (life cycle) ของกุ้งก้ามกราม (รูปที่ 2) ธรรมชาติวิทยาของกุ้งชนิดนี้ในระยะวัยอ่อน (stage 1-12) จะหงายท้องว่ายน้ำอาศัยอยู่ในแหล่งน้ำกร่อย(ช่วงความเค็มที่เหมาะสมระหว่าง 10-17 ส่วนในพัน) เมื่อเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะวัยรุ่น (juveniles) ก็คิดว่าตัวว่ายน้ำ มีลักษณะเหมือนพ่อแม่ทุกประการ แล้วจึงอพยพขึ้นสู่ต้นน้ำ ไปอาศัยเจริญเติบโตอยู่ในแหล่งน้ำจืด

กุ้งตัวเมียจะเดินทางจากแหล่งน้ำจืดไปยังบริเวณปากแม่น้ำหรือปากทะเลสาบเพื่อวางไข่ ลูกกุ้งขณะที่ฟักออกจากไข่ใหม่ ๆ มีขนาดเล็ก เคลื่อนที่ได้เล็กน้อยด้วยขาว่ายน้ำ จึงลอยไปตามกระแสน้ำหรือเคลื่อนที่ไปตามคลื่นลม ในสภาพเดียวกับแพลงก์ตอนสัตว์อื่น ๆ ส่วนหัวค่อนข้างโต ลำตัวเรียวยาวเล็กไปทางหางขณะที่ลอยอยู่ในน้ำ ส่วนหัวจะอยู่ข้างล่าง ส่วนหางจะชี้ขึ้นข้างบน ขอบแสงสว่าง ก็นิสัยที่มีขนาดเล็กทุกชนิด ลูกกุ้งจะใช้เวลาประมาณ 45-60 วัน กว่าที่จะเจริญเติบโตเป็นกุ้งวัยรุ่นขนาดตัว 1-2 เซนติเมตร มีอวัยวะครบถ้วนเหมือนพ่อแม่ ระยะนี้กุ้งจะหากินตามพื้นท้องน้ำและเดินทางกลับไปยังแหล่งน้ำที่บรรพบุรุษเคยอยู่อาศัย เพื่อเจริญเป็นกุ้งใหญ่ต่อไป (บรรจง เทียนสงารัสมิ, 2535)

คุณภาพน้ำที่ใช้เพาะฟักและอนุบาล

น้ำที่ใช้เพาะฟักและอนุบาลกุ้ง จะต้องมีความสมบัติดังต่อไปนี้

1. อุณหภูมิของน้ำ ช่วงที่ดีที่สุดควรจะอยู่ระหว่าง 26 ถึง 31 องศาเซลเซียส ในช่วงอุณหภูมินี้ลูกกุ้งจะลอกคราบและโตเร็วเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ถ้าอุณหภูมิต่ำกว่า 24 องศาเซลเซียส ลูกกุ้งจะเจริญเติบโตช้าและจะพัฒนาเป็นกุ้งคว่ำช้า อุณหภูมิที่สูงกว่า 35 องศาเซลเซียสจะทำให้ลูกกุ้งตาย (Hsieh และคณะ, 1989) การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิโดยทันทีอาจทำให้กุ้งช็อคและตายได้ ถึงแม้จะเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเพียง 1 องศาเซลเซียส บางครั้งก็อาจทำให้เกิดปัญหา การเปลี่ยนน้ำลูกกุ้งจึงต้องระมัดระวังเกี่ยวกับอุณหภูมิของน้ำในบ่อ Gomerz & Ohno (1986) รายงานว่าอัตราเร็วของการคว่ำจะสูงสุดที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

2. ความเป็นกรดเป็นด่าง (พีเอช) ของน้ำควรอยู่ในระดับ 7.0 ถึง 8.5 สำหรับปริมาณแร่ธาตุ ควร มีธาตุเหล็กและแมกนีเซียมปริมาณต่ำ มีสารประกอบแคลเซียมและคาร์บอนเนต ไม่เกิน 100 มิลลิกรัม/ลิตร และสารตะกั่ว ไม่ควรเกิน 0.33 มิลลิกรัม/ลิตร เพราะจะเป็นอันตรายต่อตัวกุ้ง (New, 1990) Johnson (1982) กล่าวว่า ในน้ำที่มีขบวนการสังเคราะห์แสงซึ่งเป็นสาเหตุให้ pH ของน้ำสูงขึ้น สามารถทำให้สมดุลของคาร์บอนเนตเสียไปทำให้คาร์บอนเนตตกตะกอนเป็นแคลเซียมคาร์บอนเนต ซึ่งถ้าไปเกาะติดกับลูกกุ้ง ก็จะทำให้มันถูกดองลงและตาย

3. ปริมาณออกซิเจนในน้ำ มีค่าสูงใกล้จุดอิ่มตัวหรือสูงกว่า ไม่ควรต่ำกว่า 3 มิลลิกรัม/ลิตร เพื่อการดำรงชีวิตและการเจริญเติบโตที่ดี ถ้าปริมาณออกซิเจนต่ำลงมาก ๆ กุ้งจะเริ่มอ่อนแอ ชะงักการเจริญเติบโตและเริ่มตาย การเลี้ยงกุ้งหนาแน่นมากจะทำให้คุณสมบัติของน้ำในรอบ 24 ชั่วโมง เปลี่ยนแปลงเนื่องจากการขับถ่ายของเสีย และการใช้พลังงาน ต้องมีการเพิ่มออกซิเจนในน้ำโดยใช้เครื่องปั๊มลม นอกจากนี้กุ้งขนาดเล็กต้องการออกซิเจนมากกว่ากุ้งขนาดใหญ่ และกุ้งจะใช้ออกซิเจนสูงกว่าปกติขณะอยู่ในระยะลอกคราบ (สิทธิ บุญยรัตนผลิน, 2526)

4. ปริมาณสารประกอบไนโตรเจน ไม่ควรมีไนไตรท์ (nitrite) และไนเตรท (nitrate) มากเกิน 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร และ 20 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ถ้ามีมากเกินไปจะทำให้ลูกกุ้งหยุดกินอาหาร การเติบโตหยุดชะงักและตายในที่สุด (Armstrong และคณะ, 1976) สารทั้งสองเกิดจาก แอมโมเนีย (ammonia) ที่ละลายน้ำจึงไม่ควรมีปริมาณแอมโมเนีย มากกว่า 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร เพราะจะมีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตระยะการฟักตัวของไข่ อัตราการตายของตัวอ่อนเพิ่มขึ้น ความเป็นพิษของแอมโมเนียขึ้นอยู่กับ ปริมาณออกซิเจน อุณหภูมิ ความเค็ม และความเป็นกรดเป็นด่าง (จารุวรรณ วิระวงษ์นุสร, 2525)

5. แสงแดด ลูกกุ้งไม่ควรได้รับแสงแดดโดยตรง ถ้าแดดจัดเกินไปลูกกุ้งไม่กินอาหาร กุ้งโตช้า ถ้าเลี้ยงในร่มเงาอัตราการตายของกุ้งจะลดลง (ประจวบ หล้าอุบล, 2529)

6. การรักษาความสะอาดของบ่อเป็นสิ่งจำเป็นมากทำให้ลดความเป็นกรดเป็นด่างที่เพิ่มปริมาณออกซิเจน และถ่ายเทของเสีย จึงควรดูแลและเปลี่ยนน้ำดังนี้

- ลูกกุ้งอายุ 3-6 วัน ควรดูดตะกอนและเศษอาหารออก
- ลูกกุ้งอายุ 7 วันถึงกุ้งคว่ำ ควรเปลี่ยนน้ำทุกวัน
- ลูกกุ้งเริ่มคว่ำจนถึงคว่ำหมด อาจจะเปลี่ยนน้ำทุก 2 วัน

ในขณะเดียวกันความเค็มของน้ำควรจะลดลงด้วย ส่วนของการทำความสะอาดและถ่ายเทน้ำถ้าผู้เลี้ยงไม่มีความระมัดระวัง จะทำให้ลูกกุ้งบางส่วนติดไปกับน้ำ

7. ความเค็มของน้ำ อยู่ระหว่าง 10 - 20 ส่วนในพัน ปกติในโรงเพาะฟักจะใช้ความเค็มประมาณ 12 ส่วนในพัน ในการอนุบาลกุ้งนั้น พยายามอย่าให้มีการเปลี่ยนแปลงความเค็มขึ้นลงมาก ๆ ในทันทีทันใด เพราะอาจจะเป็นอันตรายต่อลูกกุ้ง ประจวบ หล้าอุบล (2529) รายงานว่า ความเค็มที่ใช้ในการเพาะฟักลูกกุ้งระดับดีที่สุดควรอยู่ระหว่าง 15-17 ส่วนในพัน ทรงชัย สหวัชรินทร์ & ไพโรจน์ พรหมานนท์ (2513) พบว่า ลูกกุ้งวัยอ่อนสามารถเจริญเติบโตในความเค็มที่ระดับ 5-7, 8-10, 12-14 ส่วนในพันได้ดี แต่ที่ความเค็ม 12-14 ส่วนในพัน ลูกกุ้งมีอัตราการรอดเฉลี่ยมากกว่าระดับอื่น

การให้อาหารเลี้ยงกุ้งก้ามกรามในบ่อ

ปกติกุ้งก้ามกรามจะออกหากินในเวลากลางคืน การให้อาหารโดยทั่วไปจะให้วันละ 2 ครั้ง ในตอนเช้าและตอนเย็น โดยจะหว่านอาหารไปรอบ ๆ บ่อ ให้ทั่วถึง ไม่นิยมกองอาหารไว้เพราะกุ้งชนิดนี้มีนิสัยหวนอาหารจะคอยทำร้ายกุ้งตัวที่มาแย่งกินทำให้กุ้งมีขนาดโตไม่เท่ากัน การให้อาหารจะให้ตามขนาดอายุของลูกกุ้งที่นำมาปล่อยเลี้ยง ดังนี้

1. กรณีที่นำลูกกุ้งคว่ำมาปล่อยเลี้ยง จะให้อาหารประเภทอ่อนเลี้ยงก่อนโดยใช้ไข่เป็ดหรือไข่ไก่ 5-7 ฟอง ผสมกับนมผง 3-5 ช้อนแกง เติมน้ำลงไป 1 ลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปทิ้งให้สุก นำไปยี้ผ่านตะแกรงหรือกระชอนตาถี่ จึงค่อยนำไปให้ลูกกุ้งกินบริเวณชานบ่อ ปริมาณอาหารขนาดนี้สามารถเลี้ยงกุ้งได้ 100,000 ตัว เมื่อลูกกุ้งมีอายุได้ 10 วันขึ้นไป ควรเริ่มให้ลูกกุ้งกินอาหารผสมอัดเม็ดที่มีโปรตีนไม่น้อยกว่า 30-35 เปอร์เซ็นต์ โดยให้ประมาณ 30-40 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัวต่อวัน

2. เมื่อเลี้ยงลูกกุ้งมีอายุ 3-4 เดือน หรือกรณีที่นำลูกกุ้งวัยรุ่นที่ผ่านการอนุบาลมาปล่อยเลี้ยง ควรให้อาหารผสมอัดเม็ดที่มีโปรตีนไม่น้อยกว่า 23.2-26 เปอร์เซ็นต์ ให้ในอัตรา 5 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวต่อวัน ควรสังเกตให้เพียงพอกับความต้องการในแต่ละวัน ถ้าไม่พอต้องเพิ่มให้ การให้อาหารในช่วงนี้ควรให้อาหารผสมอัดเม็ดสลับกับการให้อาหารสดสัปดาห์ละครั้ง (ชูศักดิ์ แสงธรรม, 2532)

โรคของกุ้งก้ามกรามในบ่อเลี้ยง

ในอดีตโรคของกุ้งก้ามกรามไม่ค่อยพบบ่อยนัก แต่ในปัจจุบันการตายของกุ้งในบ่อมีปัญหาจากเรื่องโรคเพิ่มมากขึ้น ในการเลี้ยงกุ้งควรขีดหลักกันไว้ดีกว่าแก้ ซึ่งการป้องกันโรคต้องกระทำอย่างมีหลักเกณฑ์ แต่ถ้ามีโรคเกิดขึ้นแล้วจะต้องรักษาให้ถูกต้องตามหลักวิธีการ สำหรับโรคกุ้งก้ามกรามที่พบในบ่อเลี้ยงได้แก่

โรคแค้นดำ สาเหตุเกิดจากเชื้อแบคทีเรียพวก *Aeromonas hydrophila* และ *Flavobacteria* จากพื้นบ่อที่มีการหมักหมมของเศษอาหารและสารอินทรีย์ต่าง ๆ มาเกาะจับที่บริเวณเหงือกกุ้ง ซึ่งจะมองเห็นเป็นสีดำ ทำให้กุ้งหายใจไม่สะดวก

การป้องกัน หมั่นรักษาความสะอาดของพื้นบ่อ อย่าให้มีเศษอาหารเหลือตกค้างสะสมมาก จนเป็นเหตุทำให้น้ำในบ่อเน่าเสีย และเกิดสารประกอบพวกไนโตรเจนได้

โรคคอกหนวก สาเหตุอาจเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียในบ่อเลี้ยงอันเนื่องมาจากการสะสมของเศษอาหารตกค้างและสารอินทรีย์ต่าง ๆ อาการของโรคนี้ในระยะแรกจะพบบริเวณรอยต่อระหว่างเปลือกหัวกับลำตัวพองขึ้น เนื่องมาจากมีของเหลวอยู่ภายใน รอยบวมนี้จะแตกในเวลาต่อมา ทำให้กุ้งตายได้

การป้องกัน หมั่นรักษาความสะอาดของพื้นบ่อ อย่าให้มีเศษอาหารเหลือตกค้างสะสมมาก จนเป็นเหตุทำให้น้ำในบ่อเน่าเสีย และเกิดสารประกอบพวกไนโตรเจนได้

โรคโปรโตซัว สาเหตุเกิดจากเชื้อโปรโตซัวที่ชื่อ *Zootanum* และ *Ephytosis* เข้าทำลาย โดยจะพบว่าตามลำตัวและระยางค์ส่วนต่าง ๆ ของกุ้งเป็นขุย ๆ เห็นได้ชัด

การป้องกัน หมั่นรักษาความสะอาดของพื้นบ่อ อย่าให้มีเศษอาหารเหลือตกค้างสะสมมาก จนเป็นเหตุทำให้น้ำในบ่อเน่าเสีย และเกิดสารประกอบพวกไนโตรเจนได้

โรคเนื่อตาย สาเหตุเกิดจากสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมหรือเลี้ยงกุ้งหนาแน่นเกินไป จะพบอาการกล้ามเนื้อตายบริเวณลำตัวหรือส่วนของระยางค์ โดยจะเริ่มจากจุดเล็ก ๆ ก่อนและลุกลามใหญ่ขึ้นจนกุ้งตายได้

การป้องกัน พยายามรักษาคุณภาพน้ำให้ดี และไม่ควรปล่อยกุ้งลงเลี้ยงหนาแน่นจนเกินไป

โรคทางเดินอาหารอักเสบ สาเหตุเกิดจากการที่กุ้งกินอาหารพวกสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว อาการของโรคนี้จะพบว่า เนื้อเยื่อทางเดินอาหารส่วนกลางและส่วนท้ายตาย และมีเลือดมาอยู่บริเวณนี้มากผิดปกติ

การป้องกัน รักษาระดับความลึกของน้ำให้อยู่ในระดับ 1.5-2 เมตร เพื่อไม่ให้มีสาหร่ายชนิดนี้เกิดขึ้นบริเวณพื้นบ่อ

โรคแบคทีเรียเส้นใย สาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรียเส้นใยในสกุล *Leucothrix* กุ้งที่ถูกเชื้อชนิดนี้เข้าทำลายจะพบว่าส่วนต่าง ๆ ของกุ้งมีเส้นใยบนผิว พบมากในบริเวณเหงือก และขาว่ายน้ำ เมื่อเป็นมาก ๆ สามารถทำให้กุ้งตายได้

การป้องกัน รักษาความสะอาดของบ่อ และหมั่นถ่ายน้ำบ่อย ๆ ครั้ง

โรคกุ้งขาว สาเหตุอาจเกิดจากการขาดสารอาหารและสภาพแวดล้อมในบ่อไม่เหมาะสม กุ้งที่เป็นโรคนี้นั้นในระยะแรกเปลือกนอกแข็งตัวช้าภายหลังจากการลอกคราบจนกระทั่งมีเปลือกนุ่มตลอดทั้งตัวและมีลำตัวขาวซีด

การป้องกัน ให้อาหารที่มีคุณค่าทางอาหารครบถ้วนกับความต้องการของกุ้ง เพิ่มอาหารเสริม และควบคุมสภาพแวดล้อมภายในบ่อเลี้ยงให้ดียิ่งขึ้น

โรคพยาธิใบไม้ สาเหตุเกิดจากพยาธิใบไม้ชนิดที่อาศัยอยู่ในหอยน้ำจืดเจาะไชเข้าไปอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ทำให้กุ้งเจริญเติบโตช้า การเคลื่อนไหวไม่สะดวก

การป้องกัน ทำการเตรียมบ่อก่อนการเลี้ยงกุ้งทุกครั้ง เพื่อกำจัดหอยซึ่งเป็นพาหะของพยาธิในบ่อกุ้งให้หมดไป

โรคเปลือกผุหรือโรคจุดดำ สาเหตุเกิดจากผิวเปลือกด้านนอกแตกเป็นแผลก่อน จากนั้นก็มีเชื้อรา หรือเชื้อแบคทีเรียในสกุล *เบเนกา* *ซูโอโมแนส* และลูกกลมผุกร่อนไปเรื่อย ๆ พบในบริเวณเหงือก กล้ามเนื้อลำตัว ปลายหาง และขาเดิน เมื่อเป็นมาก ๆ กุ้งจะเคลื่อนไหวไม่ได้

การป้องกัน เมื่อต้องการย้ายกุ้งหรือจับกุ้งขาย ควรกระทำด้วยความระมัดระวังเพื่อป้องกันกุ้งเกิดบาดแผล รักษาความสะอาดของบ่อ และถ่ายเปลี่ยนน้ำบ่อย ๆ ครั้ง (ชูศักดิ์ แสงธรรม, 2532)

การตายของลูกกุ้งก้ามกรามวัยอ่อนจำนวนมากที่เลี้ยงในบ่อเพาะซีเมนต์ เป็นปัญหาสำคัญยิ่งของผู้ทำการเพาะในประเทศไทย ลูกกุ้งอาจตายเนื่องจากหลายสาเหตุโรค ซึ่งสาเหตุที่แท้จริงยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด อย่างไรก็ตามสาเหตุของลูกกุ้งอาจแบ่งออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ ๆ คือ สาเหตุเนื่องจากสิ่งมีชีวิต ได้แก่ เชื้อแบคทีเรีย โปรโตซัว รา และสาหร่าย และสาเหตุจากสิ่งไม่มีชีวิต ได้แก่ สารพิษ ปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำ (Dissolved oxygen) อุณหภูมิของน้ำ ความเป็นกรดด่างของน้ำ รวมทั้งความเค็มของน้ำ (ชัยสิทธิ์ และคณะ, 2529)

เชื้อแบคทีเรียเป็นสาเหตุหนึ่งที่น่าจะได้มีการศึกษาอย่างจริงจัง Sindermann (1977) กล่าวว่าลูกกุ้งก้ามกราม สามารถติดเชื้อ filamentous bacteria ชนิด *Leucothrix* ได้ โดยบ่อยครั้งที่เกี่ยวข้องกับคุณภาพน้ำที่ไม่ดี มีเชื้อแบคทีเรียต่าง ๆ อีกหลายชนิดที่อาจเป็นสาเหตุการเกิดเนื้อตาย (necrosis) ของระยะวัยโดยเฉพาอย่างยิ่งหมวด และระยะวัยบริเวณท้องของลูกกุ้ง โดยที่เชื้อจะเพิ่มจำนวนมากขึ้นในบ่อเพาะที่แออัด (100 ตัว/ลิตร) !!และมีการให้อาหารสดแก่ลูกกุ้ง Boonyaratpalin and Kasornchandra (1984) ได้รายงานไว้เกี่ยวกับเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในกุ้งก้ามกรามในประเทศไทย ซึ่งพบเชื้อ *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas* spp. *Pseudomonas fluorescens* และ *Vibrio parahaemolyticus* ซึ่ง

Johnson (1978) รายงานว่า ทั้ง *Vibrio* และ *Pseudomonas* สามารถทำให้เกิดโรคได้ในกุ้งปกติ และ Sachian (1980) กล่าวว่า เชื้อ *Vibrio*, *Pseudomonas* และ *Aeromonas* จะทำอันตรายต่อเหงือกของกุ้ง ทำให้เกิดอาการเรียกว่า Red spots

ปัจจุบันนี้ความอุดมสมบูรณ์ของกุ้งก้ามกรามในแหล่งน้ำธรรมชาติมีจำนวนลดลงเนื่องมาจากหลายสาเหตุ เช่น การทำประมงผิดวิธี ปัญหาจากมลภาวะต่างๆ ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเพื่อชดเชยจากธรรมชาติทำให้การเลี้ยงกุ้งก้ามกรามเป็นอาชีพหนึ่งซึ่งทำรายได้ดีให้กับเกษตรกร

จากข้อมูลการเลี้ยงสัตว์น้ำในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยพบว่า การเลี้ยงสัตว์น้ำในภูมิภาคแถบนี้เป็นการเลี้ยงแบบพัฒนา คือมีการเลี้ยงอย่างหนาแน่น โดยเฉพาะการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม ซึ่งจากการศึกษาพบว่าเมื่อปี พ.ศ.2538 มีรายงานการจับกุ้งก้ามกรามจากการเพาะเลี้ยงทั้งหมดประมาณ 92 ตัน คิดเป็นมูลค่าถึง 13 ล้านบาท (กลุ่มสถิติและสารสนเทศกรมประมง, 2541) ซึ่งถือได้ว่าเป็นอาชีพที่ทำรายได้ให้กับเกษตรกรในภูมิภาคนี้ได้เป็นอย่างดี

ด้วยเหตุนี้เองจึงได้มีการพัฒนาทั้งทางด้านพันธุ์กุ้ง การจัดการเลี้ยงดู และการให้อาหาร กุ้งก้ามกรามที่เลี้ยงในยุคใหม่จึงมักได้รับการปรับปรุงให้มีผลผลิตสูง เช่น มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ทำให้กุ้งเหล่านี้มีสภาพผิดปกติไปจากธรรมชาติที่เป็นอยู่ สิ่งที่คุณเลี้ยงประสบก็คือ เมื่อผลผลิตที่ได้เพิ่มมากขึ้น ความต้านทานต่อโรค รวมทั้งความแข็งแรง ความทนทานต่อความเครียดต่างๆ เช่น การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของสภาพแวดล้อม การติดเชื้อโรคที่ระดับของเชื้อต่ำ ฯลฯ จะลดลงตามไปด้วย กุ้งมักจะป่วยบ่อย ทำให้ไม่ได้ผลผลิตตามเป้าหมาย เพราะฉะนั้น การเลี้ยงกุ้งสมัยใหม่ จึงมักจะผสมยาปฏิชีวนะ หรือ สารสังเคราะห์เพื่อควบคุมเชื้อโรคลงไปในอาหารตลอดเวลาและเพื่อช่วยลดการติดเชื้อที่อาจจะเกิดขึ้น ซึ่งจะมีผลทำให้สัตว์เจริญเติบโตและให้ผลผลิตดีขึ้น แต่เนื่องจากยาปฏิชีวนะต่างๆเป็นสารเคมีเสียส่วนใหญ่จึงอาจทำให้มีสารตกค้างในเนื้อเยื่อสัตว์ที่เลี้ยงได้ ซึ่งไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค นอกจากนี้ ยังอาจก่อให้เกิดการดื้อยาของเชื้อโรคตามมา เนื่องมาจากสาเหตุนี้เองจึงได้มีการคิดค้นวิธีการต่างๆมาใช้แทนการใช้ยาปฏิชีวนะ

วิธีการหนึ่งที่เป็นที่ยอมรับกันอย่างแพร่หลายนั่นก็คือการใช้สารเสริมชีวภาพ (โพรไบโอติก) หรือการใช้จุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ผสมในอาหารสัตว์ หรือควบคุมจุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อในระบบทางเดินอาหาร ซึ่งมีผลทำให้สัตว์มีสุขภาพที่ดีขึ้น การใช้ประโยชน์จากอาหารดีขึ้น ลดความเครียด การเจริญเติบโตและผลผลิตของสัตว์ดีขึ้น จึงจัดเป็นตัวกระตุ้นการเจริญเติบโตได้ดีอีกวิธีการหนึ่ง เมื่อเทียบกับการใช้ยาปฏิชีวนะ

โพรไบโอติก (Probiotics)

โพรไบโอติก (probiotics) มาจากภาษากรีก แปลว่า “ เพื่อชีวิต ” (for life) (Fuller, 1992) นำมาใช้ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1907 โดย Metchnikoff (อ้างถึงใน Fuller, 1992) และได้มีผู้กล่าวถึงคำจำกัดความของโพรไบโอติกไว้ดังนี้คือ

สารที่หลั่งออกมาโดยจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งซึ่งจะกระตุ้นการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่ง (Lilley & Stillwell, 1965)

จุลินทรีย์และสารซึ่งก่อให้เกิดสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร (Parker, 1974)

จุลินทรีย์ที่เสริมในอาหารสัตว์แล้วมีผลทำให้เกิดสมดุลในระบบทางเดินอาหาร (intestinal balance) ของสัตว์ชนิดนั้น (Fuller, 1989)

จุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่เพาะเลี้ยงเป็นจุลินทรีย์ชนิดเดี่ยวหรือแบบผสม นำไปเสริมให้กับสัตว์และคน แล้วมีผลประโยชน์ต่อสัตว์และคนนั้น ๆ โดยช่วยเสริมคุณสมบัติของจุลินทรีย์ประจำถิ่น (Havenaar & Huis in't Veld, 1992)

สิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก (Living micro-organism) เมื่อผสมอาหารให้สัตว์กิน จะช่วยเพิ่มปริมาณสิ่งมีชีวิตในลำไส้ ทำให้เกิดผลดีต่อสัตว์ แต่ให้ผลขัดแย้งกับจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค เช่น ยาปฏิชีวนะที่มีแบคทีเรียหรือจุลินทรีย์แลคโตบาซิลลัส ก็จัดเป็นโพรไบโอติกอย่างหนึ่ง เมื่อคนกินเข้าไปแล้วก็จะช่วยสร้างน้ำย่อยได้ดีขึ้น ทำให้ระบบการขับถ่ายทำงานอย่างมีประสิทธิภาพ ผลที่ได้คือร่างกายมีภูมิคุ้มกันโรคดีขึ้น

จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก

จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกส่วนมาก ได้แก่ แบคทีเรียกรดแลคติก และยังมีแบคทีเรียอื่นๆ ยีสต์ และรา เป็นส่วนน้อย ในกรณีที่ต้องการหาเชื้อสายพันธุ์ใหม่มาใช้เป็นโพรไบโอติก จะต้องมีการพิสูจน์ให้เห็นถึงความปลอดภัยอย่างชัดเจนเสียก่อน ปัจจัยต่อจากความปลอดภัยก็คือ แหล่งของจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นไปได้ 2 กรณี คือ

กรณีที่หนึ่ง หากทราบชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโพรไบโอติก ก็สามารถไปแหล่งจุลินทรีย์จากสถาบัน หน่วยงาน หรือศูนย์เก็บรักษาจุลินทรีย์โดยตรง

กรณีที่สอง ก็คือใช้จุลินทรีย์ที่แยกได้เองจากมนุษย์ สัตว์ หรืออาหารหมักคองต่างๆ

การใช้จุลินทรีย์ที่แยกได้จากระบบทางเดินอาหารของสัตว์เอง จะเป็นแหล่งของโพรไบโอติกที่ดีที่สุด การศึกษาถึงชนิดของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ในแต่ละวัย นอกจากจะทำให้เราทราบถึงระดับสมดุลของจุลินทรีย์ในแต่ละระยะเวลาของการเจริญเติบโตที่กล่าวมาแล้ว ยังช่วยให้เราทราบว่า ควรใช้จุลินทรีย์ชนิดใดเป็นโพรไบโอติก ในแต่ละวัยของการเจริญ ซึ่งจะช่วยทำให้สัตว์สามารถเจริญเติบโตและมีภูมิคุ้มกันดีขึ้น

จุลินทรีย์ที่สามารถใช้เป็นโปรไบโอติกได้ จะต้องเป็นจุลินทรีย์ที่มีความปลอดภัยต่อมนุษย์และสัตว์ และต้องแสดงให้เห็นผลดีกว่าการไม่เติมโปรไบโอติกได้ชัดเจน โดยแบ่งเป็นโปรไบโอติกสำหรับมนุษย์และสัตว์ดังนี้

ตารางที่ 5 แสดงคุณสมบัติของจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโปรไบโอติกสำหรับมนุษย์และสัตว์

โปรไบโอติกสำหรับมนุษย์ จุลินทรีย์ที่ดีอยู่ควรมีคุณสมบัติดังนี้	โปรไบโอติกสำหรับสัตว์ จุลินทรีย์ที่ดีอยู่ควรมีคุณสมบัติดังนี้
1. จะต้องทนต่อสภาพแวดล้อมในลำไส้เล็กทางเดินอาหารตลอดจนทางเดินลมหายใจ 2. ลดคอเรสเตอรอลได้ 3. ยับยั้งสารก่อมะเร็งทั้งทางตรง และทางอ้อม โดยการกระตุ้นให้เกิดระบบภูมิคุ้มกัน 4. สามารถใช้น้ำตาลแลคโทสได้ ทำให้การดูดซับแคลเซียมและวิตามินได้ดี	1. ส่งเสริมการเจริญเติบโต 2. เพิ่มประสิทธิภาพการใช้อาหาร 3. ควบคุมสุขภาพในวัยอ่อน-วัยรุ่นให้แข็งแรง โดยเฉพาะการป้องกันโรคในทางเดินอาหาร 4. ช่วยย่อยสลายปัจจัยที่มีผลต่อโภชนาการ เช่น ด้วยยับยั้งทริปซิน (trypsin inhibitor) กรดไฟติก (phytic acid) กลูโคซิโนเลต (glucosinolates)

ลักษณะที่ดีของโปรไบโอติก

1. เป็นสายพันธุ์ที่ให้ประโยชน์ ทำให้สัตว์มีการเจริญเติบโตมากขึ้นและมีความต้านทานโรคดี
2. ไม่ทำให้เกิดโรคและไม่เป็นพิษ
3. เป็นเซลล์ที่มีชีวิตและมีจำนวนมากพอที่จะเดินทางไปจนถึงทางเดินอาหารส่วนท้ายได้
4. ทนต่อสภาพกรดในกระเพาะอาหารและน้ำดีในลำไส้ แต่สามารถย่อยสลายในลำไส้ได้ดี
5. ไม่เป็นสาเหตุทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม
6. สามารถขยายการผลิตสู่ระดับการค้าได้
7. มีความคงตัวและเก็บไว้ได้นาน
8. สามารถอยู่รอดในลำไส้คนและสัตว์ได้
9. ไม่ตกค้างในซากสัตว์

ผลประโยชน์ที่เป็นไปได้ของโพรไบโอติก (Fuller, 1989)

1. ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ โดยการ
 - 1.1 สร้างสารต่อต้านจุลชีพ
 - 1.2 แย่งอาหารกับจุลินทรีย์อื่น
 - 1.3 แย่งพื้นที่จับกับผนังทางเดินอาหาร
2. เปลี่ยนแปลงเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ในทางเดินอาหาร
 - 2.1 เพิ่มประสิทธิภาพของเอนไซม์ที่มีประโยชน์ เช่น β -galactosidase ที่ช่วยบรรเทาภาวะที่ไม่สามารถย่อยน้ำตาลแลคโตสในระบบทางเดินอาหารได้
 - 2.2 ลดประสิทธิภาพของเอนไซม์บางชนิด เช่น β -glucuronidase, nitroreductase และ azoreductase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดมะเร็ง โดยปล่อยสารก่อมะเร็งในทางเดินอาหาร (Rafter, 1995)
3. กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน (Havenaar & Spanhaak, 1994; Perdigon และคณะ, 1995)
 - 3.1 เพิ่มระดับแอนติบอดี (antibody)
 - 3.2 เพิ่มประสิทธิภาพของแมคโครฟาจ (macrophage)

ปัจจัยที่สำคัญในการคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อใช้เป็นโพรไบโอติก

1. จุลินทรีย์โพรไบโอติกจะต้องไม่ถูกทำลายด้วยกลไกการป้องกันตัวเองของมนุษย์หรือสัตว์
2. จุลินทรีย์นั้นจะต้องทนน้ำย่อย เช่น อะไมเลส (ย่อยแป้งเป็นน้ำตาล) ไลโซไซม์ เปปซิน (ย่อยโปรตีนเป็นกรดอะมิโน) ไลเปส (ย่อยน้ำมันเป็นกรดไขมันอิสระ) กรดในกระเพาะ ความเข้มข้นของน้ำดีในตับ และเมือกในลำไส้เล็ก

3. จุลินทรีย์นั้นจะต้องสามารถยึดเกาะผนังทางเดินอาหารภายในร่างกายมนุษย์และสัตว์ได้เป็นเวลานานพอที่จะคอยทำหน้าที่ปกป้องสุขภาพของมนุษย์และสัตว์ให้แข็งแรงและปลอดโรค จุลินทรีย์โพรไบโอติกสามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุโรคต่อมนุษย์และสัตว์ซึ่งเรียกว่าแบคเทอริโอซิน (bacteriocin) แบคทีเรียกรดแลคติก สามารถสร้างสารดังกล่าวได้

ต่อมา Parker (1974) และ Fuller (1989) ได้รวบรวมทำการศึกษาการใช้โพรไบโอติกแทนสารปฏิชีวนะ และได้รวบรวมความแตกต่างของสมบัติและกลไกการออกฤทธิ์ของโพรไบโอติก และสารปฏิชีวนะ ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 สมบัติและกลไกการออกฤทธิ์ของโพรไบโอติก (probiotics) และสารปฏิชีวนะ (Antibiotics)

โพรไบโอติก (Probiotics)	สารปฏิชีวนะ (Antibiotics)
คุณสมบัติ 1. เป็นสิ่งมีชีวิต 2. ไม่ถูกดูดซึมในทางเดินอาหาร 3. เพิ่มการเจริญและประสิทธิภาพในการใช้อาหาร 4. ไม่มีการหลงเหลือในเนื้อเยื่อ 5. ไม่ก่อให้เกิดเชื้อกลายพันธุ์หรือดื้อยา กลไกการออกฤทธิ์ 1. ให้ฤทธิ์ในการต้านเชื้อเฉพาะที่ 2. เจริญได้ในทางเดินอาหารและแข่งการเจริญกับเชื้อก่อโรคได้	คุณสมบัติ 1. เป็นสารเคมีบริสุทธิ์ 2. ดูดซึมได้ในทางเดินอาหาร 3. เพิ่มการเจริญและประสิทธิภาพการใช้อาหาร 4. หลงเหลือได้ในเนื้อเยื่อ 5. อาจทำให้เชื้ออื่นเกิดการกลายพันธุ์และดื้อยา กลไกการออกฤทธิ์ 1. ให้ฤทธิ์ในการต้านเชื้อได้ทั่วร่างกายและออกฤทธิ์ต่อเชื้อต่าง ๆ ได้มากชนิด 2. ขัดขวางการสังเคราะห์ผนังเซลล์ DNA, RNA และโปรตีน

การใช้จุลินทรีย์ที่มีสมบัติเป็นโพรไบโอติกเสริมในอาหารสัตว์แทนการใช้สารปฏิชีวนะ

เนื่องจากการใช้สารปฏิชีวนะเสริมในอาหารสัตว์ก่อให้เกิดผลเสียดังกล่าวมาแล้ว ต่อมาได้มีการนำเชื้อจุลินทรีย์มาใช้เสริมในอาหารสัตว์นั้นได้เริ่มทำกันในสัตว์จำพวก หมู ไก่ เป็นต้น จุลินทรีย์ที่จะนำมาใช้เสริมในอาหารสัตว์แต่ละชนิดได้มีผู้รายงานว่า ควรจะใช้จุลินทรีย์ที่เป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่น (Normal flora) ของสัตว์ชนิดนั้น ๆ (Tanner, 1944; Kenworthy, 1973) และจะต้องมีลักษณะเป็นโพรไบโอติกที่ดี (Fuller, 1989) จะทำให้สัตว์ที่ได้รับโพรไบโอติกเจริญเติบโต มีสุขภาพดี มีน้ำหนักเพิ่มขึ้น และสามารถต้านทานการติดเชื้อได้

โดยทั่วไปจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารจะทำหน้าที่เป็นโพรไบโอติกโดยสร้างโคโลนี (colony) ทุกพื้นที่ของทางเดินอาหารและเคลื่อนที่จากปากไปสู่ปลายทางคือ ทวาร จะไม่เคลื่อนที่ย้อนทาง บทบาทสำคัญของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่นี้ช่วยย่อยอาหารและลดปริมาณจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหารมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญ ระหว่างจุลินทรีย์ด้วยกัน และระหว่างจุลินทรีย์กับ host จุลินทรีย์เหล่านี้จะสร้าง acetate, lactate, propionate, volatile acid, วิตามิน เอนไซม์ สารต้านแบคทีเรีย และสารประกอบเคมีที่ไม่ทราบชนิด (Sharpell, 1985; Schindler & Schmid, 1982 อ้างถึงใน คณิงนิง ก่อธรรมฤทธิ์, 2541)

จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกนี้อาจเป็นแบคทีเรีย รา ยีสต์ ซึ่งคุณสมบัติ และกลไกออกฤทธิ์จะแตกต่างกัน

ตารางที่ 7 ชนิดของจุลินทรีย์ที่สามารถใช้เป็นโพรไบโอติก

ชนิดจุลินทรีย์	หน้าที่ผลิต
<i>Bacillus subtilis</i>	Amylase, Protease
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Lactic and formic acid Glycosidase, Urease
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Acidophilin, Glycosidase, Lactic acid
<i>Lactobacillus casei</i>	Oxidation/reduction potential
<i>Lactobacillus lactis</i>	Amylase, Protease, Hydrogen peroxide
<i>Streptococcus diacetylactis</i>	Acetic acid Diacetyl Bile tranformation
Yeast (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	Amylase, Protease, Lipase, Cellulase B-complex
Fungal (<i>Aspergillus oryzae</i> or <i>A. niger</i>)	Amylase, Protease, Lipase, Cellulase B-complex

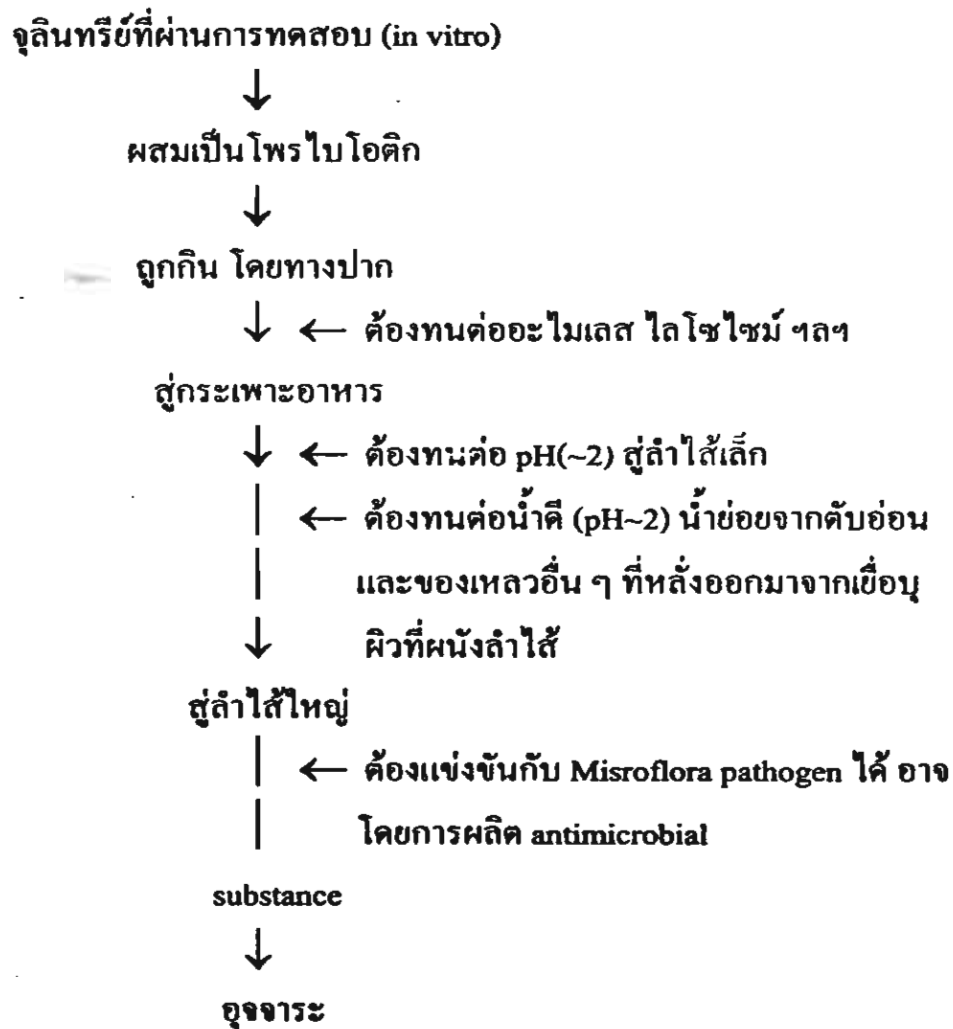
ที่มา : พันทิพา พงษ์เพ็ชรจันทร์ (2538)

วิธีการคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์เพื่อใช้เป็นโพรไบโอติก

การพิจารณาคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อนำไปใช้เป็นโพรไบโอติกนั้น สิ่งสำคัญประกอบไปด้วย 2 ประการคือ

- เป็นจุลินทรีย์ที่ยอมรับของผู้บริโภคทั่ว ๆ ไป และมีความปลอดภัยตลอดระยะเวลาในการใช้ ทั้งในระยะสั้นและระยะยาว ตามมาตรฐาน GRAS (Generally Recognized As Safe Microorganism)
- เป็นโพรไบโอติกที่มีความจำเพาะเจาะจง คือจุลินทรีย์ที่พิจารณาต้องระบุกลุ่มเป้าหมายที่จะนำไปใช้ให้ชัดเจนว่าในคนหรือสัตว์ประเภทใด ชนิดใด จุลินทรีย์นั้นจึงจะออกฤทธิ์หรือมีเมตาบอลิซึมให้ประโยชน์ตามที่ต้องการได้ และการนำจุลินทรีย์ที่แยกได้จากบริเวณเนื้อเยื่อใด ในสัตว์ชนิดใดก็มักจะแสดงผลบวกกับผู้ให้อาศัยชนิดเดียวกันด้วย ซึ่งอาจจะใช้ไม่ได้ผลกับสัตว์ชนิดอื่น ๆ ซึ่งมีความแตกต่างกันออกไป เช่น ด้านสรีระของเยื่อผิว ระบบการย่อยอาหารและการดูดซึมอาหารภายในกระเพาะและลำไส้ รวมทั้งการบดเคี้ยวกับเยื่อผนังภายในร่างกาย การขยายเผ่าพันธุ์ การได้ผลบวกในการทดลองระดับห้องปฏิบัติการ อาจจะไม่ได้ผลในการทดลองกับสัตว์ทดลองหรือผลบวกทางคลินิกก็เป็นได้ เนื่องจากผลของความแตกต่างของสภาวะที่ใช้ในการปฏิบัติ

ในการใช้โพรไบโอติกเพื่อให้ผลตามที่มุ่งหวังนั้น จุลินทรีย์ที่ผ่านจากปากเข้าสู่ภายในระบบทางเดินอาหารของร่างกายจะต้องรอดชีวิต และสามารถยึดเกาะกับเยื่อเมือกภายในอวัยวะต่าง ๆ ตามบริเวณหรือจุดที่จำเพาะเจาะจงที่ได้คัดเลือกสายพันธุ์ พร้อม ๆ มีการแข่งขันการเจริญเติบโตกับพวกจุลินทรีย์ประจำถิ่นได้ มีการขยายเผ่าพันธุ์ และผลิตสารเคมีที่เป็นประโยชน์ได้ จุลินทรีย์ที่ผ่านการคัดเลือกขั้นต้นในห้องปฏิบัติการ จะต้องได้รับการทดสอบจนมั่นใจในสัตว์ทดลอง และในผู้บริโภค



ภาพที่ 3 แสดงแผนผังปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการคัดเลือกโพรไบโอติก ที่มา : ทัศนีย์ เชื้อทอง (2539)

การใช้โพรไบโอติกเสริมในอาหารสุกร

แบคทีเรียที่จะนำมาใช้ในการป้องกันโรคในสุกรและช่วยในการเจริญเติบโตของสุกร จะต้องมีความสามารถในการทนทานต่อน้ำย่อยและกรดต่าง ๆ ในระบบทางเดินอาหาร และแบคทีเรียที่สุกรกินเข้าไปจะต้องผ่านกระเพาะอาหารและไปเกาะแล้วเจริญเติบโตในลำไส้ได้ เพื่อไปแข่งการเจริญกับเชื้อก่อโรค (เพิ่มพูน ศรีประเสริฐศักดิ์, 2524) และเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในทางเดินอาหารของสุกร ได้แก่ แบคทีเรียในกลุ่มของ *Lactobacillus* sp., *Streptococcus* sp., *Enterococcus* sp., *Bacillus* sp. และ *Bifidobacterium* sp. เป็นต้น (Muralidhara, Sheggeby และ Elliker, 1977; Fuller, 1992) แบคทีเรียที่ใช้เป็นโพรไบโอติกในการเลี้ยงสุกร (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 แบคทีเรียที่ใช้เป็นโพรไบโอติกในสุกร

แบคทีเรีย	รูปแบบแบคทีเรียที่ใช้	รายการอ้างอิง
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Cultured milk	Kornegay และ Thomas, 1973; Jensen, 1974; Kornegay, 1985/86
	Frozen culture	Pollman, Danielson และ Wren, 1980b; Pollman, Danielson และ Peo, 1980c
	Dried	Ingram, Lennon และ Albin, 1973
	Fermentation product	Pollman และคณะ, 1984
<i>Lactobacillus lactis</i>	Frozen culture	Muralidhara และคณะ, 1977
<i>Lactobacillus</i> spp.	Cultured milk	Jonsson, 1986
	Dried	Pollman, Danielson และ Peo, 1980a
	Fermentation product	Cowman และคณะ, 1978; Hale และ Newton, 1979
<i>Enterococcus faecalis</i>	Spray-dried	Ozawa, Yabu-Ochi และ Yamanaka, 1983
<i>Enterococcus faecium</i>	Freeze-dried	Kornegay และ Thomas, 1973; Gualtieri และ Betti, 1984; Gudding และ Larssen, 1985; Kluber, Pollman และ Blecha, 1985
<i>Bacillus subtilis</i>	Spores	Ozawa และคณะ, 1981
<i>Bacillus subtilis</i> var. <i>toyoi</i>	Spores Fermentation product	Ogle และ Inborr, 1987
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Dried	Ervolder, Gudkov และ Gerdkov, 1984
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	Dried	Kimura และคณะ, 1983
<i>Bifidobacterium thermophilus</i>	Dried	Kimura และคณะ, 1983
<i>Clostridium butyricum</i>	Dried	Han และคณะ, 1984a; 1984b; 1984c
<i>Saccharomyces</i> spp.	Dried	Burnett และ Neil, 1977
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> sub sp. <i>Bulgaricus</i> , <i>L. casei</i> <i>Streptococcus salivarius</i> sub sp. <i>thermophilus</i>	Fermentation product	Lessard และ Brisson, 1987
<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Enterococcus faecium</i>	Dried	Pollman และคณะ, 1980a

หมายเหตุ

Cultured milk	- แแบคทีเรียในน้ำนม	Frozen culture	- แแบคทีเรียในรูปแช่แข็ง
Freeze dried	- แแบคทีเรียในรูปแข็งและแห้ง	Dried	- แแบคทีเรียในรูปแห้ง
Spray dried	- แแบคทีเรียในรูปผงแห้ง	Fermentation product	- ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการหมัก

การใช้โพรไบโอติกเสริมอาหารในไก่

เนื่องจากการนำแบคทีเรียเสริมในอาหารสุกรทำให้สุกรเจริญเติบโตดีจึงได้มีผู้ทดลองนำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก ซึ่งเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในทางเดินอาหารของไก่ (Pollman และคณะ, 1980b) ไปเสริมในอาหารไก่ แแบคทีเรียกรดแลคติก มีคุณสมบัติที่สามารถสร้างสภาวะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคได้และแบคทีเรียกรดแลคติกจะเจริญตั้งรกรากอยู่ในทางเดินอาหารของลูกไก่แรกเกิดก่อนแบคทีเรียพวกอื่น ทำให้แบคทีเรียก่อโรคไม่เจริญ ไม่สามารถที่จะทำอันตรายต่อลูกไก่ได้ ทำให้ไก่เจริญเติบโตดี มีสุขภาพแข็งแรงและมีภูมิคุ้มกันสูงขึ้น แแบคทีเรียที่ใช้เป็นโพรไบโอติกในการเลี้ยงไก่ (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 แแบคทีเรียที่ใช้เป็นโพรไบโอติกในไก่

แบคทีเรีย	รูปแบบแบคทีเรียที่ใช้	รายการอ้างอิง
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Broth	Tortueor, 1973
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Broth	Couch, 1978
<i>Lactobacillus</i> sp.	Broth	Adler และ Damassa, 1980
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Broth	Arends, 1981
<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus</i> sp.	Broth	Dilworth และ Day, 1978
<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. casei</i> sub sp <i>tolerans</i> , <i>L. jensenii</i>	Broth	ฐิติพงษ์, 2539

หมายเหตุ

Broth - แแบคทีเรียในอาหารเหลว

การใช้โพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

ปัจจุบันมีการใช้โพรไบโอติกกันอย่างแพร่หลาย และได้ผลทั้งในมนุษย์ (Holzapfel และคณะ, 1998) และสัตว์บก เช่น สุกร, วัว, แพะและไก่ (Fox, 1988; Fuller, 1992) ส่วนในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำนั้นได้มีการใช้โพรไบโอติกไม่แพร่หลายนัก โดยเริ่มมีการใช้โพรไบโอติกภายใน 10 ปีที่ผ่านมา วัตถุประสงค์การนำมาใช้ก็เพื่อลดการใช้สารปฏิชีวนะ จุลินทรีย์โพรไบโอติกที่มีการใช้ในการเลี้ยงสัตว์น้ำแสดงในตารางที่ 10

วรรณิกา เพียนภักตร์ (2539) ศึกษาการใช้โพรไบโอติกเสริมในอาหารกุ้งกุลาดำเป็นครั้งแรก โดยใช้ *Bacillus* สายพันธุ์ S11 ที่แยกได้จากลำไส้กุ้งกุลาดำที่มีสุขภาพดี และมีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก ผสมในอาหารกุ้ง เลี้ยงกุ้งเป็นเวลา 100 วัน พบว่า กุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสม *Bacillus* สายพันธุ์ S11 จะมีการเจริญเติบโต อัตราการรอด และความต้านทานต่อโรคสูงกว่ากุ้งกุลาดำที่ไม่ได้รับอาหารที่ผสม *Bacillus* สายพันธุ์ S11 อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) แสดงว่าจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกนอกจากจะเร่งการเจริญเติบโตแล้ว ยังอาจทำหน้าที่เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำสอดคล้องกับการพบการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของโพรไบโอติกในสัตว์บก (Havenaak & Spanhaak, 1994; Perdigon และคณะ, 1995)

Saman และคณะ (1998) ได้แยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก 3 สายพันธุ์ จากลำไส้เล็กของปลาน้ำจืดในประเทศไทย เชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ E7, E26 และ F10 ซึ่ง E7 และ E26 จัดเป็น Gram positive anaerobic enterococci ส่วน F10 จัดเป็น Gram positive anaerobic lactobacilli เชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์นี้ ได้ถูกนำมาผสมกับอาหารเพื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพ ในการใช้เป็นโพรไบโอติก โดยนำไปเลี้ยงปลานิล (*Tilapia nilotica*) พบว่า ค่าอัตราการแลกเนื้อของปลาที่เลี้ยงด้วย E7, E26 และ F10 เป็นเวลา นาน 30 วัน คือ 1.7, 1.0 และ 1.4 ตามลำดับ ซึ่งปลาที่ถูกเลี้ยงด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก จะทำให้ได้น้ำหนักเพิ่มและความต้านทานต่อโรคสูงขึ้นอีกด้วย

สนธิ แดงสกุล & ลีลา เรืองแป้น (2541) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของโพรไบโอติกซึ่งเตรียมจาก *Bacillus* จำนวน 6 สายพันธุ์ที่แยกได้จากผิวดินบ่อเลี้ยงกุ้ง โดยการเปรียบเทียบอัตราการรอดตาย น้ำหนัก ความยาวที่เพิ่มขึ้นและอัตราการเจริญเติบโตของลูกกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มที่ได้รับ โพรไบโอติกเป็นเวลา 15, 25, 35, 45 และ 55 วันติดต่อกัน ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่าโพรไบโอติก ที่เตรียมได้จาก *Bacillus* PO27 เป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในด้านการให้อัตราการรอดตายได้สูงอย่างสม่ำเสมอในทุกชุดการทดลอง คือ 95.32, 92.00, 82.00, 76.66 และ 75.33% ตามลำดับ โดยมีค่าอัตราการรอดสัมพันธ์ตั้งแต่ 25.00-53.26% สำหรับประสิทธิภาพในด้านการเพิ่มน้ำหนักและการเจริญเติบโตนั้น พบว่า โพรไบโอติกสายพันธุ์ PO26 และ PO25 จะให้ผลสูงกว่ากลุ่มอื่นๆ ส่วนโพรไบโอติก จาก *Bacillus* สายพันธุ์อื่น ๆ มีประสิทธิภาพต่ำกว่ากลุ่มควบคุม

ตารางที่ 10 แสดงการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

ชนิดสัตว์น้ำ	จุลินทรีย์โพรไบโอติก	จุลินทรีย์ที่ใช้ในการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค	ผลการศึกษา	รายการอ้างอิง
ปลาซัลมอน	<i>Tetraselmis suecica</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>A. salmonicida</i> <i>Serratia liquefaciens</i> <i>Vibrio anguillarum</i> <i>V. salmonicida</i> <i>Yersinia ruckeri</i> type I	- ควบคุมโรคได้ดี	Austin และคณะ (1992)
ปลาซัลมอน	<i>Pseudomonas fluorescens</i> สายพันธุ์ F19/3	<i>A. salmonicida</i>	- ควบคุมโรคได้ดี	Smith และ Savey (1993)
หอยนางรม (ระยะตัวอ่อน)	CA2	ไม่ได้วิเคราะห์	- กระตุ้นการเจริญเติบโต และมีอัตราการรอดสูง	Douillet และ Longdon (1994)
ปลาซัลมอน	<i>V. alginolyticus</i>	<i>A. salmonicida</i> <i>V. anguillarum</i> <i>V. ordalii</i>	- ควบคุมโรคได้ดี	Austin และคณะ (1995)
ปลาซัลมอน	<i>L. plataram</i> (สามารถยับยั้ง <i>V. anguillarum</i>)	<i>A. salmonicida</i>	- ไม่สามารถควบคุมโรคได้ แต่ <i>L. plataram</i> สามารถเกาะที่ผนังลำไส้	Gildberg และคณะ (1995)
หอยแครง (ระยะตัวอ่อน)	<i>Vibrio sp.</i>	<i>Vibrio anguillarum</i> related (VAR) pathogen	- ควบคุมโรคได้ดี	Riquelme และคณะ (1997)
กุ้งกุลาดำ	<i>Bacillus sp.</i>	ไม่ได้วิเคราะห์	- มีอัตราการรอดสูง	Moriarty (1998)
กุ้งกุลาดำ	<i>Bacillus</i> สายพันธุ์ S11	<i>V. harveyi</i>	- กระตุ้นการเจริญเติบโต และมีอัตราการรอดสูง	Rengpipat และคณะ (1998a)
ปลา rainbow trout	<i>P. fluorescens</i> สายพันธุ์ AH2	<i>V. anguillarum</i>	- ควบคุมโรคได้ดี	Gram และคณะ (1999)

ที่มา : คัดแปลงจาก Rengpipat และคณะ (1998b)

Rengpipat และคณะ (1998) พบว่า ประสิทธิภาพของการใช้โพรไบโอติก จาก *Bacillus* strain S11 ที่ได้จากลำไส้กุ้งกุลาดำทำให้น้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น 22 กรัม และความยาวของลำตัวลูกกุ้งเพิ่มขึ้น 0.15 ซม. เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ส่วนอัตราการรอดตายของลูกกุ้งที่ได้รับ *Bacillus* สายพันธุ์ S11 มีค่าเพิ่มขึ้น

ขึ้นจาก 85% เป็น 89% และเมื่อทดสอบด้วยเชื้อ *Vibrio harveyi* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคเรืองแสงในลูกกุ้ง พบว่าลูกกุ้งที่ได้รับ *Bacillus* สายพันธุ์ S11 มีอัตราการรอดตายเพิ่มขึ้น 9% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

วลัยพร ทิมบุญธรรม (2544) ได้ศึกษาการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็น โพรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติก 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Enterococcus faecium* และ *Lactobacillus lactis* ที่แยกได้จากตัวอย่างลำไส้สัตว์น้ำจืด ไส้ไก่ มูลสุกร ผลิตภัณฑ์นม ผลิตภัณฑ์หมักคองจากเนื้อสัตว์และผักต่าง ๆ เชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของกุ้งก้ามกราม แต่มีผลต่ออัตราการรอดของลูกกุ้งก้ามกรามสูงกว่าการให้อาหารสำเร็จรูปเพียงอย่างเดียว และพบว่า *Lactobacillus lactis* F4 ให้อัตราการรอดของลูกกุ้งก้ามกรามสูงกว่าแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดอื่น

แบคทีเรียประจำถิ่นในทางเดินอาหารของกุ้ง

Dempsey & Kitting (1987) ศึกษาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดจากตัวอย่างกุ้งสีน้ำตาล (*Penaeus aztecus*) บริเวณทางเดินอาหารพบว่าจัดอยู่ในสกุล *Vibrio* sp., *Chromobacterium* sp., *Pseudomonas* sp., *Alcaligenes* sp., *Photobacterium* sp., *Cytophaga* sp. และ *Flavobacterium* sp.

Dempsey, Kitting และ Rosson (1989) ศึกษาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่แยกได้จากตัวอย่างกุ้งสีน้ำตาล (*Penaeus aztecus*) บริเวณทางเดินอาหารมีจำนวน 7.5×10^6 - 2.6×10^7 cfu/g และสามารถจำแนกเป็น 5 สกุล คือ *Vibrio* sp., *Alcaligenes* sp., *Aeromonas* sp., *Chromobacterium* sp. และ *Pseudomonas* sp.

รัตนชัย ลิโทขวลิต & วิวัฒน์ ชัยชนะศิริวิทยา (2531) ศึกษาแบคทีเรียในทางเดินอาหารกุ้งกุลาดำพบว่าจัดอยู่ในสกุล *Vibrio* sp., *Aeromonas* sp. และ *Pseudomonas* sp.

Yuthachit และคณะ (1990) ได้ตรวจนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่แยกได้จากตัวอย่างกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) บริเวณทางเดินอาหารพบจำนวนแบคทีเรีย 7.5×10^6 - 1.3×10^7 cfu/g และแบคทีเรียทั้งหมดที่แยกได้จำแนกเป็น 9 สกุลคือ *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Arizona*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Plesiomonas*, *Serratia*, *Vibrio* และ *Yersinia*

เศรษฐเกียรติ กระจ่างวงษ์, สุพจน์ วัฒนพงศ์ชาติ และธนพงษ์ อินทรธนู (2533) ศึกษาแบคทีเรียในทางเดินอาหารกุ้งกุลาดำพ่อ-แม่พันธุ์จากทะเลอันดามัน พบแบคทีเรียชนิดดิดีแกรมลบ จัดอยู่ในสกุล *Vibrio* ได้แก่ *Vibrio alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. cholera* และ *V. vulnificus*

จากการศึกษาแบคทีเรียที่พบในทางเดินอาหารกุ้ง พบว่าเป็นแบคทีเรียที่ดิดีแกรมลบส่วนใหญ่จะเป็นแบคทีเรียในสกุล *Vibrio* sp. ประมาณ 90.1% (เศรษฐเกียรติ และคณะ, 2533) *Vibrio* sp. เป็นแบคทีเรียที่พบอยู่ในน้ำทะเล (ลิลา และคณะ, 2528) มีจำนวน 10^4 - 10^7 cfu/ml (Yuthachit และคณะ, 1990) และสามารถพบได้ในส่วนของลำไส้กุ้งในตระกูล Peaneid (Dempsey และคณะ, 1989; Chandrasekaram, Lai smanaperumlsamy และ Chandramohan, 1984) *Vibrio* spp. จะพบในกุ้งปกติใน

ปริมาณต่ำ เมื่อกุ้งเกิดความเครียดจากการเลี้ยงแบบหนาแน่น การจัดการไม่ดี การลอกคราบ การจับแบคทีเรียกลุ่มนี้จะเข้าสู่ตัวกุ้งได้ (Sinderman & Lightner, 1988) จากการศึกษาพบว่า *Vibrio* sp. ที่พบในน้ำทะเลและที่พบในตัวกุ้งเป็น *Vibrio* sp. ในสปีชีส์เดียวกัน โดยทั่วไปแบคทีเรียในสกุลนี้จะเป็น Secondary cause ในการทำให้เกิดโรคมัยกึ่ง และการเกิดโรคจะเกิดพร้อม ๆ กับความผิดปกติอื่น ๆ เช่น มีความเครียดมากเกินไป เกิดบาดแผลที่ตัวกุ้ง (Sinderman & Lightner, 1988) กุ้งเป็น โรคที่เกิดจาก *Vibrio* sp. เรียกว่าโรค Vibriosis หรือ Vibrio Disease of Penaeid Shrimp (Johnson, 1978) *Vibrio* sp. ที่ทำให้เกิดโรคได้แก่ *V. alginolyticus*, *V. anguillarum* (ชลอ และคณะ, 2530; Johnson, 1978), *V. metschnikorii* และ *V. fluvialis* (Kaper และคณะ, 1983), *V. harveyi*, *V. vulnificus* (ลิลา และคณะ, 2528) *Vibrio* sp. ที่ก่อโรคนี้นี้แยกได้จากอวัยวะต่าง ๆ และในทางเดินอาหารของกุ้งที่เป็นโรค (ชลอ และคณะ, 2530)

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้ง

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้งควรมีคุณสมบัติดังนี้

- ไม่ควรเป็นจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในกุ้ง (non pathogenic) หรือ มีโอกาสก่อให้เกิดโรค เช่น พากวิบรีโอ หรือ พากเชอรา
- ไม่ควรเป็นจุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมแล้วได้สารพิษ โดยปกติจุลินทรีย์พวกนี้จะอยู่ในกลุ่มจุลินทรีย์ที่ไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic bacteria) สารอินทรีย์ เช่น โปรตีน และสารอนินทรีย์ เช่น พากซัลเฟตที่ถูกย่อยแล้ว จะกลายเป็นสารพิษกำมะถัน เช่น ก๊าซไข่เน่า เป็นต้น
- ควรเลือกจุลินทรีย์ที่เป็นมิตร (friendly bacteria) และไม่ก่อโรค เช่น บาซิลลัส และ ไนตริฟายอิงแบคทีเรีย จุลินทรีย์เหล่านี้มักจะอยู่ในกลุ่มของจุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจน (aerobic bacteria)
- ควรเจริญได้ดีในบ่อกุ้ง ในบ่อที่มีสภาวะแตกต่างกัน เช่น เจริญได้ทั้งที่น้ำมีความเค็มน้อย หรือมาก และเจริญได้ในน้ำที่มีพีเอชต่าง ๆ กัน
- ควรมีกิจกรรม (activity) สูง มีความสามารถในการย่อยสลายสารอินทรีย์ได้ดีและสมบูรณ์ผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ได้มากต่อปริมาณเซลล์ที่เท่ากัน
- ควรมีความสามารถในการเปลี่ยนสารพิษให้เป็นสารที่มีพิษน้อยลงหรือไม่มีพิษ เช่น พากไนตริฟายอิง จะเปลี่ยนแอมโมเนียให้กลายเป็นไนเตรด โดยผ่านขบวนการไนตริฟิเคชัน (nitrification) 2 ขั้นตอน หรือแบคทีเรียสังเคราะห์แสง ในกลุ่มสีม่วง (purple nonsulfur bacteria) มีความสามารถในการกำจัดไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) เป็นต้น
- ควรมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของพวกก่อโรคได้ อาจทำได้โดยการแย่งอาหารและที่อยู่ หรือยับยั้งโดยการหลั่งสารประเภทเอนไซม์ออกมาข้างนอกเซลล์ (extracellular enzyme) (นิรนาม, 2540)

มณจันทร์ เมฆธน (2540) กล่าวถึงการใช้จุลินทรีย์ในบ่อกุ้งสามารถใช้เพื่อควบคุมคุณภาพสิ่งแวดล้อมในบ่อกุ้งให้เกิดความสมดุล

การใช้จุลินทรีย์ในบ่อกุ้งวิธีนี้มีจุดประสงค์เพื่อกำจัดของเสียในบ่อ ซึ่งของเสียดังกล่าวคือ อินทรีย์วัตถุต่าง ๆ ซึ่งทำให้เกิดสารที่เป็นอันตรายต่อกุ้ง ทั้งโดยตรงและโดยอ้อม เช่น ก๊าซแอมโมเนีย ในไตรท์ ไฮโดรเจนซัลไฟด์ กรด ค่าง แอลกอฮอล์ อัลดีไฮด์ และเอสเทอร์ เป็นต้น ของเสียในบ่อกุ้ง ส่วนใหญ่มาจากอาหารที่กุ้งกินเหลือ จี๊กุ้ง ตลอดจนซากแพลงก์ตอนที่ตายแล้ว ซึ่งประกอบไปด้วย โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และสารอื่น ๆ

จุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารอินทรีย์กลุ่มใหญ่ที่สุดคือ แบคทีเรีย ส่วนน้อยเป็นยีสต์ เชื้อรา และ โปรโตซัว การดำรงชีวิตของแบคทีเรียในบ่อกุ้งมีทั้งเป็น ออโตโทรฟ (autotroph) และเฮเทอโรโทรฟ (heterotroph) พวกเฮเทอโรโทรฟจะมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายสารอินทรีย์ได้ดีที่สุด เช่น แบคทีเรียในสกุล *Aerobacter* sp., *Bacillus* sp. เป็นต้น แบคทีเรียในสกุล *Bacillus* นั้นมีมากกว่า 25 ชนิด ในปัจจุบันยังมีผลิตภัณฑ์วางขายในท้องตลาดหลายบริษัทด้วยกัน เชื้อ *Bacillus* ที่พบว่ามีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายสารต่าง ๆ โดยการผลิตน้ำย่อยออกมาย่อยสลายสารอินทรีย์ภายนอกเซลล์ได้ดีคือ *Bacillus subtilis* เชื้อตัวนี้สามารถทำให้เกิดการย่อยกากอาหารที่ตกค้างได้ดีมาก แต่ไม่สามารถดำรงสภาพการมีจำนวนมากที่สุด อยู่ได้นานและจะลดจำนวนลงในขณะที่เชื้อที่ย่อยไม่เก่งมีจำนวนมากขึ้น แทน ถึงกระนั้น *Bacillus subtilis* ก็ไม่ได้สูญไป เพียงแต่เหลือน้อยทำงานได้ไม่เต็มที่ หากต้องการให้ย่อยเศษอาหารในบ่อกุ้งเป็นไปได้อย่างดีแบบต่อเนื่อง ก็อาจต้องใส่เชื้อนี้ลงไปใหม่ในบ่อเลี้ยงทุก 7-10 วัน เชื้อ *Bacillus subtilis* ทั้งที่เป็นเซลล์และเป็นสปอร์ เมื่อใส่ลงไปใหม่ในบ่อกุ้ง จะเจริญโดยเพิ่มจำนวนมากขึ้น ต้องการออกซิเจนมาก จึงต้องตีน้ำให้อากาศตลอดเวลา โปรตีนและคาร์โบไฮเดรต รวมทั้งสารอินทรีย์อื่นก็จะถูกย่อยจนได้แอมโมเนีย ทำให้สารอินทรีย์ในน้ำลดลง การทำงานของเชื้อมีประสิทธิภาพสูงขึ้น ภายใน 3-4 วันแรก จากนั้นประสิทธิภาพพลดลง พอถึงช่วง 7-10 วันก็ใส่เชื้อใหม่

เปรมสุดา สมาน (2539) รายงานว่าการแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างตะกอนและน้ำบ่อเลี้ยงกุ้ง จากจังหวัดสงขลา นครศรีธรรมราชและฉะเชิงเทรา พบว่า *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ P1 *B. megaterium* สายพันธุ์ P3 *B. lentus* สายพันธุ์ S22 และ *B. marinus* สายพันธุ์ S25 สามารถใช้เป็นตัวควบคุมเชิงคุณภาพในการบำบัดน้ำเสียที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงกุ้งได้ เนื่องจากมันสามารถย่อยโปรตีน แป้ง และไขมัน ในบ่อกุ้งได้

การศึกษาถึงชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารในวัยต่างๆของการเจริญของกุ้ง ก้ามกราม ซึ่งยังไม่มีผู้ใดศึกษามาก่อน นอกจากจะช่วยให้เราทราบถึงการเปลี่ยนแปลงของชนิดของจุลินทรีย์ตลอดระยะเวลาของการเพาะเลี้ยง ซึ่งช่วยให้เราสามารถควบคุมชนิดของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของกุ้งแล้ว ยังสามารถใช้เชื้อที่แยกได้มาผลิตเป็น โพรไบโอติกสำหรับเพาะเลี้ยงกุ้งในวัย

ต่างๆของการเจริญได้ ซึ่งจะช่วยให้เกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามสามารถเพิ่มผลผลิตและรายได้ อันจะนำมาซึ่งการพัฒนาประเทศต่อไป

ในงานวิจัยนี้ จะศึกษาถึงชนิดและจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากระบบทางเดินอาหารของกุ้งก้ามกรามในบ่อเพาะเลี้ยงจังหวัดขอนแก่น และจังหวัดกาฬสินธุ์ ตั้งแต่เริ่มทำการเพาะเลี้ยงจนกระทั่งสิ้นสุดว่ามีปริมาณและชนิดแตกต่างกันหรือไม่อย่างไร เพื่อเป็นแนวทางที่จะใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพซึ่งแยกได้จากระบบทางเดินอาหารของกุ้งก้ามกรามนี้เป็นโพรไบโอติกผสมอาหารทดลองเลี้ยงกุ้งก้ามกรามต่อไป

บทที่ 3

วัสดุ และอุปกรณ์

3.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ใช้จุลินทรีย์จาก 2 แหล่งคือ

3.1.1 จุลินทรีย์ *Aeromonas hydrophila* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในการเพาะเลี้ยงสัตว์มากที่สุด ได้มาจากเชื้อบริสุทธิ์ที่เก็บรักษาไว้ของ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3.1.2 จุลินทรีย์ *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* และ *Bacillus cereus* ที่คัดแยกจากระบบทางเดินอาหารกุ้งก้ามกรามในฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามของเกษตรกร จังหวัดขอนแก่น และ จังหวัดกาฬสินธุ์ แบคทีเรียที่ได้ทำให้เจริญหลังแยกเชื้อให้บริสุทธิ์แล้วเก็บไว้ในอาหารเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ในหลอดฝาเกลียวเก็บที่ 4 °ซ และในกลีเซอรอล 18 เปอร์เซ็นต์ เก็บที่ -20 °ซ

3.2 กุ้งก้ามกรามที่ใช้ในการทดลอง

3.2.1 ตัวอย่างกุ้งก้ามกรามจากเกษตรกรผู้ทำการเพาะเลี้ยงใน จังหวัดขอนแก่น และเกษตรกรใน จังหวัดกาฬสินธุ์ ตั้งแต่เริ่มเพาะเลี้ยง (post larvae) อายุประมาณ 1-2 เดือน จนเป็นตัวเต็มวัย (adult) อายุประมาณ 4-6 เดือน

3.3 เคมีภัณฑ์

ชื่อสารเคมี	บริษัท	ประเทศ
Sucrose	Sigma Chemical Co.	USA
D-glucose	Fluka A.G. Buck S.G.	Switzerland
D-fructose	Sigma Chemical Co.	USA
Ferric acid	Cerlo Erba	England
Ethyl alcohol	Fluka A.G. Buck S.G.	Switzerland
Acetone	E. Merck	Germany
NH ₄ OH	Sigma Chemical Co.	USA
CuSO ₄ .5H ₂ O	Sigma Chemical Co.	USA
KOH	Sigma Chemical Co.	USA
Alpha naphthol	Sigma Chemical Co.	USA
Paradimethylaminobenzaldehyde	Fluka A.G. Buck S.G.	Switzerland
Malachite green	Fluka A.G. Buck S.G.	Switzerland
K ₂ S ₂ O ₈	Fluka A.G. Buck S.G.	Switzerland

สารเคมีทั่วไปชนิดอื่นๆเป็นเกรดวิเคราะห์ทั้งหมดจากบริษัท Sigma Chemical Co. สหรัฐอเมริกา และบริษัท Fluka A.G. Buch S.G. ประเทศสวิทซ์เซอร์แลนด์

3.4 ครุภัณฑ์

ครุภัณฑ์ที่ใช้ในงานวิจัย ประกอบด้วยเครื่องมือดังต่อไปนี้

ชื่อเครื่องมือ	รุ่น	บริษัท	ประเทศ
Spectrophotometer	UV-1601	Shimadzu Corporation	Japan
Refrigerated centrifuge	SorvallRC26	Dupont	USA
Controlled environment incubator	Plus	New Brun Swick	USA
Shaker	G-27	Scientific Edison	
		Radiometer	
pH meter	PHM210	Analytical Hirayama	France
Autoclave	Hiclave HV-85	Manufacturing Corporation	Japan
Hot air oven	F240	Binder	Germany
Larmina flow	Europeene R.D.	Flufrance	France
Hotplate/ magnetic stirrer	M21/1	Framo Geratetechnick	Germany
Shaking water bath	SBD50BIO	Heto-Holten	Denmerk
Vortex mixer	G560E	Scientific Industries inc.	USA
Balance	PR503	Mettler –Toled	Thailand
Bioreactor	Biostat-B	B. Braun Biotech	Germany
Anaerobic jar		International	

บทที่ 4

วิธีดำเนินการวิจัย

4.1 ขั้นตอนและวิธีการคัดแยกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของกิ้งก่ามกราม

4.1.1 การเก็บตัวอย่างกิ้งก่ามกราม

เก็บตัวอย่างกิ้งก่ามกรามจากฟาร์มที่ทำการเพาะเลี้ยงกิ้งก่ามกรามในบ่อดินระบบเปิดมีขนาดตั้งแต่ 3-5 ไร่ ลึกประมาณ 1.5 เมตร (ภาพที่ 4) เป็นบ่อเลี้ยงกิ้งก่าที่จากจังหวัดขอนแก่น และจังหวัดกาฬสินธุ์ โดยเก็บตัวอย่างกิ้งก่ามกรามตั้งแต่เริ่มต้น (post larvae) ซึ่งมีอายุประมาณ 1-2 เดือน จนกระทั่งสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงกิ้งก่ามกราม (adult) อายุประมาณ 4-6 เดือนในบ่อนั้น ๆ โดยการเก็บตัวอย่างกิ้งก่ามกรามนั้นจะทำการลุ่มโดยใช้สวิงหรืออวนตาถี่ลากไปตามบ่อ (ภาพที่ 5) จะทำการเก็บตัวอย่างกิ้งก่ามกราม 20 ตัว ในทุก ๆ 14 วัน ซึ่งจะทำให้การเก็บตัวอย่างสลับกันไปทั้ง 2 พื้นที่ของการเพาะเลี้ยง ตัวอย่างกิ้งก่ามกรามที่ทำการเก็บใส่ในภาชนะที่สะอาดปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อน ใช้ภาชนะที่สะอาดปราศจากเชื้อทำการเก็บตัวอย่างน้ำในบ่อเพาะเลี้ยงกิ้งก่ามกรามมาทำการตรวจดูค่าความเป็นกรดด่าง ในส่วนของอุณหภูมิจะใช้เทอร์โมมิเตอร์ลุ่มวัดค่าในบ่อเพาะเลี้ยงกิ้งก่ามกราม 3 จุดแล้วหาค่าเฉลี่ย

4.1.2 การเตรียมตัวอย่างกิ้งก่ามกรามก่อนทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์

นำตัวอย่างกิ้งก่ามกรามมาหาอัตราการเจริญเติบโตโดยใช้ไม้บรรทัดวัดความยาวลำตัวของตัวอย่างกิ้งก่ามกรามโดยวัดความยาวตั้งแต่ปลายหางจนถึงปลายสุดของส่วนหัวกิ้งก่ามกราม (Total range) หลังจากทำการวัดขนาดความยาวของลำตัวกิ้งก่ามกรามแล้ว จากนั้นนำตัวอย่างกิ้งก่ามกรามมาชั่งน้ำหนักเพื่อทำการบันทึกอัตราการเจริญเติบโต นำตัวอย่างกิ้งก่ามกรามที่ผ่านการชั่งน้ำหนักและวัดขนาดความยาวของลำตัวแล้วใส่ลงในบีกเกอร์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ล้างทำความสะอาดตัวอย่างกิ้งก่ามกรามด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 2-3 ครั้ง (ภาพที่ 6) จากนั้นทำให้กิ้งก่ามกรามหมดสติโดยการใช้ น้ำแข็งที่ทำจากน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อใส่ลงไป ในบีกเกอร์ตัวอย่างกิ้งก่ามกรามทิ้งไว้ประมาณ 5-10 นาที สังเกตดูว่ากิ้งก่ามกรามหมดสติแล้วจึงล้างทำความสะอาดลำตัวกิ้งก่ามกรามอีก 1-2 ครั้ง (ภาพที่ 7)

4.1.3 วิธีการคัดแยกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์จากลำไส้กิ้งก่ามกราม

นำตัวอย่างกิ้งก่ามกรามจากข้อ 4.1.2 มาตัดทางเดินอาหาร โดยวิธีปราศจากเชื้อ (aseptic technique) โดยใช้กรรไกรผ่าตัดขนาดเล็กตัดส่วนปลายของหางและส่วนของหัวตัวอย่างกิ้งก่ามกรามออกก่อน ต่อจากนั้นจึงใช้กรรไกรตัดเลาะบริเวณกลางหลังตรงส่วนของลำไส้ โดยตัดเลาะตลอดความยาวของลำตัว จากนั้นใช้มีดผ่าตัดเปิดกลางส่วนหลังให้มองเห็นส่วนของลำไส้อย่างชัดเจนจึงใช้เข็มเข็ม

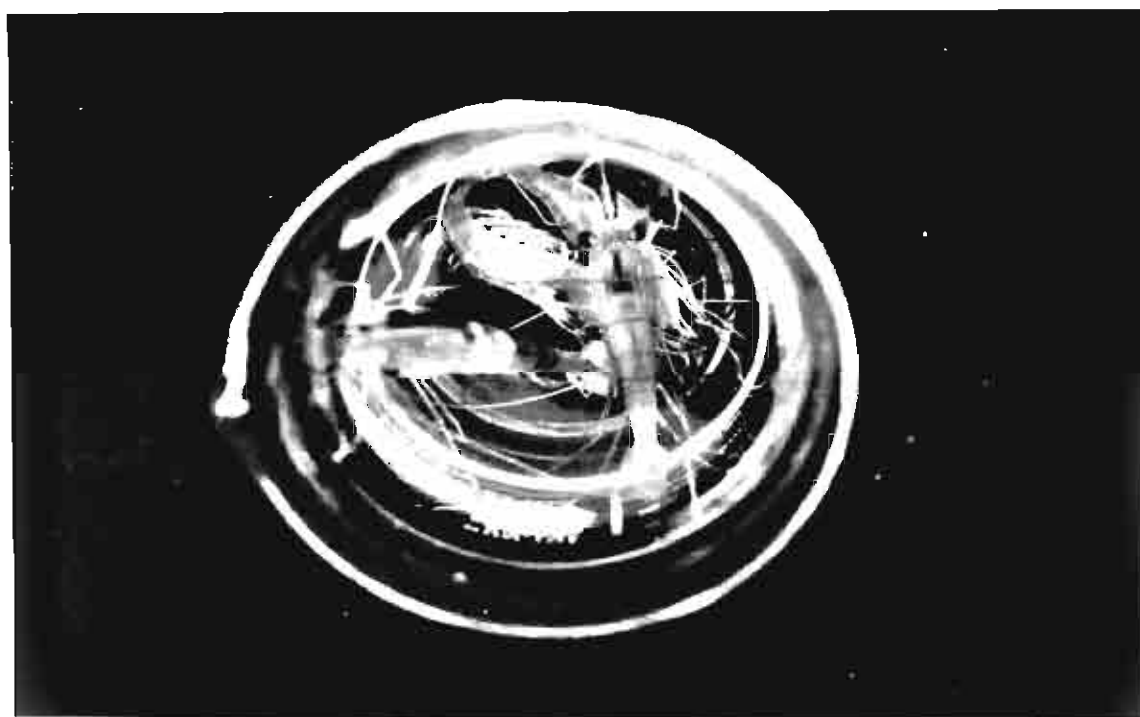
ขนาดเล็กเขี่ยคลำไล่ของตัวอย่างกุ้งก้ามกรามออกมาใส่ในหลอดทดลองแล้วนำมาชั่งน้ำหนัก (ภาพที่ 8) จากนั้นนำไล่ของตัวอย่างกุ้งก้ามกรามที่อยู่ในหลอดทดลองมาบดโดยใช้ค้อนของปลายเข็มเขี่ยที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วบดให้ละเอียด (ภาพที่ 9) จากนั้นเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วใส่ลงไป 2-3 หยด ทำการเขี่ยด้วยเทคนิค streak plate บนอาหารแข็งสูตร NA, YM และ PDA บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตามลำดับ ตัวอย่างไล่ใส่กุ้งก้ามกรามที่เหลือทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ระดับความเจือจาง 10^1 - 10^6 แล้วทำการเทเพลทด้วยเทคนิค pour plate ในอาหารสูตร NA, YM และ PDA บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง (ภาพที่ 10) จากนั้นตรวจนับจำนวนโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดแล้วทำการแยก (isolate) ให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ เพื่อใช้ทดสอบขั้นตอนต่อไป ซึ่งขั้นตอนของการเขี่ยเชื้อ และการเทเพลท จะทำซ้ำ 2 ชุดการทดลองโดยที่ชุดที่ 1 จะเลี้ยงเชื้อในสถานะที่มีออกซิเจน (aerobic condition) ส่วนในชุดที่ 2 จะเลี้ยงเชื้อในสถานะที่ไม่มีออกซิเจน (anaerobic condition) โดยทำการใส่เพลทเลี้ยงเชื้อลงใน anaerobic jar (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 4 แสดงบ่อดินที่เกษตรกรใช้ทำการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกราม



ภาพที่ 5 แสดงการเก็บตัวอย่างกุ้งก้ามกรามในบ่อ โดยใช้สวิงขนาดเล็กสุ่มลากไปทั่วบ่อ



ภาพที่ 6 แสดงการล้างทำความสะอาดตัวอย่างกุ้งก้ามกรามที่สุ่มได้จากบ่อ



ภาพที่ 7 แสดงวิธีการทำให้ตัวอย่างงู้งก้ำมกรามหมดสติโดยใช้น้ำแข็ง



ภาพที่ 8 แสดงวิธีการคัดเลาะคามลำตัวงู้งก้ำมกรามเพื่อทำการแยกลำไส้ออกมา



ภาพที่ 9 แสดงการบดไล่ไส้กึ่งก้ามกรามเพื่อทำการศึกษานิคและจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์
ในไล่ไส้ของกึ่งก้ามกรามในขั้นตอนต่อไป



ภาพที่ 10 แสดงการศึกษานิคและจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ในไล่ไส้กึ่งก้ามกราม
โดยวิธีการ streak plate และ pour plate technique



ภาพที่ 11 แสดงการบ่มเชื้อจุลินทรีย์ในสถานะที่ไม่มีออกซิเจน โดยใช้ anaerobic jar

4.1.4 วิธีการทดสอบคุณสมบัติของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากลำไส้กุ้งก้ามกราม

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากลำไส้ของกุ้งก้ามกราม โดยทำการคัดเลือกโคโลนีเดี่ยว ๆ บนอาหารแต่ละชนิดมาจำแนก (identify) ว่าเป็นเชื้อจุลินทรีย์ชนิดใด โดยนำเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้ไปเลี้ยงให้มีอายุ 24-48 ชั่วโมง ไปศึกษาทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีโดยยึดหลักการจำแนกตาม Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Sneath และคณะ, 1986)

4.1.4.1 ลักษณะการเจริญและสัณฐานวิทยา

สังเกตลักษณะขอบ รูปร่าง และลักษณะการสร้างสี (Pigment) ของโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

การติดสีแกรม

นำจุลินทรีย์ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้ออายุ 18 ชั่วโมง มาย้อมติดสีแกรม (ภาคผนวก ข) ดูรูปร่างและการจัดเรียงตัวของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์

การย้อมเอนโดสปอร์

นำจุลินทรีย์ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้ออายุ 24-48 ชั่วโมงมาย้อมเอนโดสปอร์ (ภาคผนวก ข) นำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ สปอร์จะติดสีเขียว ส่วนเซลล์จะติดสีแดง

4.1.4.2 ลักษณะทางชีววิทยาและชีวเคมี

การทดสอบการเคลื่อนที่

เพาะเชื้อลงบนอาหารทดสอบการเคลื่อนที่ (Motility test medium) (ภาคผนวก ก) โดยแทงเข็มเขี่ยเชื้อลงไปจนสุดหลอดทดสอบ บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ ถ้าเชื้อสามารถเคลื่อนที่ได้จะมีรอยการเจริญออกจากรอยที่แทงไว้

การสร้างอะคะเลส

ใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ อายุ 24 ชั่วโมง มากระจายลงบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 3% ลงบนเชื้อ ถ้ามีฟองก๊าซเกิดขึ้นแสดงว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์อะคะเลสได้ผลเป็นบวก แต่ถ้าไม่เกิดฟองก๊าซแสดงว่าไม่สามารถสร้างเอนไซม์อะคะเลสได้ให้ผลเป็นลบ

การทดสอบการสร้างอินโดล

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารเหลวทริปโตเฟน (Tryptophan broth) (ภาคผนวก ก) บ่มเชื้อ 37 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทดสอบการสร้างอินโดลโดยหยดสารละลายโคแวกส์ (Kovac's reagent) (ภาคผนวก ข) 1-2 หยด ถ้าเกิดวงสีชมพูอมม่วงที่ผิวหน้าอาหาร แสดงว่า เชื้อสร้างเอนไซม์ทริปโตฟานเนส (Tryptophanase) ย่อยสลายทริปโตเฟนในอาหารเลี้ยงเชื้อได้อินโดล ถ้าไม่เกิดสีแสดงว่าให้ผลเป็นลบ

การทดสอบเมทิลเรด (Methyl red test)

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มอาร์-วีพี (MR-VP medium) (ภาคผนวก ก) บ่มที่ 37 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบผลโดยหยดสารละลายเมทิลเรด (ภาคผนวก ข) 5-6 หยดลงไป ถ้าเกิดสีแดงแสดงว่า แบคทีเรียสร้างกรดออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ อะซิติก แลคติก หรือ ฟอร์มิก จากกลูโคส เนื่องจากเมทิลเรดจะเปลี่ยนสีในช่วงพีเอช 6.0 (สีเหลือง) และพีเอช 4.4 (สีแดง) จัดว่าให้ผลเป็นบวก ถ้าเกิดสีเหลืองให้ผลเป็นลบ

การทดสอบเมทิลคาร์บอนอล (Voges prokauer test)

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มอาร์-วีพี (MR-VP medium) บ่มที่ 37 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทดสอบโดยเติมสารแอลฟาแนฟทอล (α -Naphthol) 5% ปริมาตร 0.3 มล. ก่อนจึงใส่สารละลายไพแทสซีมไฮดรอกไซด์ 40% ปริมาตร 0.2 มล. เขย่าให้ผสมกัน ถ้ามีสีแดงเกิดขึ้นภายใน 10 นาที หรือ 24 ชม. แสดงว่าแบคทีเรียมีการผลิตอะซิโตอิน (Acetoin) จากวัฏจักรบิวทีริน

ไกลคอล (Butylene glycol pathway) ซึ่ง 40% โปแทสเซียมไฮดรอกไซด์จะเปลี่ยนกลับให้อะซิโตอิน กลายเป็นไดอะซิติก (Diacetyl) และเกิดสารประกอบสีแดง โดยการเร่งปฏิกิริยาของแอลฟาแนฟทอล ให้บันทึกผลเป็นบวก ถ้าไม่เกิดสีแดงให้ผลเป็นลบ

การใช้ซิเตรท

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารซิมมอนส์ซิเตรท (Simmon's citrate agar) (ภาคผนวก ก) บ่มที่ 37 °ซ เป็นเวลา 2-7 วัน เชื้อที่สามารถใช้ซิเตรทได้จะเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์ในอาหาร จากสีเขียวกลายเป็นสีน้ำเงิน เนื่องจากเชื้อสามารถใช้โซเดียมซิเตรทเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ แอมโมเนียมฟอสเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ ได้แอมโมเนียที่มีสมบัติเป็นเบส ทำให้บรอมไทมอลบลู เปลี่ยนจากสีเขียวกลายเป็นสีน้ำเงิน ถ้าเชื้อไม่สามารถใช้โซเดียมซิเตรทได้ อาหารเลี้ยงเชื้อจะมีสีเขียว เหมือนเดิม

การสร้างเจลาตินเนส

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารเจลาติน (ภาคผนวก ก) บ่มที่ 22 °ซ เป็น เวลา 3 วัน แล้วนำหลอดเลี้ยงเชื้อไปแช่เย็น 30 นาที ทำเปรียบเทียบกับหลอดที่ไม่ได้ใส่เชื้อ ถ้าหลอดที่ ใส่เชื้อสูญเสียสมบัติการแข็งตัว แสดงว่าเชื้อสร้างเจลาตินเนสย่อยเจลาตินได้ ให้ผลเป็นบวก

การสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารแ่งทีเอสไอ (TSI agar) (ภาคผนวก ก) 2 ครั้งต่อ 1 หลอดอาหาร ครั้งแรกแทงลงไป ในอาหารที่เอียงจนสุดหลอด ครั้งที่สองจะลากไปบนผิวหน้า อาหารที่เอียง บ่มที่ 37 °ซ เป็นเวลา 24-48 ชม. สังเกตการเปลี่ยนสีของอาหาร เชื้อที่ผลิต ไฮโดรเจนซัลไฟด์จะให้สีดำของเฟอร์รัสซัลไฟด์ตามรอยที่ปลูกเชื้อ อ่านผลเป็นบวก นอกจากนี้อาหาร แ่งทีเอสไอ ยังสามารถทดสอบได้ 2 ชนิดคือ ทดสอบการใช้น้ำตาล และทดสอบการเกิดก๊าซ เพราะใน อาหารมีน้ำตาล 3 ชนิดคือ กลูโคส 1 ส่วน แลคโตส 10 ส่วน และซูโครส 10 ส่วน มีฟีนอลเรดเป็นอินดิ เคเตอร์ ดังนั้นถ้าแบคทีเรียใช้น้ำตาลในกระบวนการหมักได้จะเจริญที่ก้นหลอด แต่ถ้าใช้น้ำตาลใน กระบวนการออกซิเดชัน จะมีการเจริญที่ผิวหน้าของอาหาร แบคทีเรียที่ใช้กลูโคสอย่างเดียวใน กระบวนการหมัก จะทำให้มีกรดเกิดขึ้นจึงมีสีเหลืองเฉพาะที่ก้นหลอดส่วนที่ผิวจะมีสีแดง ถ้าใช้ ซูโครสหรือแลคโตสด้วยจะมีสีเหลืองที่ผิวหน้าอาหารเพราะมีการเกิดขึ้นจำนวนมาก ถ้าไม่มีการเปลี่ยน สี แสดงว่าไม่มีการหมัก และถ้ามีก๊าซเกิดขึ้นจากการใช้น้ำตาล ฟองก๊าซจะอยู่ในวุ้นอาหาร

การทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาล

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทดสอบการใช้น้ำตาล (Phenol red broth base) ที่ประกอบด้วยน้ำตาลที่ใช้ทดสอบ 1% (ภาคผนวก ก) บ่มที่ 37 °ซ เป็นเวลา 18-24 ชม. สังเกตการสร้างกรด ถ้าเชื้อสามารถใช้คาร์โบไฮเดรตได้จะสร้างกรด ทำให้อินดิเคเตอร์ฟีนอล เรดในอาหารเปลี่ยนสีจากสีแดงเป็นสีเหลืองให้ผลเป็นบวก ถ้าไม่เปลี่ยนสีให้ผลเป็นลบ

4.1.5 วิธีการเก็บรักษาจุลินทรีย์

4.1.5.1 การเก็บรักษาระยะสั้น

เชื้อ 1 โคโลนี ของเชื้อจุลินทรีย์ลงบนอาหารแข็งสูตร culture medium ที่มีลักษณะลาดเอียง จากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดนั้น ๆ เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ปัดจุลินทรีย์ด้วยพาราฟินเหลว เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C ได้นาน 2-3 เดือน เก็บเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นเชื้อตั้งต้นระหว่างการทดลอง ในจานเพาะเลี้ยงสูตร culture medium ที่อุณหภูมิ 4 °C ได้นาน 15 วัน

4.1.5.2 การเก็บรักษาระยะยาว

เก็บเชื้อจุลินทรีย์ในกลีเซอรอล 18 เปอร์เซ็นต์ที่อุณหภูมิ -20 °C ได้นาน 1 ปี

4.2 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากระบบทางเดินอาหารของกิ้งก่ามกรามเพื่อจะนำมาใช้เป็น โพรไบโอติก

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำการแยกได้จากลำไส้ของตัวอย่างกิ้งก่ามกรามมาทำการศึกษาสภาวะและปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการเจริญ โดยเชื้อเชื้อที่เก็บรักษาไว้ 1 หลอด ลงในอาหารเหลวสูตรนิวเทรียนท์ (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 100 มล. ซึ่งบรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 18-24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมเชื้อตั้งต้น 10 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารเพาะเลี้ยง แล้วทำการเพาะเลี้ยงเพื่อหาสภาวะของการเจริญเติบโตโดยแปรผันอุณหภูมิเป็น 30, 35, 37, 40 และ 42 °C และแปรผันค่า pH เท่ากับ 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0 ตามลำดับ ทุกๆ 3 ชั่วโมง เก็บตัวอย่าง 1 มล. โดยนำมาปั่นล้างตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อโดยใช้ refrigerated centrifuge ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 °C นาน 10 นาที จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นเจือจางตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:10 แล้วนำไปวัดการเจริญเติบโตโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

4.3 การคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรค

4.3.1 การเตรียมหัวเชื้อเพื่อทดสอบความสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบ

เชื้อเชื้อ 1 หลอด ที่แยกได้จากระบบทางเดินอาหารกิ้งก่ามกรามจากอาหารแข็งนิวเทรียนท์ (ภาคผนวก ก) ลงในอาหารเหลวนิวเทรียนท์ (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 100 มล. ซึ่งบรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 18-24 ชั่วโมง แบ่งเก็บเชื้อทดสอบเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 เป็นส่วนที่ประกอบไปด้วยส่วนของน้ำใสและตัวเซลล์รวมกัน ส่วนที่ 2 นำมาปั่นโดยใช้ refrigerated centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 °C นาน 20 นาที

จำนวน 2 ครั้ง เพื่อคัดกรองเซลล์ จากนั้นนำส่วนใสไปกรองผ่านแผ่นกรอง (Millipore membrane filter) ขนาด 0.45 ไมโครเมตร นำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบ

4.3.2 การเตรียมเชื้อทดสอบที่ก่อโรคในกุ้งก้ามกราม

เชื้อทดสอบที่ก่อโรคในกุ้งก้ามกราม ได้แก่ *Aeromonas hydrophila* จากภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น

นำเชื้อทดสอบ 1 ลูบ จากอาหารแข็งนิเวศรีนทร์ (ภาคผนวก ก) ลงในอาหารเหลวนิเวศรีนทร์ (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 100 มล. บรรจุในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. เขย่าที่อุณหภูมิ 37 °ซ ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชม.

4.3.3 การทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรคในกุ้งก้ามกราม (*Aeromonas hydrophila*) โดยวิธีการซึมผ่านกระดาษกรอง (Disc diffusion assay คัดแปลงจาก วรณิภา เพียรภักดิ์, 2539)

ดูดเชื้อก่อโรค *Aeromonas hydrophila* 100 μ l ใส่ลงในอาหารแข็งนิเวศรีนทร์ (ภาคผนวก ก) แล้วทำการ spread plate นำกระดาษกรองปลอดเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร วางบนอาหารที่ spread plate เรียบร้อยแล้ว นำส่วนใสที่เตรียมได้จากข้อ 4.3.1 ส่วนที่ผ่านการกรองเอาเซลล์ออกแล้ว มาหยดลงบนกระดาษกรองโดยแปรผันเป็น 100, 300 และ 500 μ l บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ผลการยับยั้งจากการเกิดบริเวณใส (Clear zone inhibition) รอบโคโลนีของเชื้อที่ใช้ทดสอบ วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสที่เกิดขึ้น

4.3.4 การทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรคในกุ้งก้ามกราม (*Aeromonas hydrophila*) บนอาหารแข็งโดยวิธีการซึมผ่านวุ้น (Well diffusion assay)

ดูดเชื้อก่อโรค *Aeromonas hydrophila* 1 มล. หยดลงในอาหารแข็งนิเวศรีนทร์ (ภาคผนวก ก) และใช้ตำลึงปั่นปลาโยไมซ์เชื้อให้กระจายทั่วทั้งอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ระบาย ทิ้งไว้ให้แห้ง นำมาเจาะหลุมด้วยแท่งเหล็กขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มม. เบอร์ 5 เจาะลงบนวุ้นจำนวน 5 หลุม ด้วยวิธีปราศจากเชื้อ นำเชื้อทดสอบที่เตรียมได้จากข้อ 4.3.1 ส่วนที่ 1 (ส่วนที่ไม่ได้ผ่านการกรองเซลล์) ของแต่ละเชื้อมาหยดลงในหลุมๆ ละ 300 μ l นำไปแช่ตู้เย็นเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อไม่ให้เชื้อซึมเข้าไปในวุ้น และป้องกันเชื้อเจริญ หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 24 ชม. ผลการทดลองโดยวัดขนาดบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น (Clear zone inhibition) (Schillinger & Lucke, 1989)

บทที่ 5

ผลการทดลอง

5.1 ผลของการศึกษาชนิดและปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของตัวอย่างกุ้งก้ามกรามที่เก็บจากฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามใน จ.ขอนแก่นและ จ. กาฬสินธุ์

5.1.1 คุณภาพน้ำและอัตราการเจริญเติบโตของตัวอย่างกุ้งก้ามกรามระหว่างการเพาะเลี้ยง

ผลการทดลอง พบว่า ค่า pH และอุณหภูมิของน้ำในบ่อที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกราม ตลอดระยะเวลาของการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามในบ่อของเกษตรกร จ. ขอนแก่น มีค่า pH อยู่ในช่วง 6.6-7.4 ในส่วนของอุณหภูมิน้ำวัดค่าได้อยู่ระหว่าง 28-32 °C และความยาวลำตัวเฉลี่ย (Total range) วัดได้อยู่ในช่วง 4.3-11.2 เซนติเมตร น้ำหนักลำตัวเฉลี่ยและน้ำหนักลำไส้เฉลี่ยซึ่งได้อยู่ระหว่าง 1.1-7.9 กรัม และ 0.004-0.08 กรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 11) ส่วนน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งก้ามกรามของเกษตรกร จ. กาฬสินธุ์ มีค่า pH อยู่ในช่วง 5.6-7.3 และอุณหภูมิมีค่าเท่ากับ 29-32 °C ความยาวและน้ำหนักลำตัวเฉลี่ยกุ้งก้ามกรามวัดได้อยู่ในช่วง 3.2-14.8 เซนติเมตร และ 1.4-10.3 กรัม ตามลำดับ ส่วนค่าน้ำหนักลำไส้เฉลี่ยซึ่งได้อยู่ในช่วง 0.004-0.19 กรัม (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 11 แสดงการเก็บตัวอย่างกุ้งก้ามกรามจาก จ. ขอนแก่น ในช่วงเดือนกรกฎาคม 2542 ถึง เดือนมกราคม 2543 (อายุประมาณ 7-33 สัปดาห์)

ตัวอย่าง กุ้งก้ามกราม อายุ(สัปดาห์)	อุณหภูมิ เฉลี่ย (°C) SD ± 1	pH เฉลี่ย SD ± 0.02	น้ำหนักลำตัวเฉลี่ย (กรัม) SD ± 0.1	ความยาวลำตัวเฉลี่ย (ซม.) SD ± 0.1	น้ำหนักลำไส้ เฉลี่ย (กรัม) SD ± 0.001
7	30	7.37	1.1	4.3	0.004
9	31	6.83	1.6	4.4	0.004
11	31	6.74	1.5	4.9	0.005
13	31	6.82	2.3	6.6	0.005
15	28	6.67	2.4	7.2	0.006
17	30	6.76	3.6	7.5	0.005
19	31	6.47	3.9	8.6	0.007
21	31	6.60	4.5	8.1	0.007
23	30	6.82	4.6	9.6	0.008
25	30	6.65	5.6	10.8	0.008
27	29	6.94	5.9	11.2	0.008
29	30	6.30	6.8	10.9	0.012
31	29	6.45	7.2	11.1	0.010
33	32	6.81	7.9	11.0	0.010

ตารางที่ 12 แสดงการเก็บตัวอย่างกุ้งก้ามกรามรอบที่ 1 จาก จ. กาฬสินธุ์ ในช่วงเดือนสิงหาคม 2542 ถึง เดือนมิถุนายน 2543 (อายุประมาณ 6-48 สัปดาห์)

ตัวอย่าง กุ้งก้ามกราม อายุ (สัปดาห์)	อุณหภูมิ เฉลี่ย ($^{\circ}\text{C}$) $\text{SD} \pm 1$	pH เฉลี่ย $\text{SD} \pm 0.02$	น้ำหนักลำ ตัวเฉลี่ย (กรัม) $\text{SD} \pm 0.1$	ความยาวลำ ตัวเฉลี่ย (ซม.) $\text{SD} \pm 0.1$	น้ำหนักลำไส้ เฉลี่ย (กรัม) $\text{SD} \pm 0.001$
6	30	7.13	1.4	3.2	0.004
8	31	7.08	1.6	3.6	0.005
10	30	6.93	1.7	4.5	0.005
12	31	7.04	2.3	4.3	0.006
14	29	7.13	2.5	4.7	0.006
16	30	7.12	2.2	5.4	0.021
18	30	7.06	2.9	5.8	0.022
20	31	6.12	3.4	6.3	0.025
22	31	5.67	3.7	6.7	0.033
24	31	6.63	4.6	7.1	0.035
26	31	5.72	4.9	6.9	0.051
28	30	6.63	5.7	7.4	0.120
30	31	6.83	5.9	7.2	0.060
32	30	7.12	6.9	8.0	0.050
34	30	7.01	8.4	8.4	0.110
36	30	6.86	8.6	8.3	0.080
38	31	5.72	8.8	8.9	0.150
40	31	6.13	9.3	9.6	0.120
42	32	6.48	9.1	11.4	0.150
44	30	6.85	9.5	12.2	0.180
46	32	7.21	10.3	13.3	0.190
48	31	6.89	9.8	13.8	0.160

การทดลองได้ทำการเก็บตัวอย่างกุ้งก้ามกรามในบ่อเพาะเลี้ยงของเกษตรกรใน จ. กาฬสินธุ์ อีกครั้งหนึ่ง แต่คนละบ่อของการเพาะเลี้ยง พบว่า ค่า pH และอุณหภูมิของน้ำในบ่ออยู่ในช่วง 6.59-7.22 และ 30-32 °C ตามลำดับ ความยาวลำตัวเฉลี่ย (Total range) มีค่าอยู่ในช่วง 2.9-5.9 ซม. ส่วนน้ำหนักลำตัวและน้ำหนักลำไส้เฉลี่ยวัดได้อยู่ระหว่าง 1.2-3.6 กรัม และ 0.004-0.014 กรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 13)

ตารางที่ 13 แสดงการเก็บตัวอย่างกุ้งก้ามกรามรอบที่ 2 จาก จ. กาฬสินธุ์ ในช่วงเดือนเมษายน 2543 ถึง เดือนกรกฎาคม 2543 (อายุประมาณ 6-18 สัปดาห์)

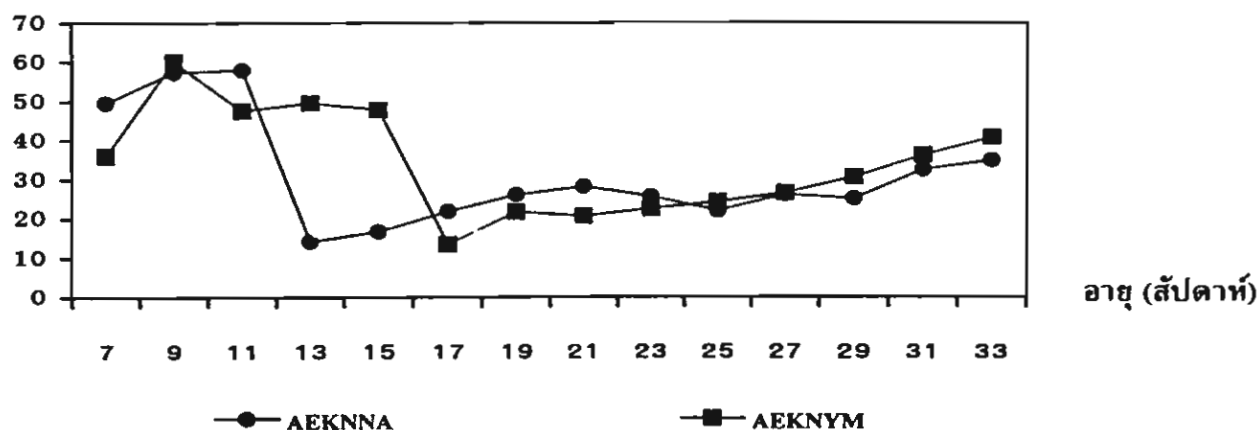
ตัวอย่าง กุ้งก้ามกราม อายุ (สัปดาห์)	อุณหภูมิ เฉลี่ย (°C) SD $\pm$ 1	pH เฉลี่ย SD $\pm$ 0.02	น้ำหนักลำ ตัวเฉลี่ย (กรัม) SD $\pm$ 0.1	ความยาวลำ ตัวเฉลี่ย (ซม.) SD $\pm$ 0.1	น้ำหนักลำ ไส้เฉลี่ย (กรัม) SD $\pm$ 0.001
6	31	7.03	1.2	2.9	0.004
8	32	7.14	1.8	3.2	0.005
10	31	7.22	2.1	3.7	0.006
12	31	6.94	2.5	3.6	0.006
14	30	6.89	2.3	4.6	0.008
16	31	6.87	2.8	5.6	0.008
18	30	6.59	3.6	5.9	0.014

5.1.2 ชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากระบบทางเดินอาหาร

เมื่อทำการผ่าตัดแยกเอาเฉพาะลำไส้กุ้งก้ามกรามมาตรวจหาชนิดและจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ พบว่า กุ้งก้ามกรามที่เลี้ยงในบ่อของเกษตรกรทั้ง จ. ขอนแก่น และ จ. กาฬสินธุ์ มีจำนวนชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีลักษณะเหมือนกัน โดยที่เชื้อทั้งหมดนี้สามารถขึ้นได้ทั้งใน NA medium และ YM medium และพบเหมือนกันทั้งในสภาวะของการเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีออกซิเจน (Aerobe) และในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (Anaerobe) โดยจำนวนเชื้อที่นับได้ในอาหารแข็งนิวตริยนต์ ในสภาวะที่มีอากาศของลำไส้ ตัวอย่างกุ้งก้ามกราม จ. ขอนแก่นมีค่าอยู่ในช่วง 1.7×10^7 - 5.8×10^7 cfu/g ของน้ำหนักลำไส้ (ภาพที่ 12) และในอาหารแข็ง YM นับจำนวนเชื้อได้ทั้งหมดมีค่าอยู่ระหว่าง 1.3×10^7 - 6.4×10^7 cfu/g ของน้ำหนักลำไส้ และในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนนับจำนวนเชื้อในอาหารแข็งนิวตริยนต์ได้ 5.5×10^6 - 4.3×10^7 cfu/g

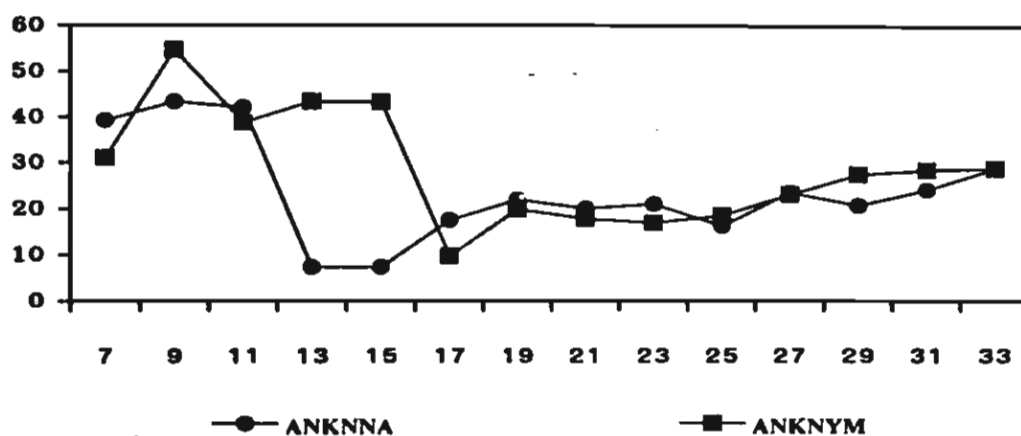
ของน้ำหมักลำไ้ และในอาหารแข็ง YM นับจำนวนเชื้อได้ 7.9×10^6 - 5.4×10^7 cfu/g ของน้ำหมักลำไ้ (ภาพที่ 13) ในตัวอย่างกึ่งก้ามกรามที่เก็บจาก จ. กาฬสินธุ์ ในรอบแรกที่เก็บตัวอย่าง นับจำนวนเชื้อในสถานะที่มีออกซิเจนในอาหารแข็งนิวเตรียนท์ ได้อยู่ในช่วง 1.2×10^6 - 7.7×10^7 cfu/g ของน้ำหมักลำไ้ และในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM มีค่าอยู่ในช่วง 5.0×10^5 - 4.2×10^7 cfu/g ของน้ำหมักลำไ้ (ภาพที่ 14) ในสถานะที่ไม่มีออกซิเจนนับจำนวนเชื้อในอาหารแข็งนิวเตรียนท์ได้ 4.3×10^6 - 6.9×10^7 cfu/g ของน้ำหมักลำไ้ และในอาหาร YM นับได้ 3.7×10^5 - 5.0×10^7 cfu/g ของน้ำหมักลำไ้ (ภาพที่ 15) ในรอบที่ 2 ของการเก็บตัวอย่างใน จ. กาฬสินธุ์ พบจำนวนเชื้อที่นับได้ทั้งหมดในสถานะที่มีออกซิเจนของอาหารเลี้ยงเชื้อ NA medium อยู่ในช่วง 1.6×10^7 - 3.3×10^7 cfu/g ของน้ำหมักลำไ้ และในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM นับได้ 1.2×10^6 - 2.0×10^7 cfu/g ของน้ำหมักลำไ้ (ภาพที่ 16) และในสถานะที่ไม่มีออกซิเจนนับจำนวนเชื้อในอาหารแข็งนิวเตรียนท์ได้ 1.1×10^7 - 2.3×10^7 cfu/g ของน้ำหมักลำไ้ และในอาหาร YM นับได้ 9.6×10^5 - 1.9×10^7 cfu/g ของน้ำหมักลำไ้ (ภาพที่ 17) แต่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA medium ซึ่งจะใช้เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์จำพวกยีสต์และรา พบว่าตลอดทั้งระยะเวลาของการทดลองจะไม่พบเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อจากการเก็บตัวอย่างกึ่งก้ามกรามทั้งใน จ. ขอนแก่น และ จ. กาฬสินธุ์ เลย

ปริมาณเชื้อ ($\times 10^6$ cfu/g)



ภาพที่ 12 แสดงปริมาณเชื้อทั้งหมดที่นับได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ NA และ YM ในสถานะที่มีออกซิเจนจากลำไ้กึ่งก้ามกรามในบ่อเพาะเลี้ยงของเกษตรกร จ. ขอนแก่น

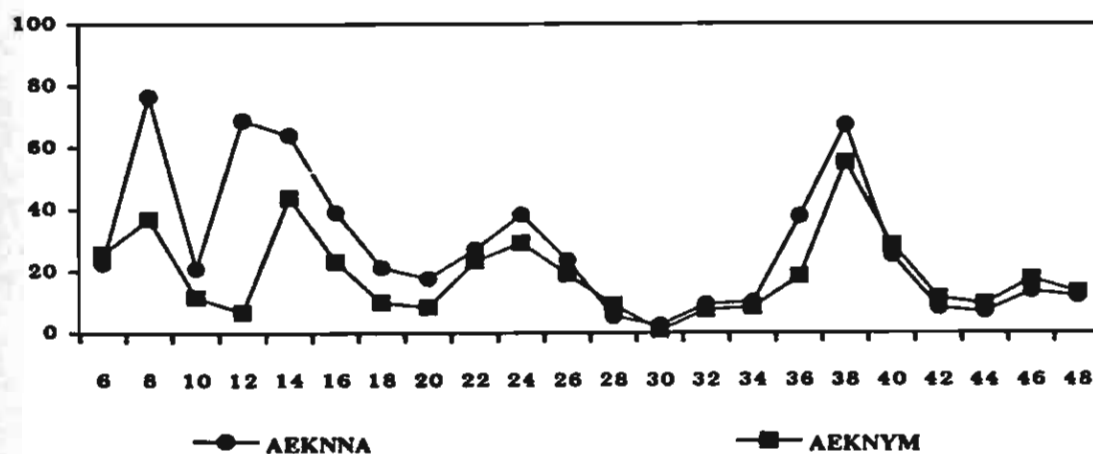
ปริมาณเชื้อ ($\times 10^6$ cfu/g)



อายุ (สัปดาห์)

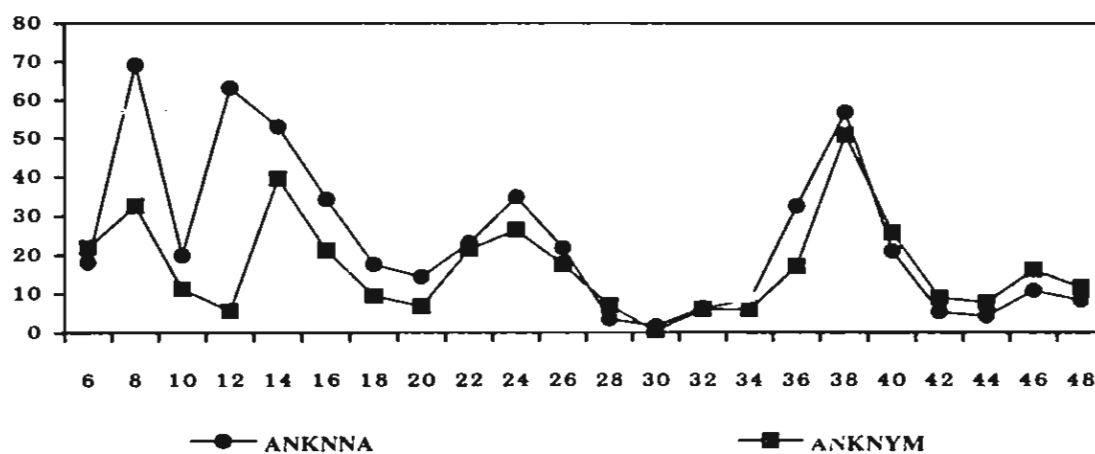
ภาพที่ 13 แสดงปริมาณเชื้อทั้งหมดที่นับได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ NA และ YM ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน จากลำไส้กึ่งกัมกรามในบ่อเพาะเลี้ยงของเกษตรกร จ. ขอนแก่น

ปริมาณเชื้อ ($\times 10^6$ cfu/g)



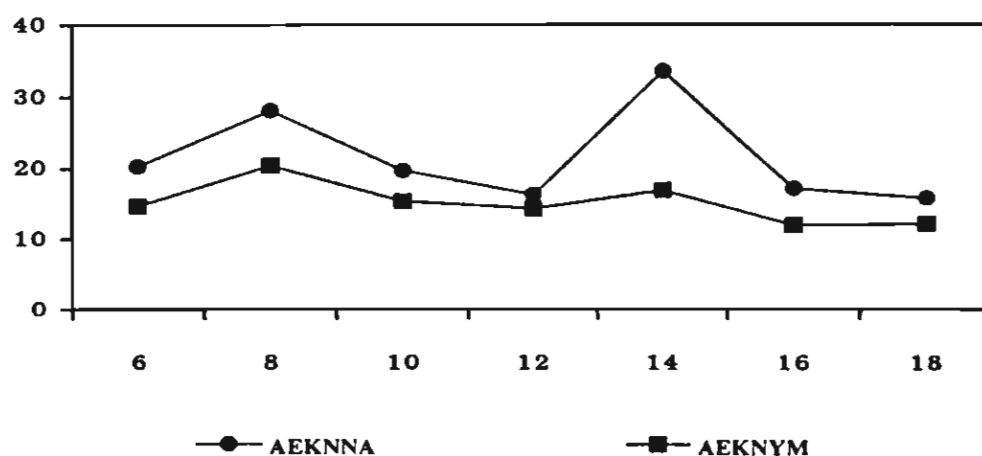
อายุ (สัปดาห์)

ภาพที่ 14 แสดงปริมาณเชื้อทั้งหมดที่นับได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ NA และ YM ในสภาวะที่มีออกซิเจน ครั้งที่ 1 จากลำไส้กึ่งกัมกรามในบ่อเพาะเลี้ยงของเกษตรกร จ. กาฬสินธุ์

ปริมาณเชื้อ ($\times 10^6$ cfu/g)

อายุ (สัปดาห์)

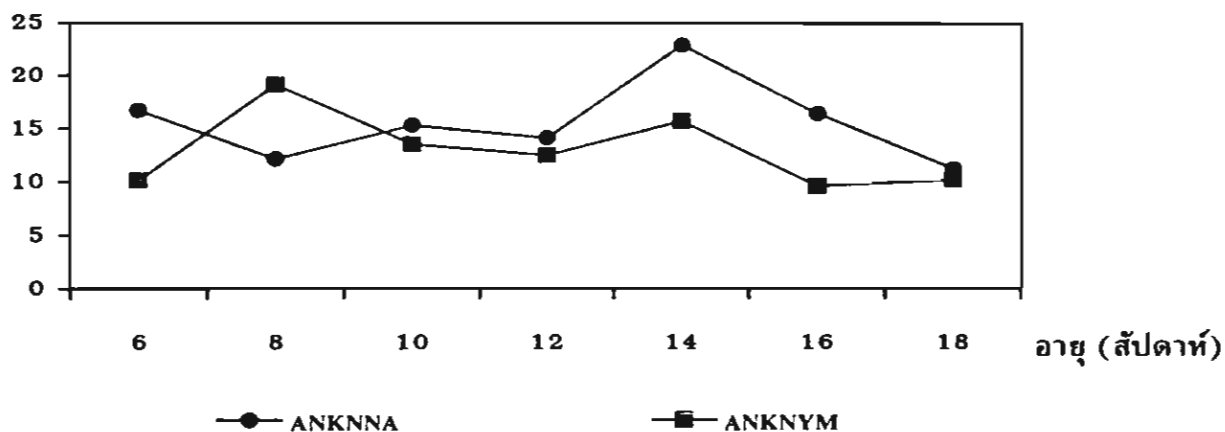
ภาพที่ 15 แสดงปริมาณเชื้อทั้งหมดที่นับได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ NA และ YM ในสถานะที่ไม่มีออกซิเจน ครั้งที่ 1 จากลำไส้กึ่งกัมกรามในบ่อเพาะเลี้ยงของเกษตรกร จ. กาฬสินธุ์

ปริมาณเชื้อ ($\times 10^6$ cfu/g)

อายุ (สัปดาห์)

ภาพที่ 16 แสดงปริมาณเชื้อทั้งหมดที่นับได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ NA และ YM ในสถานะที่มีออกซิเจน ครั้งที่ 2 จากลำไส้กึ่งกัมกรามในบ่อเพาะเลี้ยงของเกษตรกร จ. กาฬสินธุ์

ปริมาณเชื้อ ($\times 10^6$ cfu/g)



ภาพที่ 17 แสดงปริมาณเชื้อทั้งหมดที่นับได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ NA และ YM ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ครั้งที่ 2 จากลำไส้กึ่งกัมกรามในบ่อเพาะเลี้ยงของเกษตรกร จ. กาฬสินธุ์

เมื่อนำเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดมาทำการจำแนกชนิดโดยอาศัยลักษณะการเจริญและรูปร่าง รวมไปถึงลักษณะทางชีววิทยาและชีวเคมีพบว่า เชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากลำไส้ของตัวอย่างกึ่งกัมกรามจาก จ. ขอนแก่น และ จ. กาฬสินธุ์ เป็นเชื้อชนิดเดียวกันและมีลักษณะเหมือนกันทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA และ YM รวมไปถึงเป็นเชื้อชนิดเดียวกันถึงแม้จะทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ต่างกันก็ตาม ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดมี 3 ชนิดด้วยกัน ได้แก่ เชื้อ *Bacillus*, *Staphylococcus* และ *Pseudomonas* เมื่อทำการทดสอบสมบัติ รูปร่างเพื่อนำมาจัดจำแนกสปีชีส์โดยยึดหลักการจัดจำแนกตาม Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Sneath และคณะ, 1986) พบว่าในสกุลของ *Bacillus* จะพบเชื้อทั้งหมด 3 สปีชีส์ด้วยกัน คือ *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* และ *Bacillus megaterium* ในส่วนของเชื้อ *Staphylococcus* พบเชื้อจำนวน 1 สปีชีส์ กล่าวคือ *Staphylococcus aureus* เท่านั้น และในส่วนของเชื้อ *Pseudomonas* ก็พบเพียง 1 สปีชีส์ คือ *Pseudomonas aeruginosa* (ตารางที่ 14) โดยที่เชื้อ *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* และ *Pseudomonas aeruginosa* จะพบตั้งแต่เริ่มการเพาะเลี้ยงกึ่งกัมกราม ในการเพาะเลี้ยงทั้ง 2 พื้นที่ แต่สำหรับเชื้อ *Bacillus subtilis* และ *Bacillus megaterium* จะพบในบ่อเพาะเลี้ยงกึ่งกัมกรามของเกษตรกร จ. กาฬสินธุ์ ในช่วงเดือนเมษายน 2544 ถึง เดือนกรกฎาคม 2544 ซึ่งเป็นบ่อที่เกษตรกรได้เริ่มต้นของการเพาะเลี้ยงกึ่งกัมกรามอีกครั้งหนึ่ง

ตารางที่ 14 แสดงลักษณะการเจริญและการทดสอบทางชีวเคมีของ *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *B. megaterium*, *Staphylococcus aureus* และ *Pseudomonas aeruginosa* ที่แยกได้จากลำไส้ของตัวอย่างกุ้งก้ามกรามจาก จ. ขอนแก่น และ จ. กาฬสินธุ์

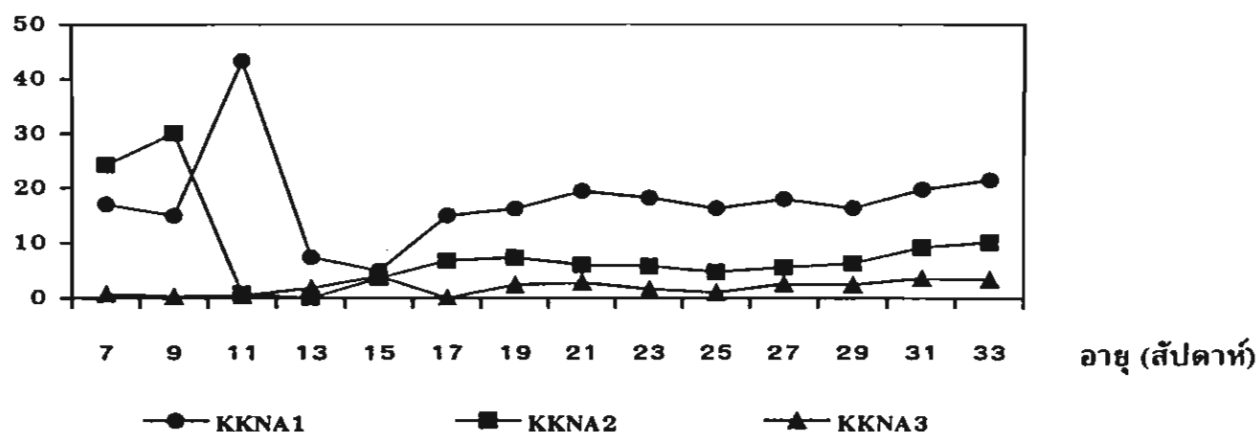
ลักษณะที่ทดสอบ	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Gram's stain	+	+	+	+	-
Motility	V	V	+	-	+
Coagulase	NA	NA	NA	+	NA
Catalase	+	+	+	+	
Gelatin hydrolysis	+	+	+	+	+
Hydrogen sulfide	NA	NA	NA	+	+
Indole	-	-	-	-	-
Voges-Proskauer	+	-	+	NA	NA
Citrate	+	+	+	+	NA
Nitrate reduction	+	-	+	+	+
TSI	-	-	-	-	+
Glucose	A	A	A	A	-
Sucrose	A	A	A	A	-
Maltose	A	A	NA	A	-
Xylose	-	A	A	NA	-
Mannitol	-	A	A	NA	-
Lactose	V	V	V	A	-

หมายเหตุ A = Acid V = Variable NA = None Analysis
 + = Positive - = Negative or no change

เมื่อทำการตรวจสอบจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดโดยวิธีการเทเพลท (Pour plate technique) เพื่อบันทึกจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ พบว่า เชื้อจุลินทรีย์ชนิด *Staphylococcus aureus* จะมีจำนวนมากที่สุดตลอดทั้งระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงในทั้ง 2 พื้นที่ ในส่วนของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* และ *Bacillus cereus* จะมีจำนวนรองลงมาตามลำดับ ซึ่งในลำไส้ของกิ้งก่ามกรามในบ่อเพาะเลี้ยงของ จ. ขอนแก่น พบว่ามีจำนวนเชื้อ *Staphylococcus aureus* อยู่ระหว่าง 1.8×10^7 - 2.4×10^7 cfu/g ของน้ำหมักลำไส้ ส่วนเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* และ *Bacillus cereus* จะมีจำนวนเชื้อ 8.5×10^6 - 9.3×10^6 cfu/g ของน้ำหมักลำไส้ และ 2.3×10^6 - 2.6×10^6 cfu/g ของน้ำหมักลำไส้ ตามลำดับ (ภาพที่ 18) ส่วนการเพาะเลี้ยงกิ้งก่ามกรามในเขต จ. กาฬสินธุ์ มีจำนวนเชื้อ *Staphylococcus aureus* อยู่ระหว่าง 1.0×10^7 - 1.4×10^7 cfu/g ของน้ำหมักลำไส้ และเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* เท่ากับ 7.2×10^6 - 1.1×10^7 cfu/g ของน้ำหมักลำไส้ และจำนวนของเชื้อ *Bacillus cereus* จะพบมีจำนวนเชื้ออยู่ระหว่าง 1.6×10^6 - 1.9×10^6 cfu/g ของน้ำหมักลำไส้ ตามลำดับ (ภาพที่ 19)

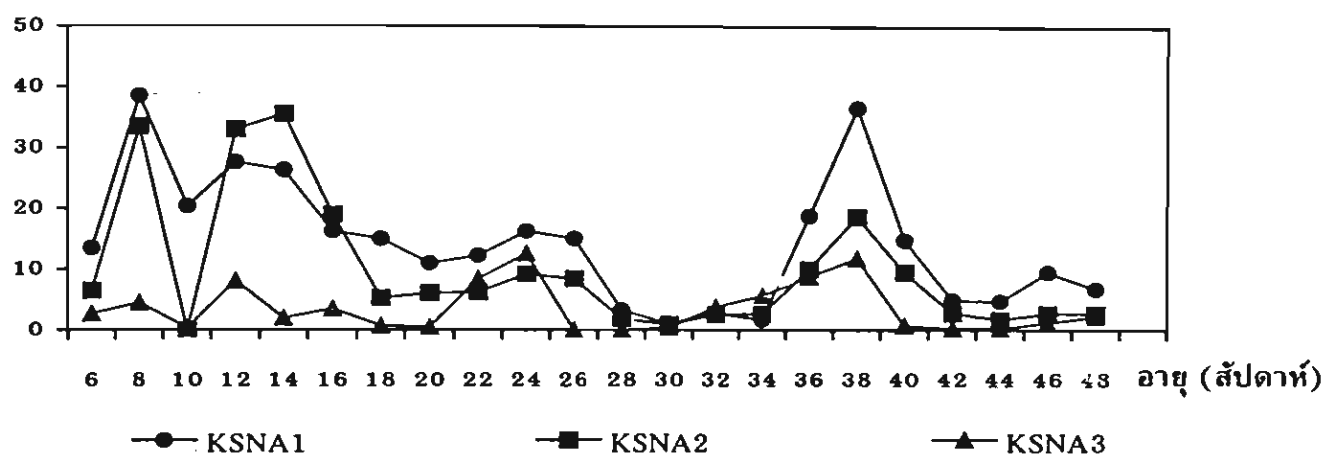
ในขณะที่เชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* และ *Bacillus megaterium* เริ่มพบในบ่อเพาะเลี้ยงกิ้งก่ามกรามของเกษตรกร จ. กาฬสินธุ์ ซึ่งเป็นบ่อที่เริ่มต้นการเพาะเลี้ยงรอบใหม่โดยทำการเริ่มเพาะเลี้ยงในช่วงเดือนเมษายน ปริมาณของเชื้อทั้ง 2 ชนิดเริ่มพบในปริมาณที่น้อย คือ พบเชื้อ *Bacillus subtilis* อยู่ประมาณ 1.7×10^6 cfu/g ของน้ำหมักลำไส้ และจำนวนเชื้อ *Bacillus megaterium* เท่ากับ 0.9×10^6 - 1.1×10^6 cfu/g ของน้ำหมักลำไส้ ตามลำดับ (ภาพที่ 20)

จำนวนเชื้อ ($\times 10^6$ cfu/g)



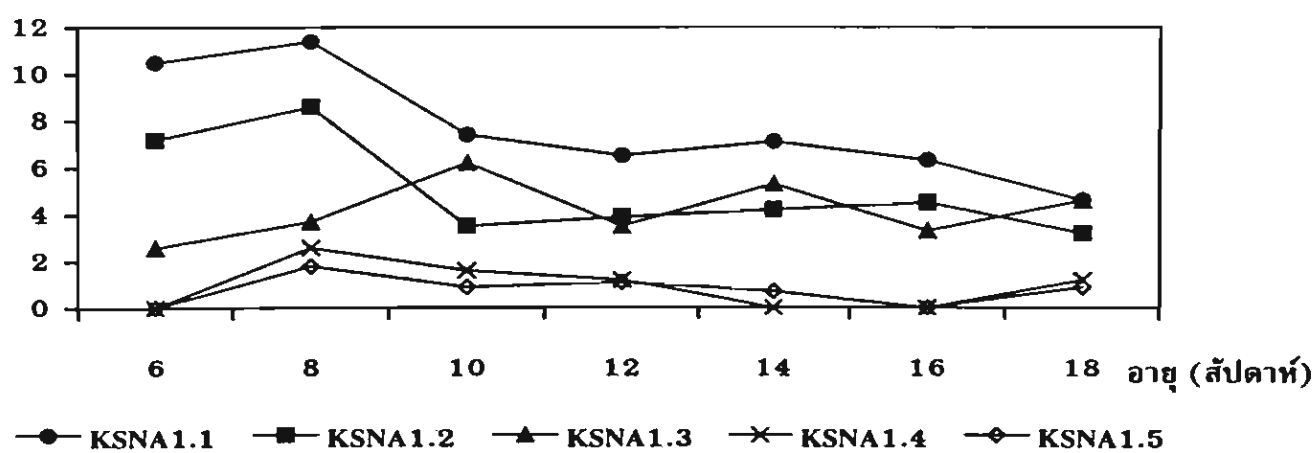
ภาพที่ 18 แสดงจำนวนเชื้อที่นับได้จากลำไส้กิ้งก่ามกราม ในบ่อเพาะเลี้ยง จ. ขอนแก่น ซึ่งประกอบไปด้วย *Staphylococcus aureus* (KKNA1), *Pseudomonas aeruginosa* (KKNA2) และ *Bacillus cereus* (KKNA3)

จำนวนเชื้อ ($\times 10^6$ cfu/g)



ภาพที่ 19 แสดงจำนวนเชื้อที่นับได้จากลำไส้กึ่งกัมกราม ในบ่อเพาะเลี้ยง จ. กาฬสินธุ์ ครั้งที่ 1 ประกอบไปด้วย *Staphylococcus aureus* (KSNA1), *Pseudomonas aeruginosa* (KSNA2) และ *Bacillus cereus* (KSNA3)

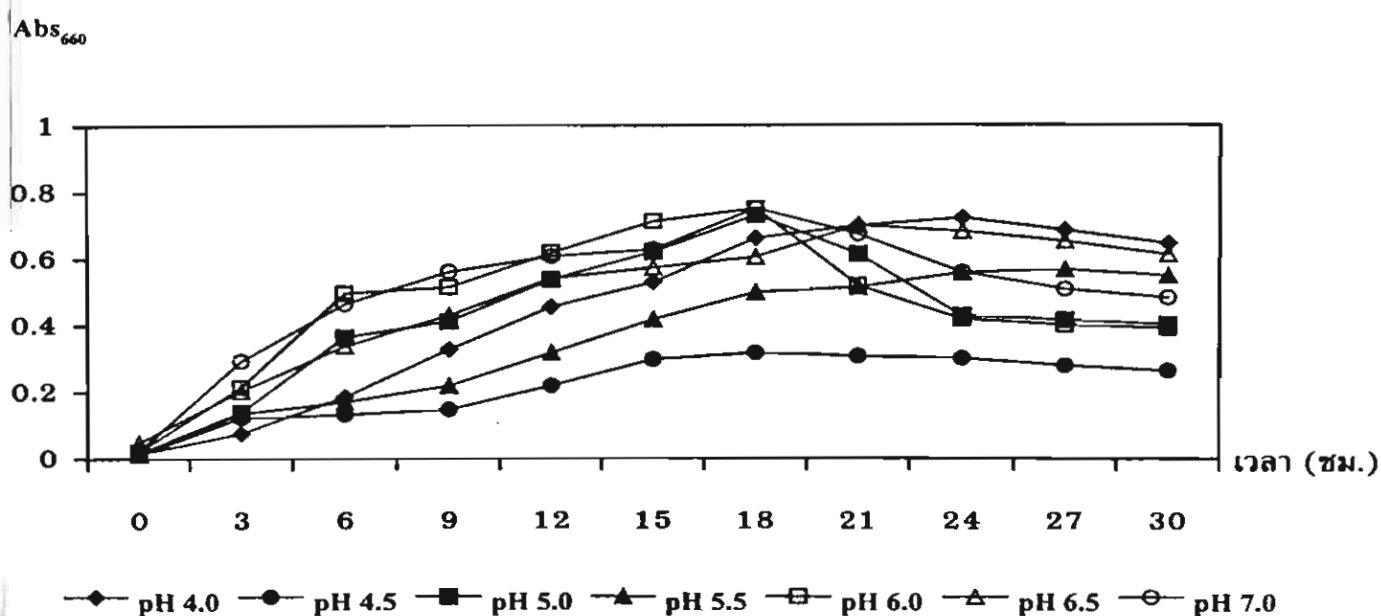
จำนวนเชื้อ ($\times 10^6$ cfu/g)



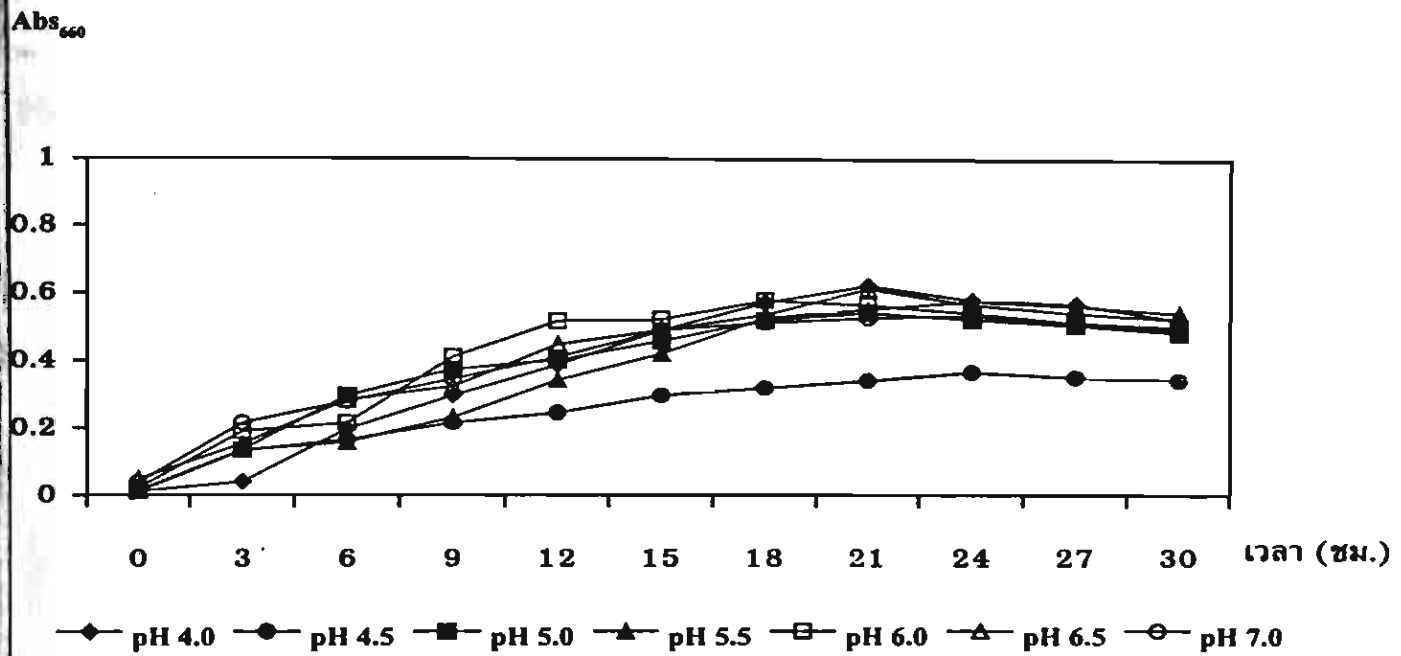
ภาพที่ 20 แสดงจำนวนเชื้อที่นับได้จากลำไส้กึ่งกัมกราม ในบ่อเพาะเลี้ยง จ. กาฬสินธุ์ ครั้งที่ 2 ประกอบไปด้วย *Staphylococcus aureus* (KSNA1.1), *Pseudomonas aeruginosa* (KSNA1.2), *Bacillus cereus* (KSNA1.3), *Bacillus subtilis* (KSNA1.4) และ *Bacillus megaterium* (KSNA1.5)

5.2 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากระบบทางเดินอาหารของกิ้งก่ามกรามเพื่อจะนำมาใช้เป็น โพรไบโอติก

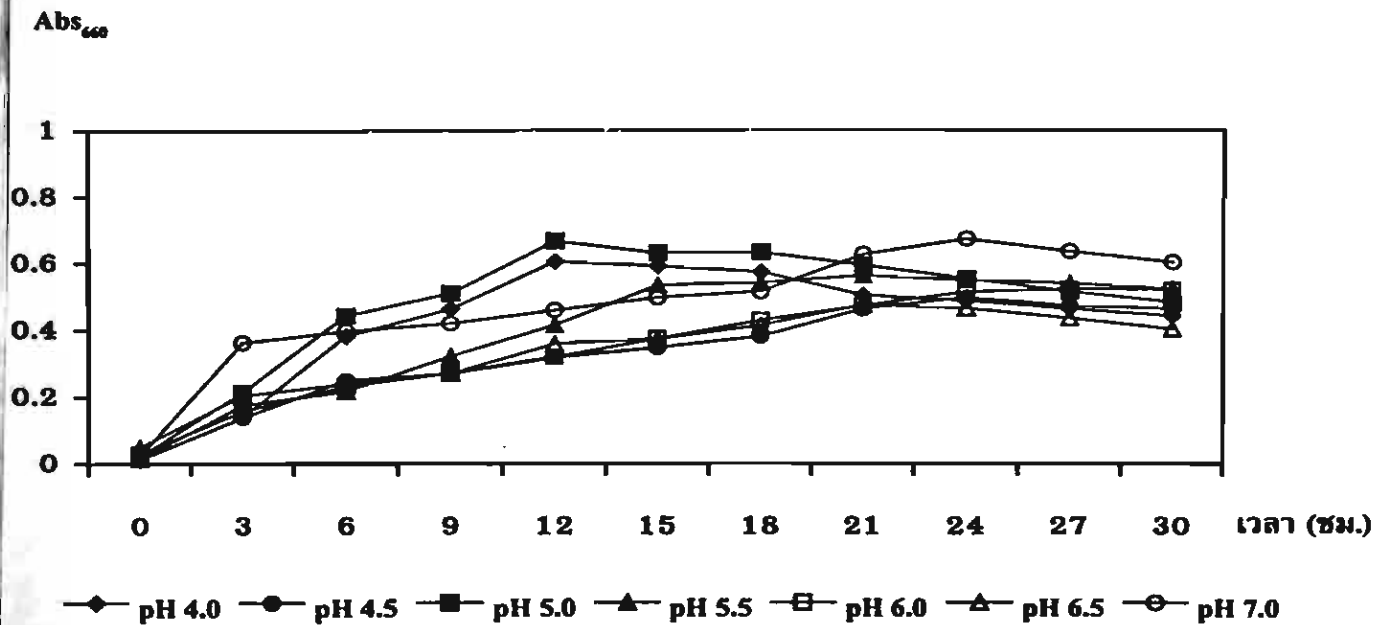
เนื่องจากเชื้อ *Staphylococcus aureus* จัดเป็นเชื้อที่ก่อโรคและพบว่ามีเชื้อชนิดนี้อยู่เป็นจำนวนมากในอาหารเลี้ยงกิ้งก่ามกรามสำเร็จรูปจึงไม่นำมาศึกษาหาคุณสมบัติของเชื้อที่จะใช้เป็นโพรไบโอติก ดังนั้นจึงนำเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* และ *Bacillus megaterium* ที่แยกได้จากลำไส้ของตัวอย่างกิ้งก่ามกรามมาทำการศึกษาสภาวะและปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการเจริญจากการแปรผันอุณหภูมิเป็น 30, 35, 37, 40 และ 42 °ซ และแปรผันค่าพีเอชเท่ากับ 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0 ในสภาวะของการเพาะเลี้ยง จากนั้นเก็บตัวอย่างไปวัดการเจริญเติบโตโดยวัดค่าการดูดกลืนแสง (Abs) ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร พบว่า *Bacillus cereus* ให้อัตราการเจริญสูงสุดที่สภาวะของอุณหภูมิ 30 °ซ และค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ที่ 6.0 โดยระยะเวลาที่ให้อัตราการเจริญเติบโตสูงสุดอยู่ที่ชั่วโมงที่ 18 (ภาพที่ 21) ส่วนเชื้อ *Bacillus megaterium* ให้อัตราการเจริญสูงสุดที่สภาวะของอุณหภูมิ 40 °ซ และค่า pH อยู่ที่ 6.5 ส่วนชั่วโมงที่ให้อัตราการเจริญเติบโตสูงสุดอยู่ที่ 24 (ภาพที่ 29) และ *Bacillus subtilis* ให้อัตราการเจริญเติบโตสูงสุดที่สภาวะของอุณหภูมิ 37 °ซ และค่า pH อยู่ที่ 6.5 ชั่วโมงที่ให้อัตราการเจริญเติบโตสูงสุดอยู่ที่ 18 (ภาพที่ 33) และ ทางด้านเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* จะให้อัตราการเจริญเติบโตสูงสุดที่สภาวะของอุณหภูมิ 42 °ซ และค่า pH อยู่ที่ 6.0 และชั่วโมงที่ให้อัตราการเจริญเติบโตสูงสุดอยู่ที่ 15 (ภาพที่ 40) โดยที่อัตราการเขย่าของทุกสภาวะอยู่ที่ 200 rpm



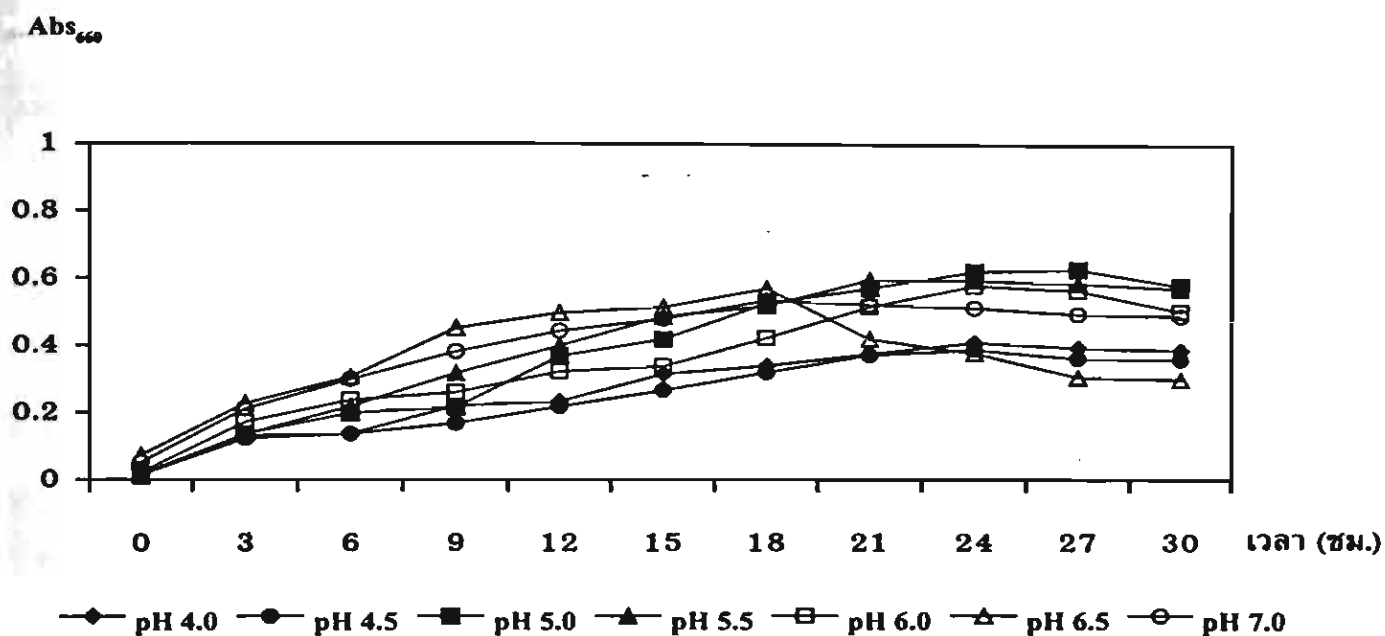
ภาพที่ 21 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bacillus cereus* ที่ อุณหภูมิ 30 °ซ และช่วง pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อระดับต่าง ๆ



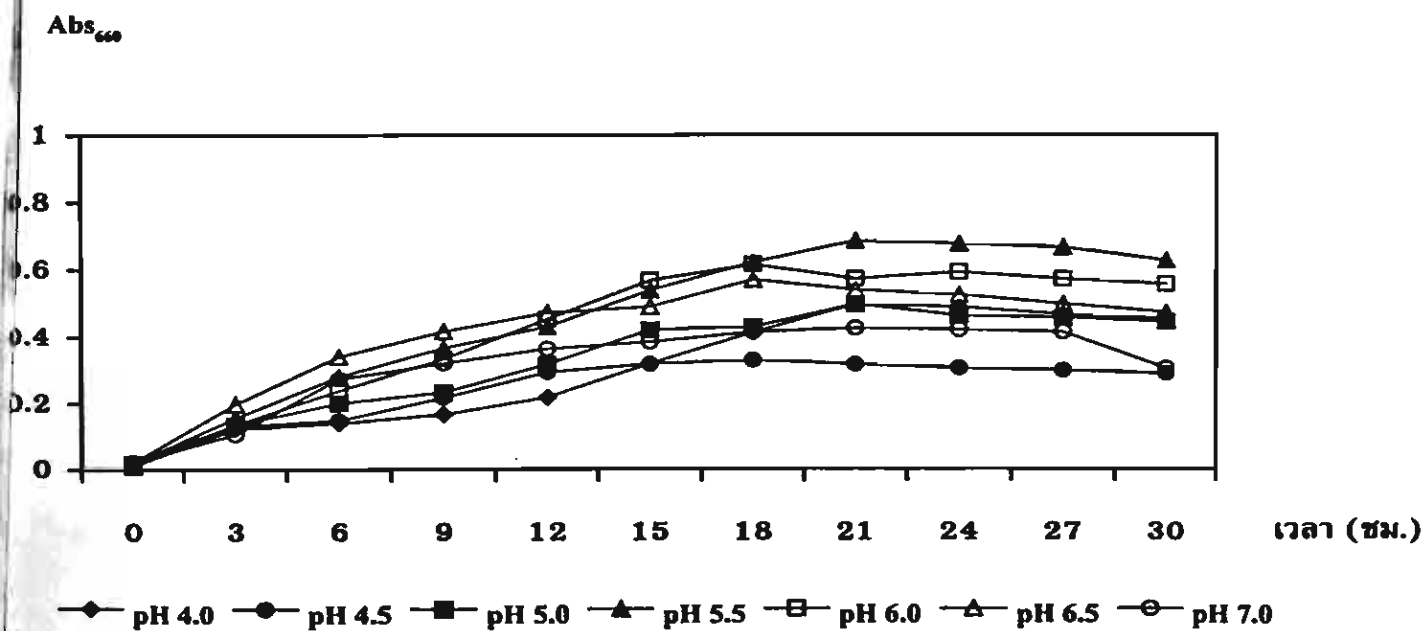
ภาพที่ 22 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bacillus cereus* ที่ อุณหภูมิ 35 °ซ และช่วง pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อระดับต่าง ๆ



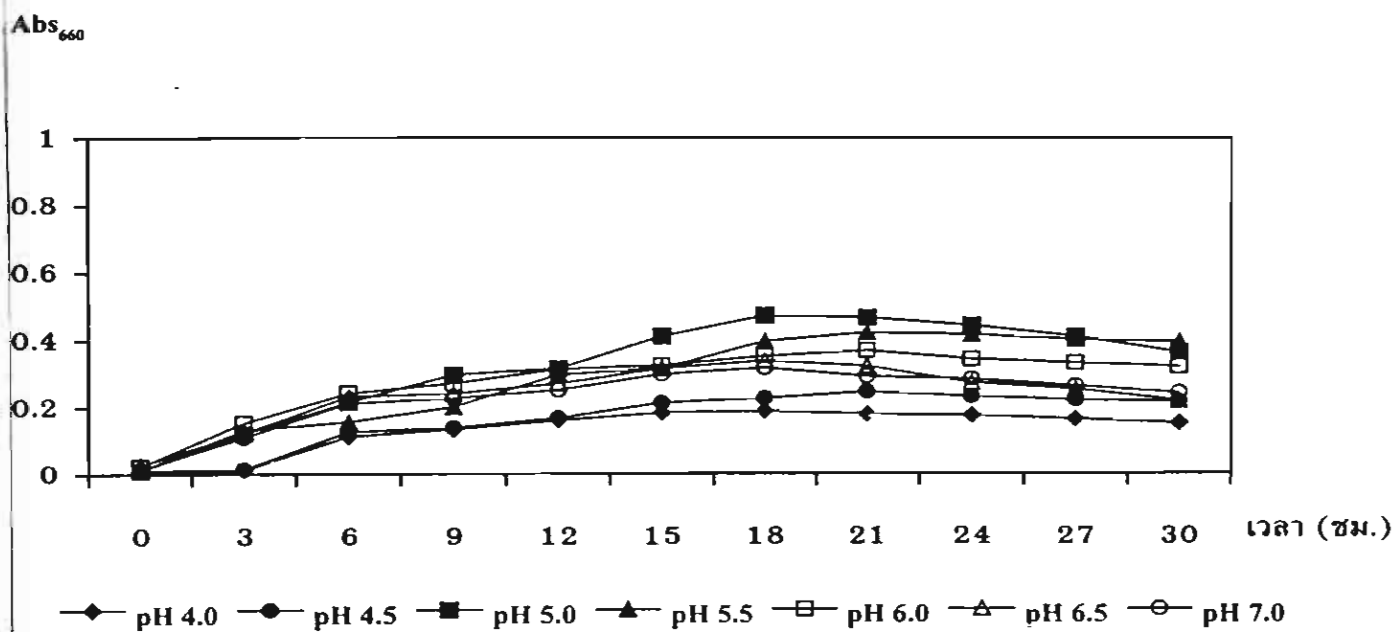
ภาพที่ 23 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bacillus cereus* ที่ อุณหภูมิ 37 °ซ และช่วง pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อระดับต่าง ๆ



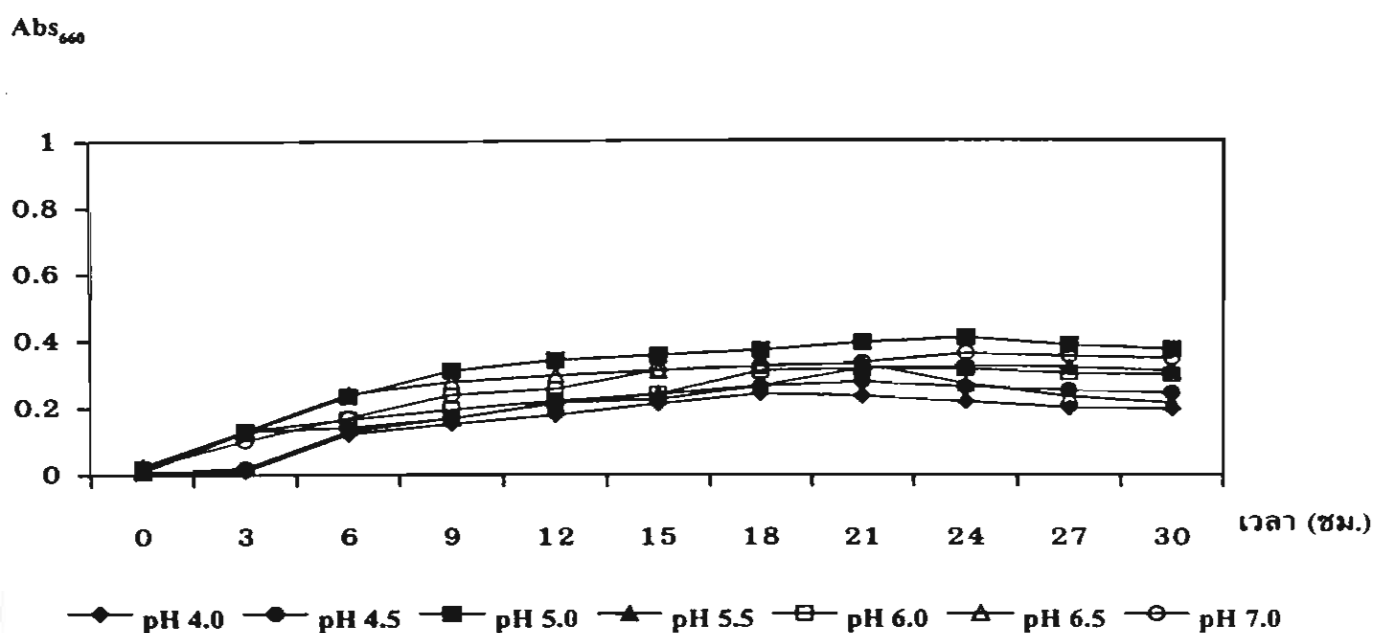
ภาพที่ 24 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bacillus cereus* ที่ อุณหภูมิ 40 °ซ และช่วง pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อระดับต่าง ๆ



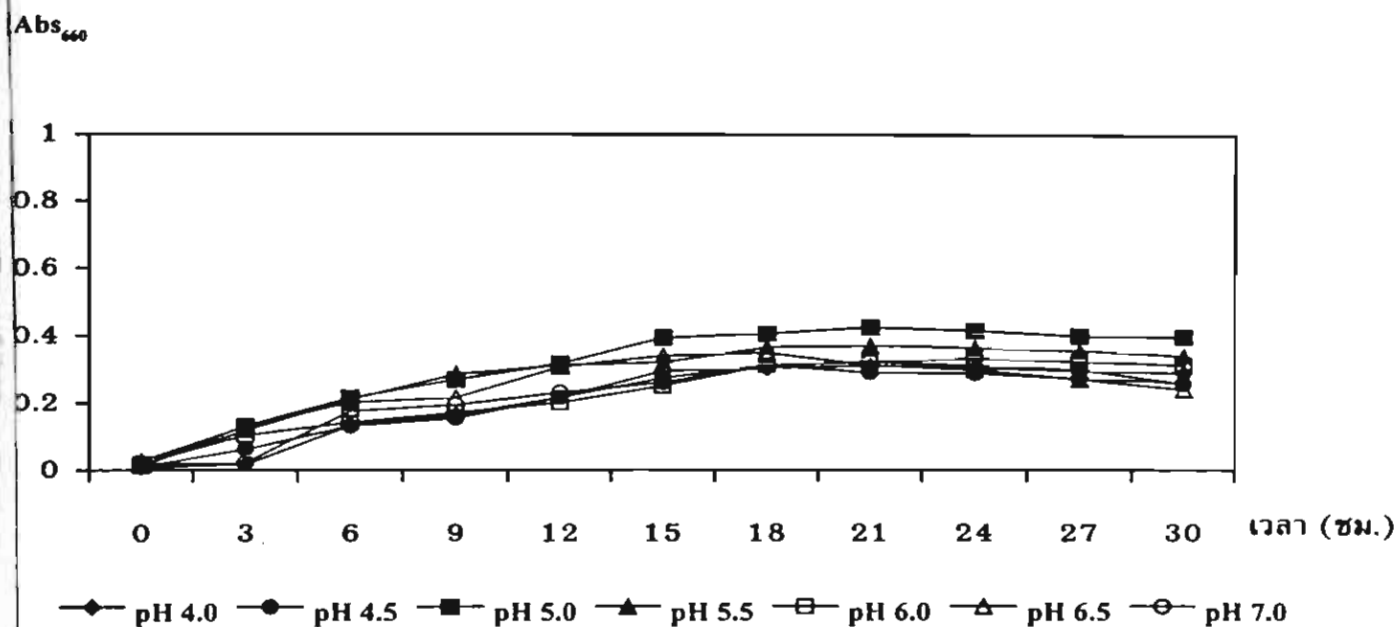
ภาพที่ 25 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bacillus cereus* ที่ อุณหภูมิ 42 °ซ และช่วง pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อระดับต่าง ๆ



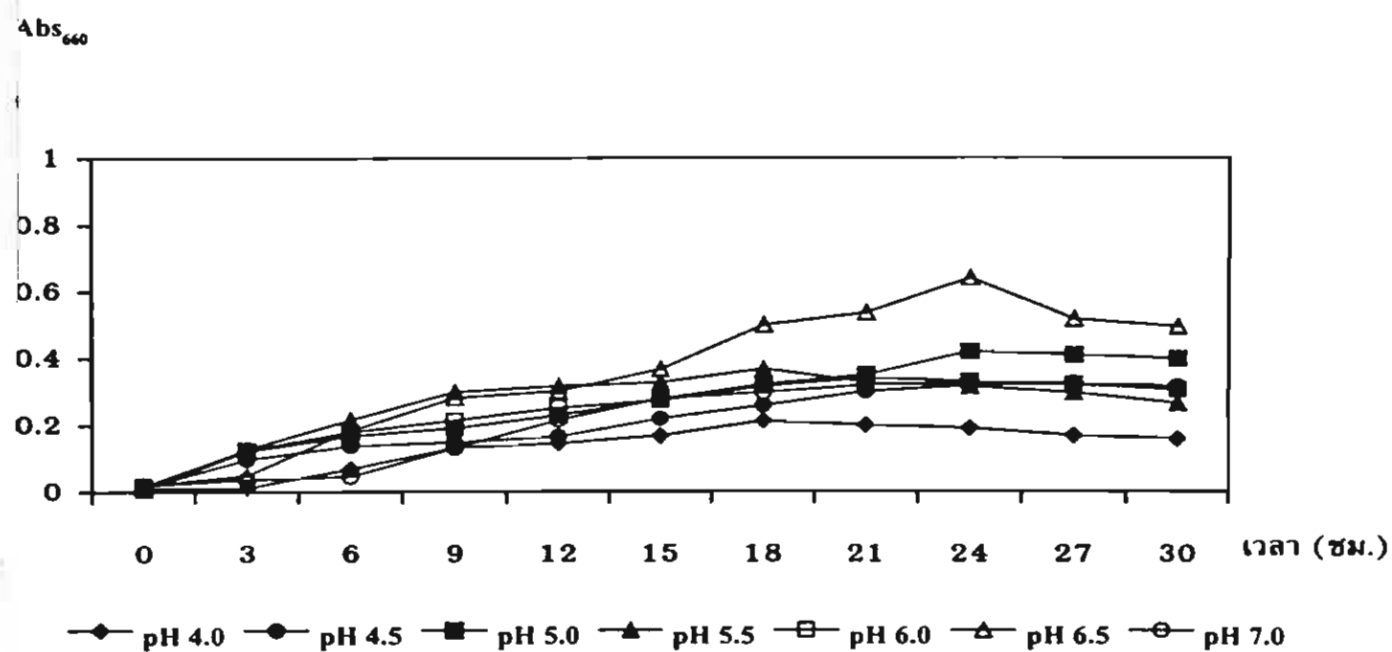
ภาพที่ 26 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bacillus megaterium* ที่ อุณหภูมิ 30 °ซ และช่วง pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อระดับต่าง ๆ



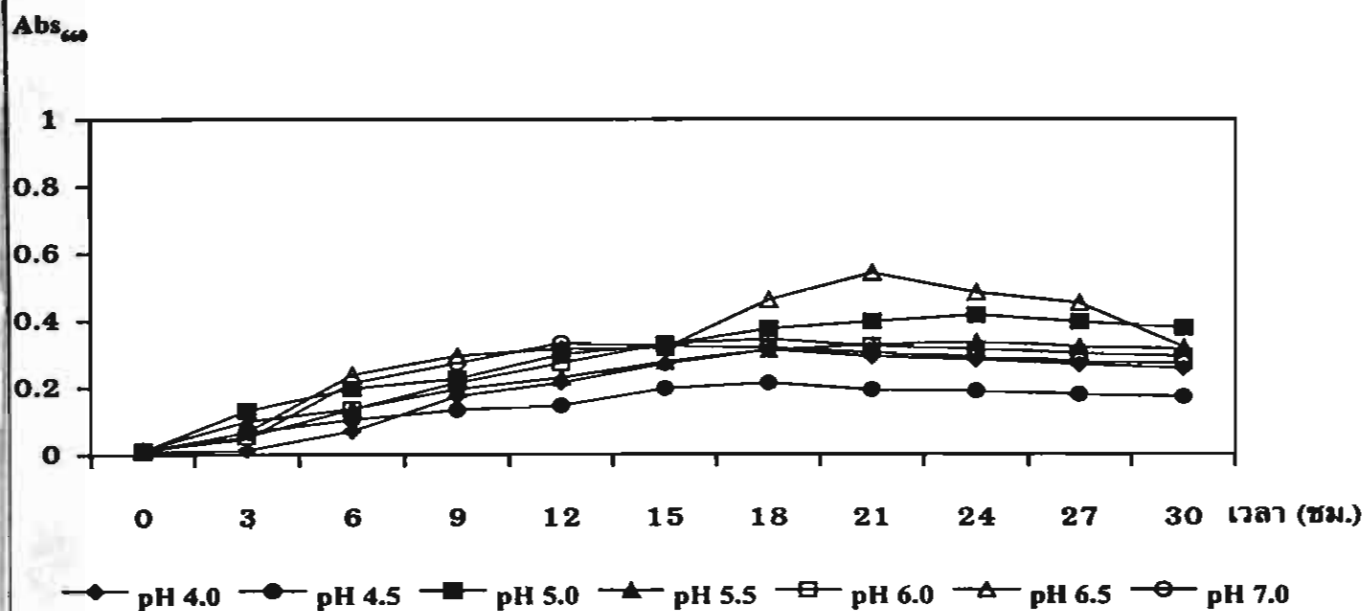
ภาพที่ 27 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bacillus megaterium* ที่ อุณหภูมิ 35 °ซ และช่วง pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อระดับต่าง ๆ



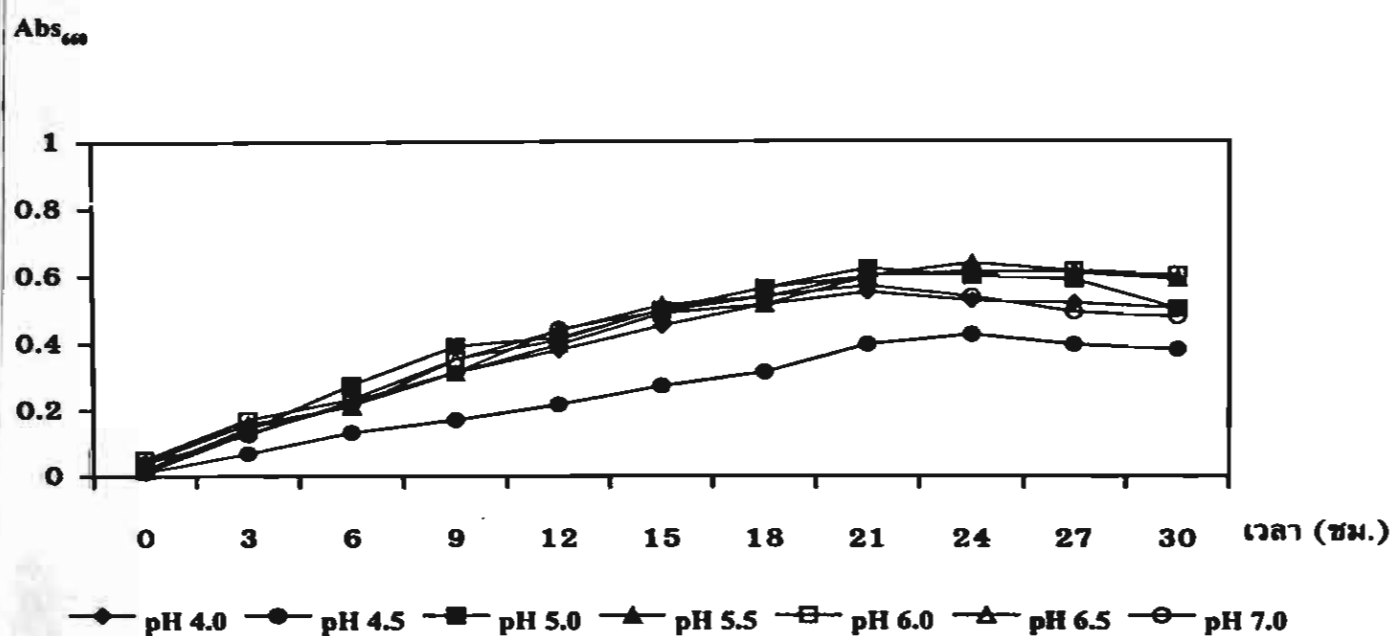
ภาพที่ 28 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bacillus megaterium* ที่ อุณหภูมิ 37 °ซ และช่วง pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อระดับต่าง ๆ



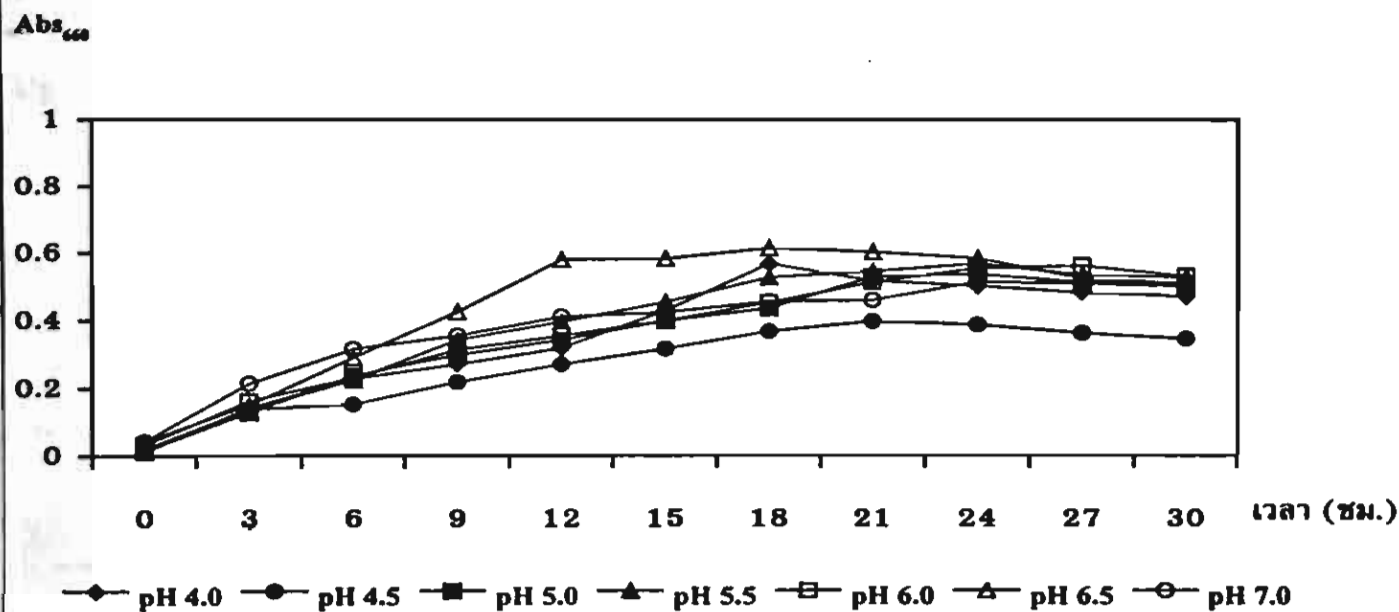
ภาพที่ 29 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bacillus megaterium* ที่ อุณหภูมิ 40 °ซ และช่วง pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อระดับต่าง ๆ



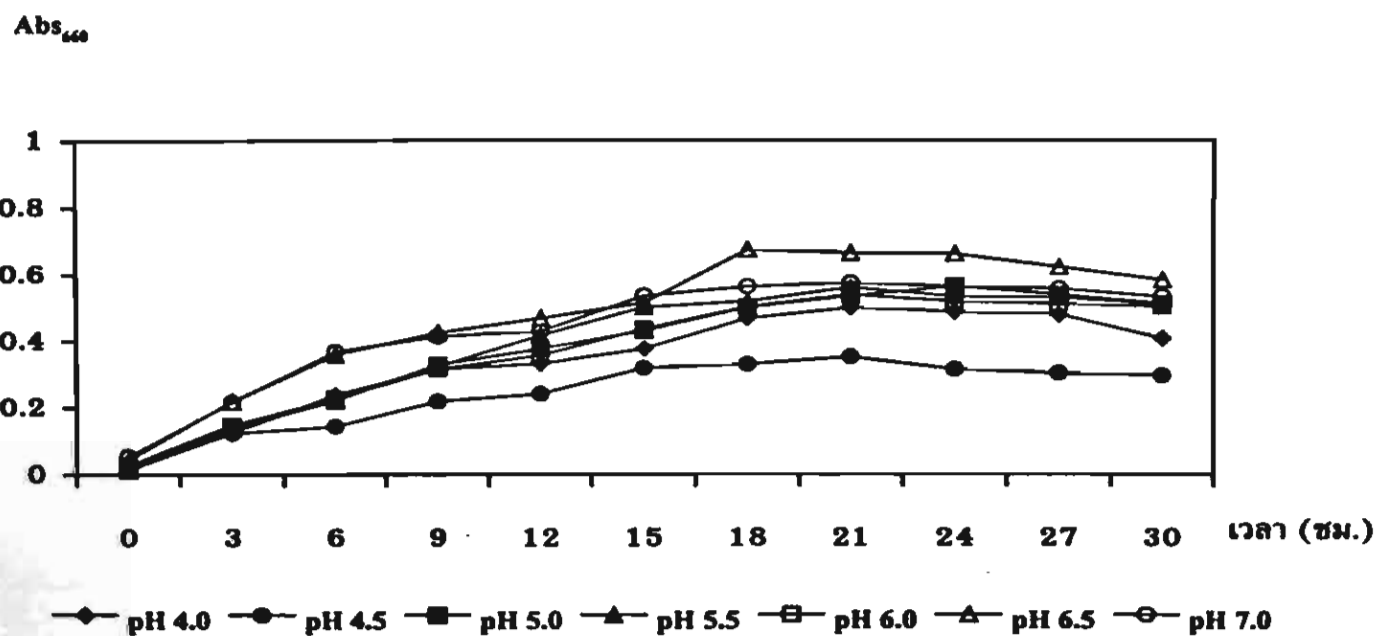
ภาพที่ 30 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bacillus megaterium* ที่ อุณหภูมิ 42 °ซ และช่วง pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อระดับต่าง ๆ



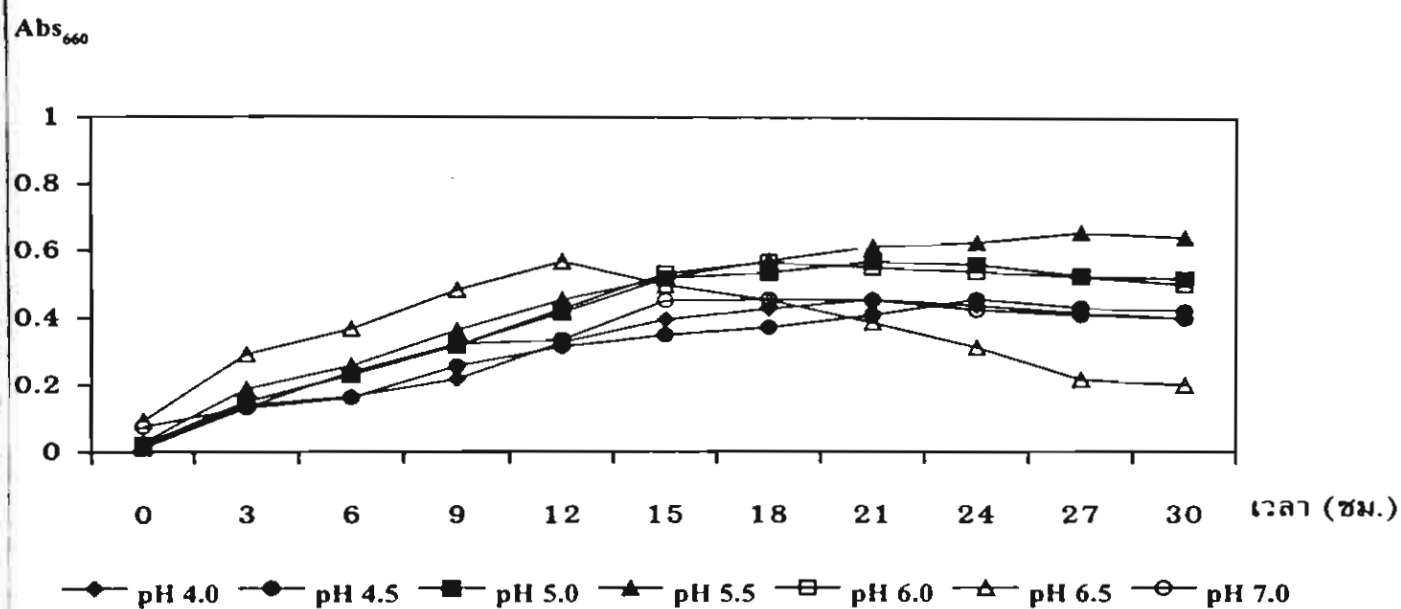
ภาพที่ 31 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bacillus subtilis* ที่ อุณหภูมิ 30 °ซ และช่วง pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อระดับต่าง ๆ



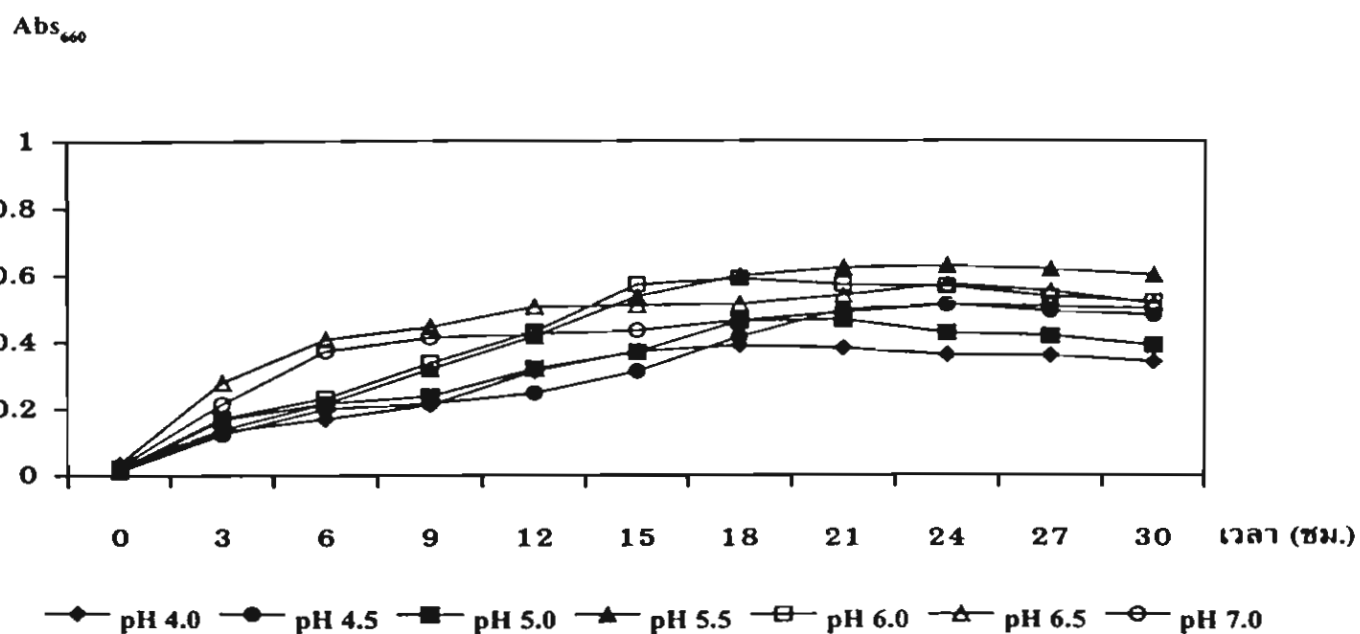
ภาพที่ 32 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bacillus subtilis* ที่ อุณหภูมิ 35 °ซ และช่วง pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อระดับต่าง ๆ



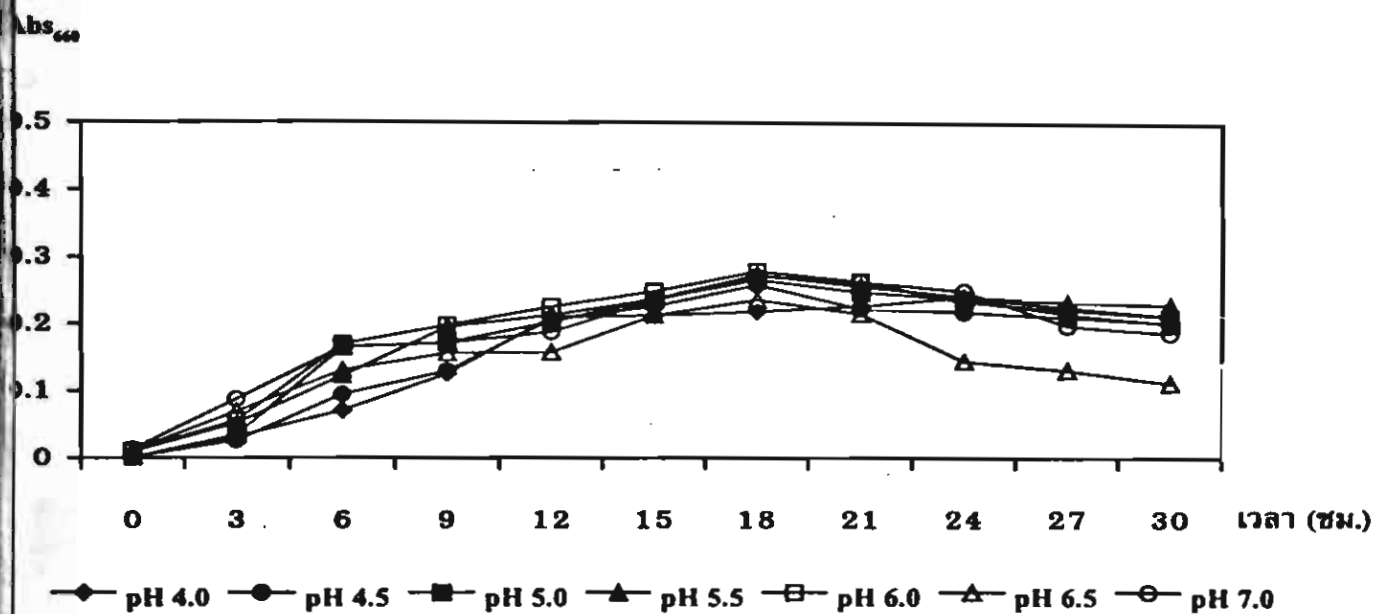
ภาพที่ 33 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bacillus subtilis* ที่ อุณหภูมิ 37 °ซ และช่วง pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อระดับต่าง ๆ



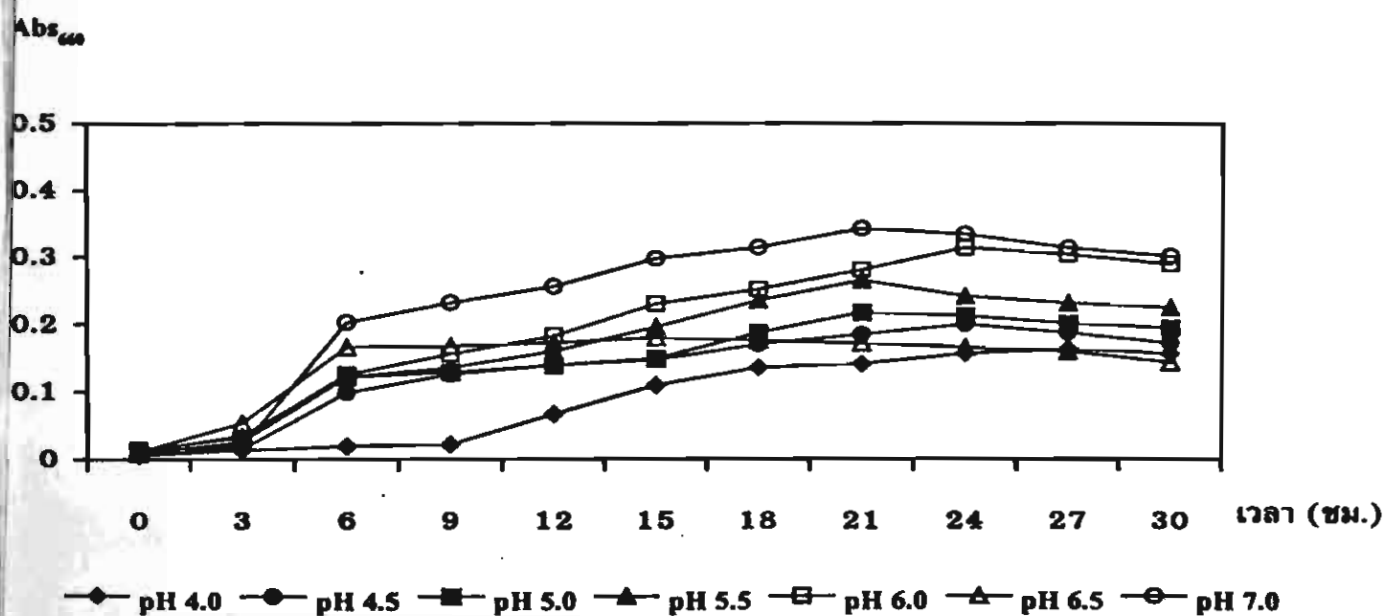
ภาพที่ 34 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bacillus subtilis* ที่ อุณหภูมิ 40 °ซ และช่วง pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อระดับต่าง ๆ



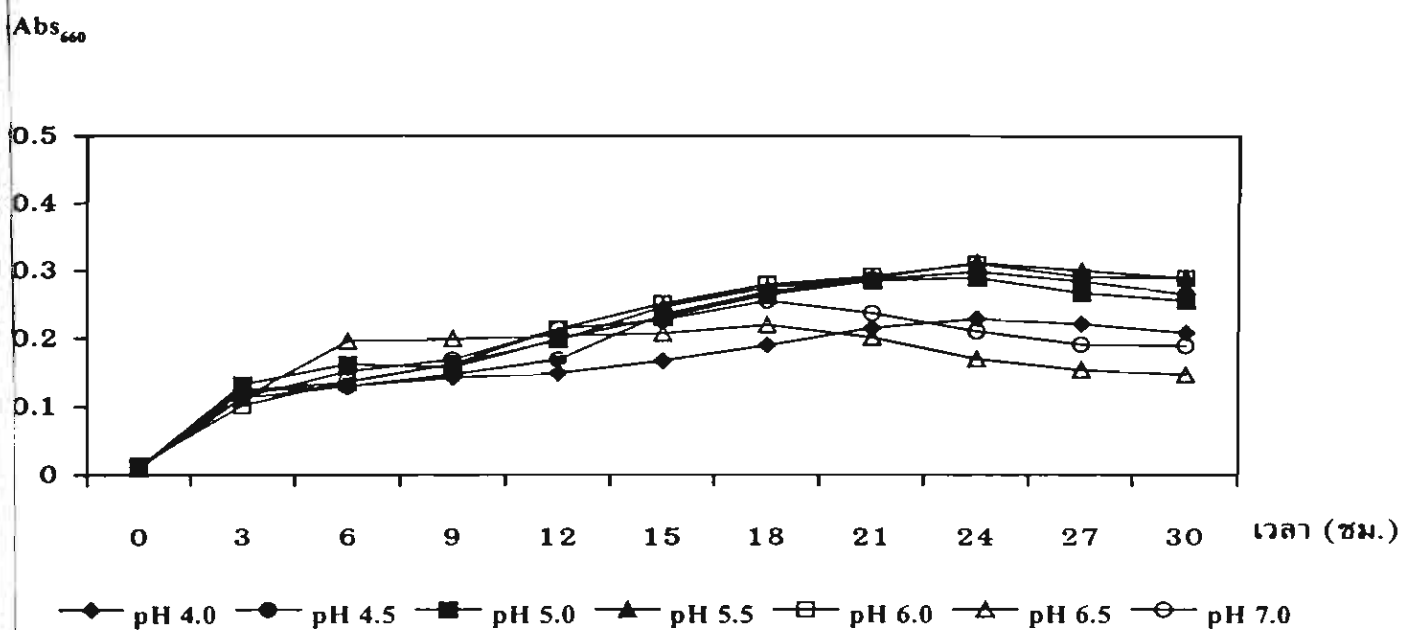
ภาพที่ 35 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bacillus subtilis* ที่ อุณหภูมิ 42 °ซ และช่วง pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อระดับต่าง ๆ



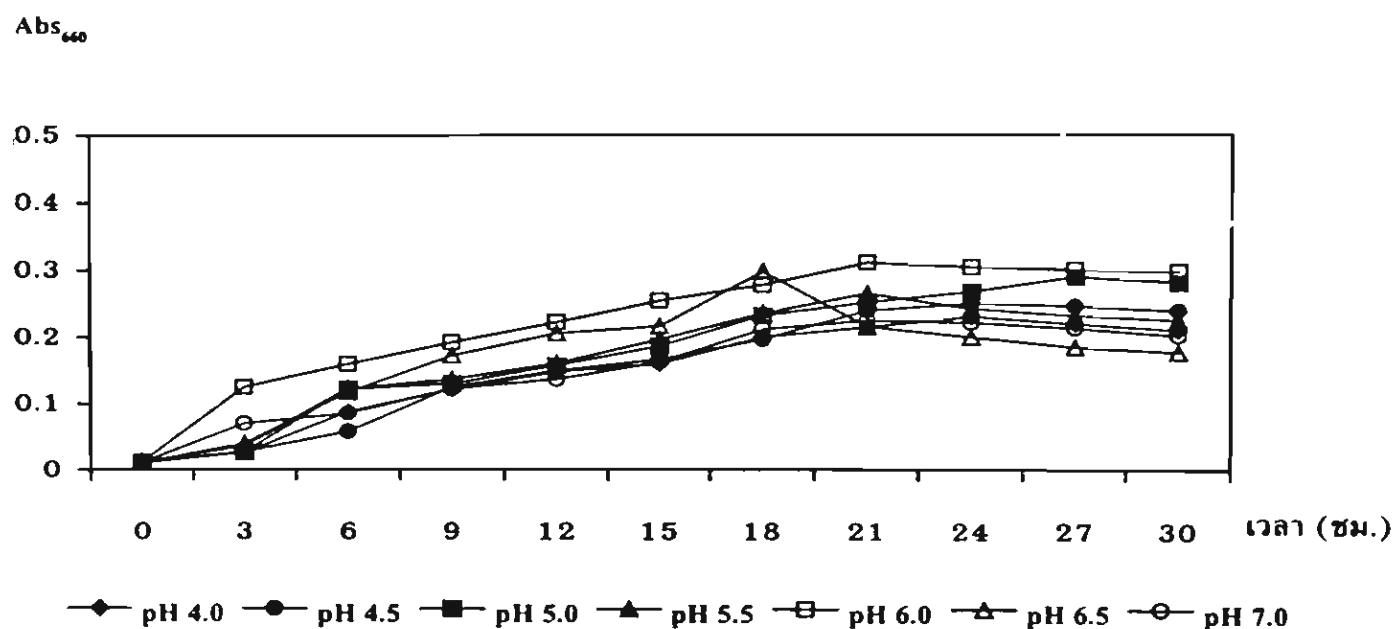
ภาพที่ 36 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ที่ อุณหภูมิ 30 °ซ และช่วง pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อระดับต่าง ๆ



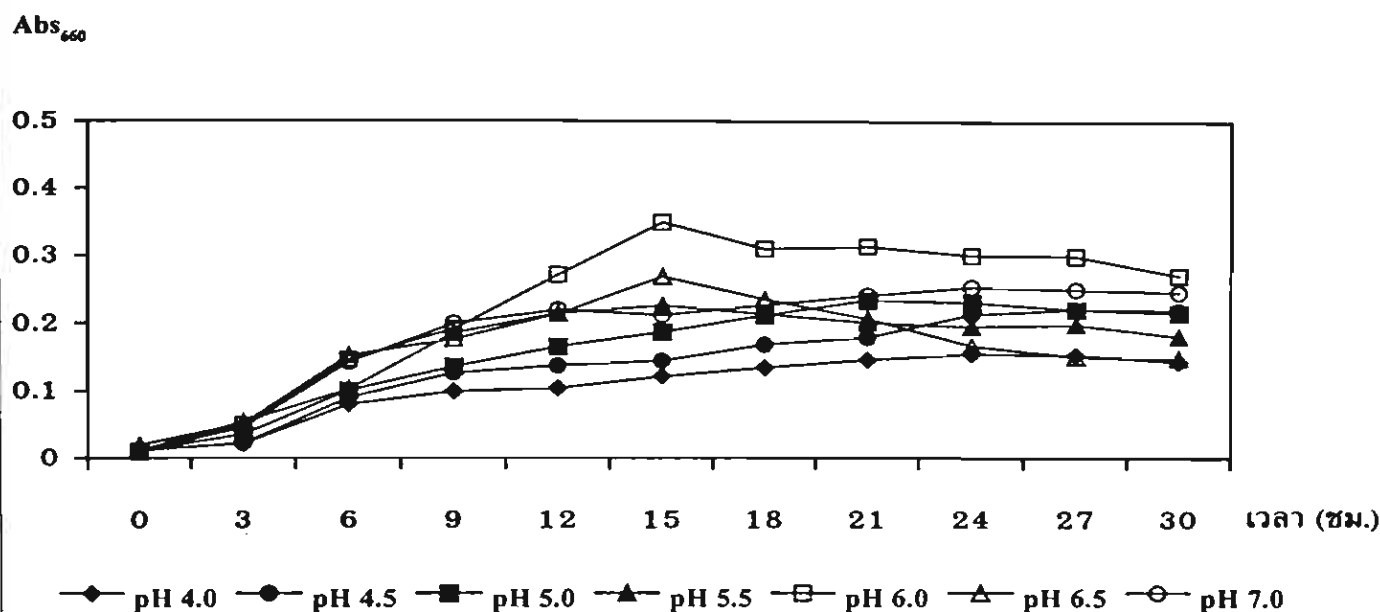
ภาพที่ 37 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ที่ อุณหภูมิ 35 °ซ และช่วง pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อระดับต่าง ๆ



ภาพที่ 38 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ที่ อุณหภูมิ 37 °ซ และช่วง pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อระดับต่าง ๆ



ภาพที่ 39 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ที่ อุณหภูมิ 40 °ซ และช่วง pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อระดับต่าง ๆ



ภาพที่ 40 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ที่ อุณหภูมิ 42 °ซ และช่วง pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อระดับต่าง ๆ

5.3 ผลของการคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรค

5.3.1 ผลของการทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรคในกึ่งก้ามกรามโดยวิธีการซึมผ่านกระดาษกรอง

(Disc diffusion assay)

จากผลการทดลองทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรคในกึ่งก้ามกราม โดยใช้เชื้อ *Aeromonas hydrophila* พบเชื้อเพียงชนิดเดียวที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Aeromonas hydrophila* โดยแสดงให้เห็นบริเวณที่เกิดการยับยั้ง (clear zone) อย่างชัดเจนได้แก่เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* (P.a) (ภาพที่ 41) เมื่อทำการแปรผันความเข้มข้นส่วนน้ำใสของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* (P.a) เป็น 100, 300 และ 500 µl พบว่า ขนาดของบริเวณที่เกิดการยับยั้งจะได้เป็น 2.0, 8.0 และ 12 มม. ตามลำดับ (ภาพที่ 42-44)

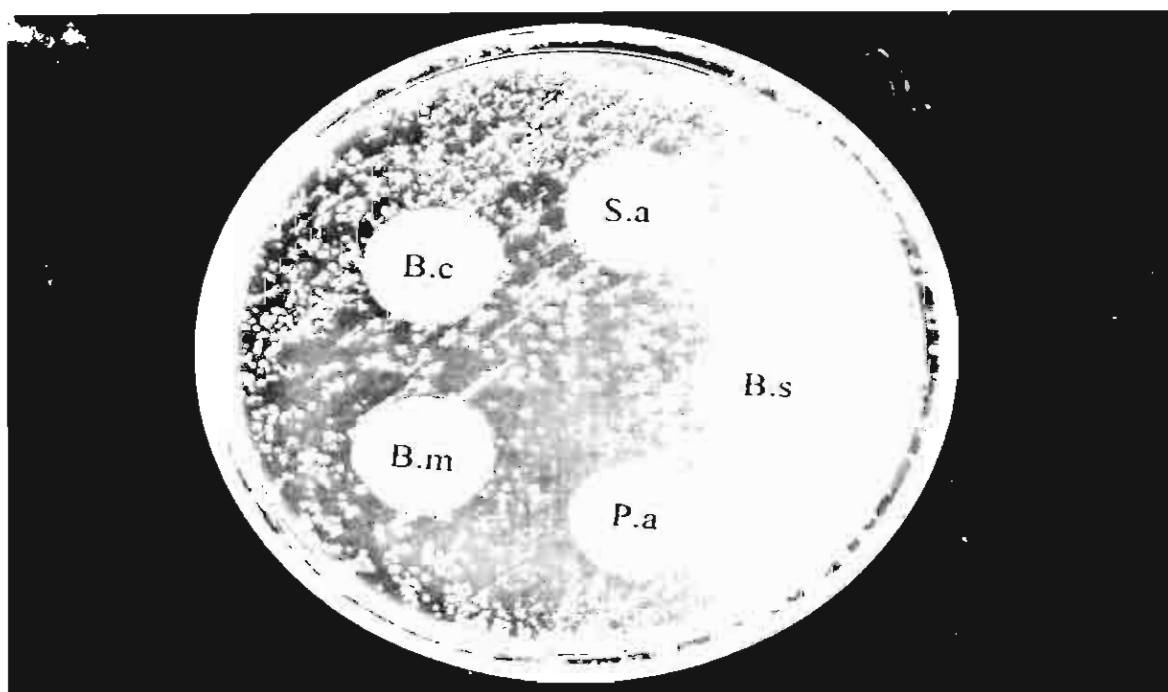
5.3.2 ผลของการศึกษาการยับยั้งเชื้อก่อโรคในกึ่งก้ามกรามทดสอบบนอาหารแข็งโดยวิธีการซึมผ่านวุ้น (Well diffusion assay)

จากผลการทดลอง พบว่ามีเพียงเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* (P.a) เพียงชนิดเดียวที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Aeromonas hydrophila* โดยวิธีการซึมผ่านวุ้นได้และให้สารสีเขียวออกมารอบบริเวณที่เกิดการยับยั้งด้วย (ภาพที่ 45) จากรูปจะเห็นว่าเชื้อ *Bacillus megaterium* (B.m) จะมีบริเวณของการยับยั้งเกิดขึ้นด้วยแต่ทั้งนี้เนื่องมาจากการปนเปื้อนของเซลล์ *Bacillus megaterium* นั้นเอง

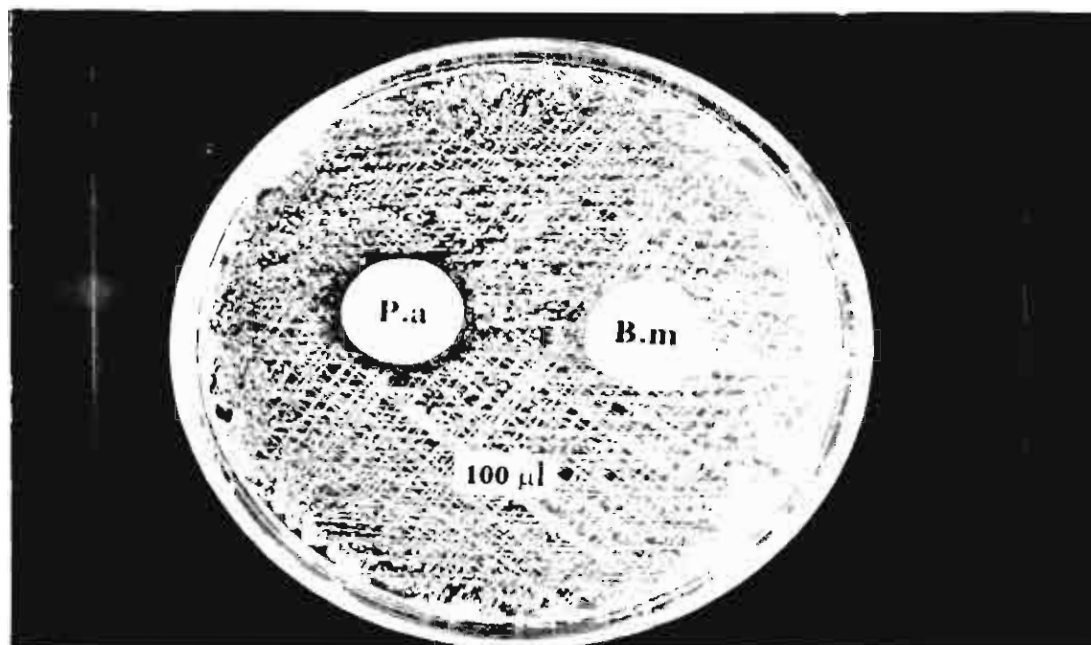
ไม่ได้มาจากส่วนน้ำใสของ *Bacillus megaterium* เพราะจากการทดลองข้อ 5.3.1 จะไม่พบบริเวณของการยับยั้งด้วยส่วนน้ำใสของเชื้อ *Bacillus megaterium* (B.m) เกิดขึ้น

เมื่อทำการทดสอบผลของการเกิดสารสีเขียวของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* (P.a) พบว่าเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* (P.a) นี้จะให้สารสีเขียวนี้นี้ก็ต่อเมื่อทำการทดลองเลี้ยงเชื้อ โดยการ streak เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* (P.a) ไว้บนเชื้อ *Aeromonas hydrophila* และจะให้บริเวณของการยับยั้งเกิดขึ้นด้วย แต่ถ้า streak เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* (P.a) ไว้เดี่ยวๆ จะไม่ให้สารสีเขียวเกิดขึ้นบนอาหารวุ้นแข็ง (ภาพที่ 46) ในขณะเดียวกันถ้าทำการ streak เชื้อ *Aeromonas hydrophila* ไว้บนเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* (P.a) ก็จะทำให้สารสีเขียวและบริเวณของการยับยั้งเกิดขึ้นบนอาหารวุ้นแข็งเช่นกัน (ภาพที่ 47) ดังนั้นจึงอาจใช้เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* เป็นตัวชี้วัดการปนเปื้อนของเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ได้ โดยดูจากสีเขียวที่เกิดขึ้น

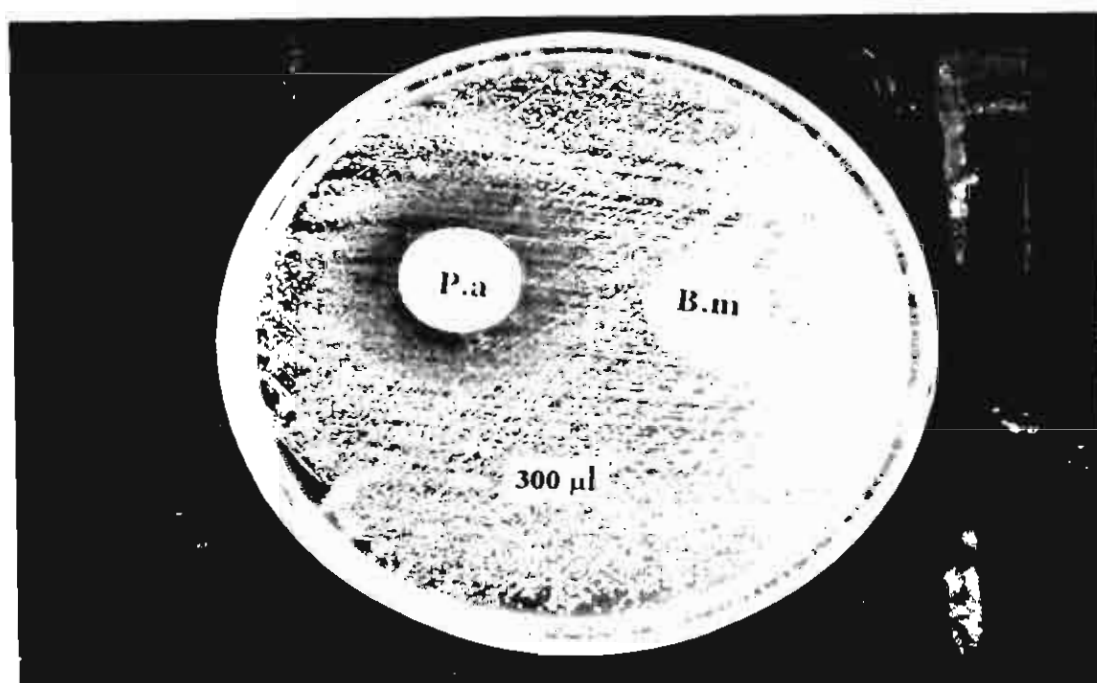
และจากการทดลอง พบว่า เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* (P.a) จะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Aeromonas hydrophila* และให้สารสีเขียวตรงบริเวณที่มีการยับยั้งเกิดขึ้นก็ต่อเมื่อทำการทดลองเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* (P.a) ไว้ที่อุณหภูมิ 37 °ซ แต่ถ้านำเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* (P.a) ไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 42 °ซ แล้วมาทดลองยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Aeromonas hydrophila* พบว่าจะไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรครดังกล่าวได้



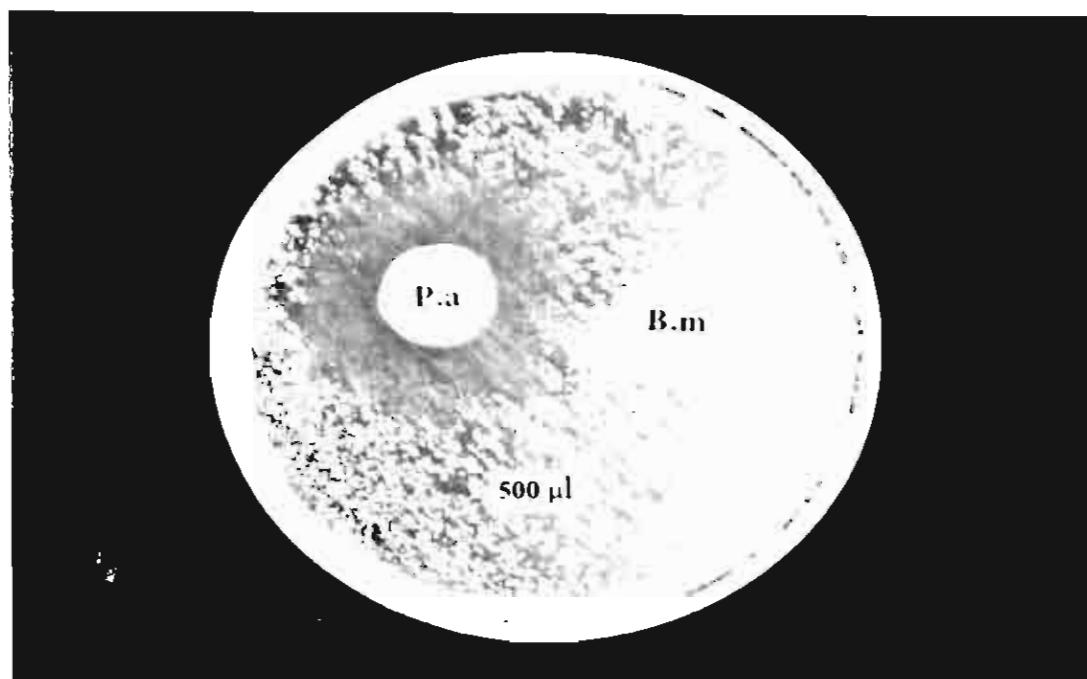
ภาพที่ 41 แสดงการยับยั้งเชื้อก่อโรคในกึ่งก้ำมกราม *Aeromonas hydrophila* โดยใช้ส่วนน้ำใสของเชื้อ *Staphylococcus aureus* (S.a), *Bacillus subtilis* (B.s), *Pseudomonas aeruginosa* (P.a), *Bacillus megaterium* (B.m) และ *Bacillus cereus* (B.c) หยดลงบนกระดาศกรอง



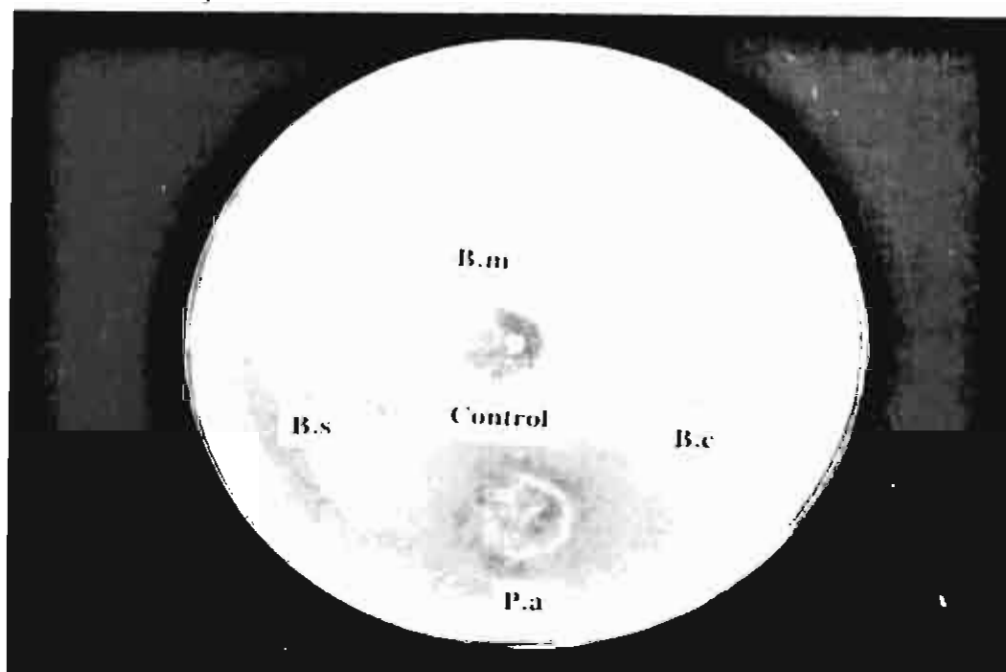
ภาพที่ 42 แสดงการเปรียบเทียบการยับยั้งเชื้อก่อโรคในกุ้งก้ามกราม *Aeromonas hydrophila* โดย
 ส่วนน้ำใสของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* (P.a) และ *Bacillus megaterium* (B.m) หยดลงบน
 กระดาษกรองความเข้มข้น 100 µl



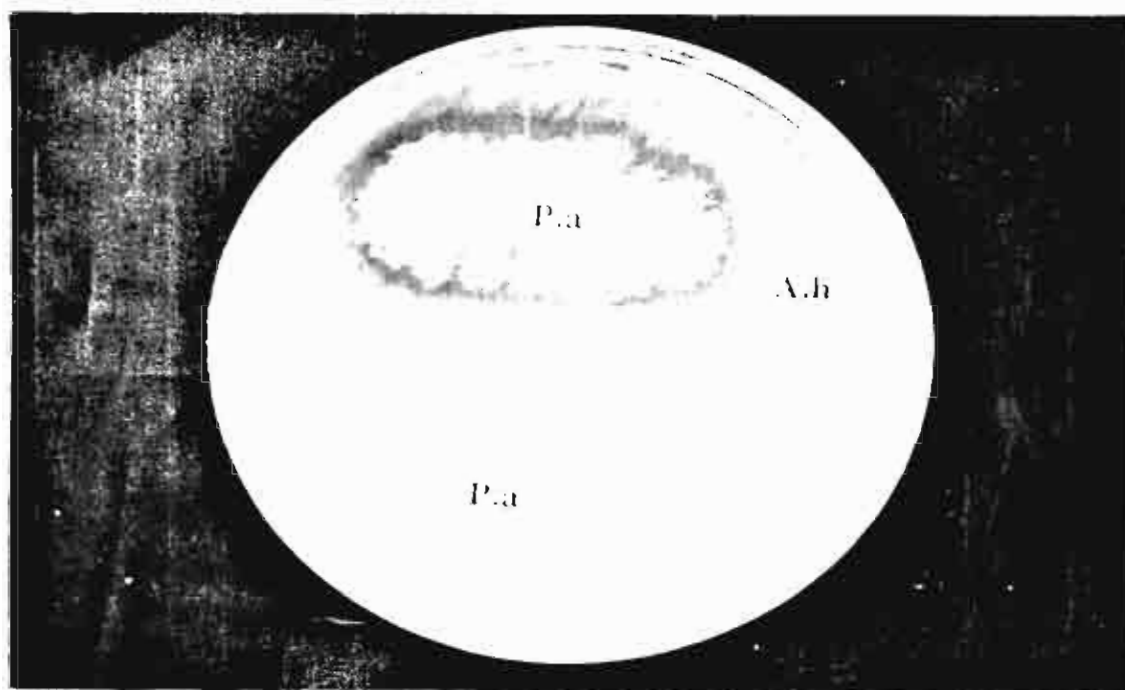
ภาพที่ 43 แสดงการเปรียบเทียบการยับยั้งเชื้อก่อโรคในกุ้งก้ามกราม *Aeromonas hydrophila* โดย
 ส่วนน้ำใสของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* (P.a) และ *Bacillus megaterium* (B.m) หยดลงบน
 กระดาษกรองความเข้มข้น 300 µl



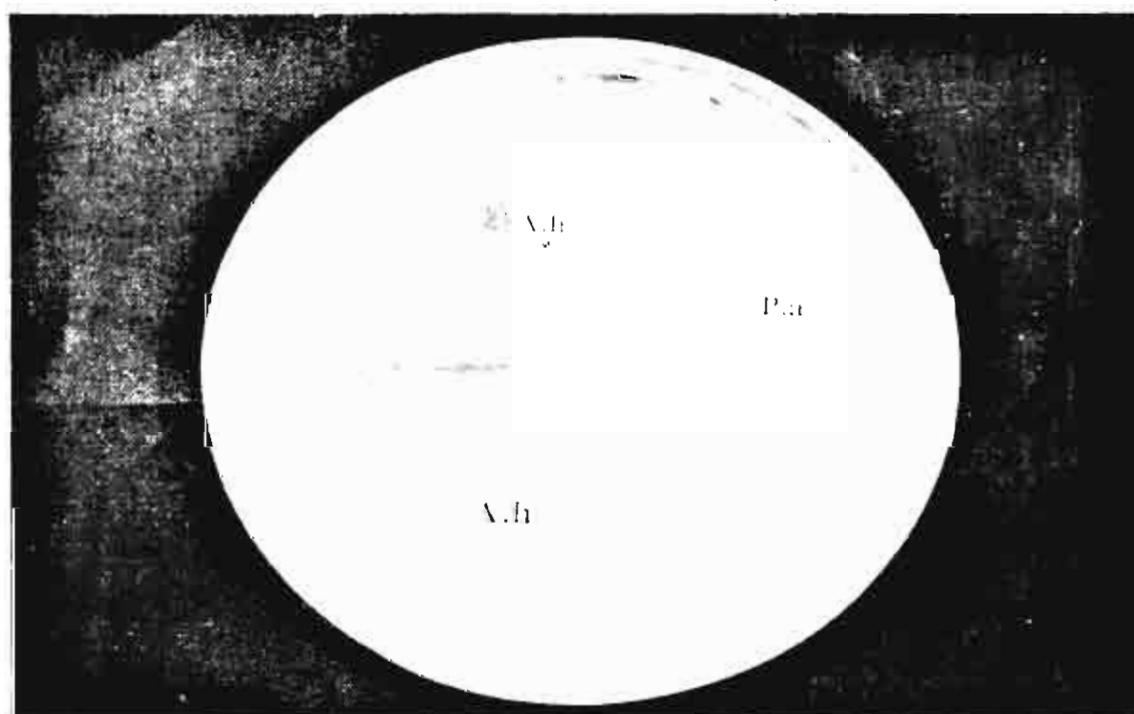
ภาพที่ 44 แสดงการเปรียบเทียบการยับยั้งเชื้อก่อโรคในกุ้งก้ามกราม *Aeromonas hydrophila* โดยใช้น้ำใสของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* (P.a) และ *Bacillus megaterium* (B.m) หยดลงบนระคายกรองความเข้มข้น 500 µl



ภาพที่ 45 แสดงการยับยั้งเชื้อก่อโรคในกุ้งก้ามกราม *Aeromonas hydrophila* โดยใช้ส่วนน้ำใสของเชื้อ *Bacillus megaterium* (B.m) *Bacillus cereus* (B.c) *Pseudomonas aeruginosa* (P.a) และ *Bacillus subtilis* (B.s) เปรียบเทียบกับ Control (อาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth ที่ปราศจากเชื้อ) โดยการหยดลงในหลุม



ภาพที่ 46 แสดงการเกิดสารสีเขียวและบริเวณของการยับยั้งของ *Pseudomonas aeruginosa* (P.a) ด้วยวิธีการ streak เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* (P.a) ลงบนเชื้อ *Aeromonas hydrophila* (A.h) เปรียบเทียบกับการ streak เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* (P.a) ลงบนอาหารวุ้นแข็งเพียงชนิดเดียว



ภาพที่ 47 แสดงการเกิดสารสีเขียวและบริเวณของการยับยั้งของ *Pseudomonas aeruginosa* (P.a) โดยวิธีการ streak เชื้อ *Aeromonas hydrophila* (A.h) ลงบนเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* (P.a) เปรียบเทียบกับการ streak เชื้อ *Aeromonas hydrophila* (A.h) ลงบนอาหารวุ้นแข็งเพียงชนิดเดียว

บทที่ 6

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาถึงชนิดและจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของกิ้งก่ามกราม จากฟาร์มของเกษตรกรใน จังหวัดขอนแก่น และ จังหวัดกาฬสินธุ์ พบชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ตลอดระยะเวลาของการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 3 กลุ่มเหมือนกันทั้งใน 2 พื้นที่ ได้แก่ *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. และ *Staphylococcus* sp. ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ วรณิกา เพ็ชรนิกุล (2539) ซึ่งรายงานว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากทางเดินอาหารของกิ้งก่ามกรามจัดอยู่ในสกุล *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus* sp., *Vibrio* sp., *Aeromonas* sp. และ *Klebsiella* sp. เมื่อทำการทดสอบสมบัติ รูปร่างรวมไปถึงการทดสอบทางชีวเคมี เพื่อช่วยในการจัดจำแนกสปีชีส์โดยยึดหลักการจัดจำแนกตาม Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Sneath และคณะ, 1986) พบว่าในสกุลของ *Bacillus* จะพบเชื้อทั้ง 3 สปีชีส์ ด้วยกัน คือ *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* และ *Bacillus megaterium* โดยที่ในลำไส้ของกิ้งก่ามกรามที่เก็บจาก จ. ขอนแก่น จะพบเชื้อในสปีชีส์ของ *Bacillus cereus* เท่านั้นและในสปีชีส์ของ *Bacillus subtilis* และ *Bacillus megaterium* ก็พบเพียงในการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 2 ในบ่อที่ทำการเพาะเลี้ยงอีก 1 บ่อของตัวอย่างกิ้งก่ามกรามในจังหวัดกาฬสินธุ์ ในช่วงเดือนเมษายน ถึง เดือนกรกฎาคม เท่านั้น สาเหตุที่พบเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดนี้อาจเนื่องมาจากในช่วงเดือนมีนาคม เกิดการขาดแคลนน้ำในบ่อที่ทำการเพาะเลี้ยงในจังหวัดกาฬสินธุ์ เกษตรกรจึงขาดน้ำในการใช้เปลี่ยนถ่ายในบ่อ ทำให้น้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงในบ่อเกิดการเน่าเสียขึ้น เกษตรกรจึงได้นำเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการบำบัดน้ำเสียมาทดลองใส่ลงในบ่อด้วยเหตุนี้เชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดข้างต้น จึงอาจปนเปื้อนเข้าไปอยู่ในลำไส้ของกิ้งก่ามกราม อย่างไรก็ตามเชื้อ *Bacillus megaterium* ไม่ใช่เชื้อที่แสดงไว้บนซองบรรจุมีเพียง *Bacillus subtilis* เท่านั้นที่แสดงไว้บนซองว่าเป็นส่วนผสมของเชื้อสำหรับบำบัดน้ำเสีย ในส่วนของเชื้อ *Staphylococcus* พบเชื้อจำนวน 1 สปีชีส์ คือ *Staphylococcus aureus* เท่านั้น และในส่วนของเชื้อ *Pseudomonas* ก็พบเพียง 1 สปีชีส์ คือ *Pseudomonas aeruginosa* ซึ่งเชื้อทั้งหมดนี้สามารถเจริญเติบโตได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน และเจริญได้ทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ชนิด NA และ YM แต่การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดเดียวกันที่ตรวจพบในอาหาร NA จะมีการเจริญเติบโตที่ดีกว่าการเลี้ยงในอาหาร YM และพบว่าการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีออกซิเจนจะพบจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดที่แยกได้จากลำไส้ของกิ้งก่ามกรามทั้ง 2 พื้นที่มากกว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ถึงแม้ว่าจะเป็นเชื้อจุลินทรีย์ชนิดเดียวกันก็ตาม ซึ่งพบว่าปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดที่นับได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีออกซิเจนของทั้ง 2 พื้นที่จะมีจำนวนเชื้อเท่ากับ 10^7 cfu/g ของน้ำหนักลำไส้กิ้งก่ามกราม ส่วนจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดที่นับได้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ของทั้ง 2 พื้นที่จะมีค่าอยู่

ระหว่าง 10^6 - 10^7 cfu/g ของน้ำหมักปลาไส้กึ่ง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Yuthachit และคณะ (1990) ซึ่งได้ศึกษาแบคทีเรียในทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำในจังหวัดสงขลา พบว่ามีจำนวน 7.5×10^6 - 1.3×10^7 cfu/g ของน้ำหมักปลาไส้กึ่ง ชนิดและปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของกุ้งก้ามกรามจากฟาร์มของเกษตรกร 2 จังหวัด จะมีค่าแตกต่างกันเล็กน้อย โดยที่ทั้งชนิดและปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำการแยกได้จากปลาไส้กึ่งก้ามกรามในจังหวัดขอนแก่นจะมีค่าน้อยกว่าชนิดและปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากปลาไส้กึ่งก้ามกรามในจังหวัดกาฬสินธุ์

จากการตรวจนับปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ พบว่าชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีปริมาณมากที่สุดในปลาไส้กึ่งก้ามกราม จังหวัดขอนแก่นคือ *Staphylococcus aureus* เท่ากับ 1.8×10^7 - 2.4×10^7 cfu/g ของน้ำหมักปลาไส้กึ่ง รองลงมาได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa* มีค่าเท่ากับ 8.5×10^6 - 9.3×10^6 cfu/g ของน้ำหมักปลาไส้กึ่ง และ *Bacillus cereus* มีค่าเท่ากับ 2.3×10^6 - 2.6×10^6 cfu/g ของน้ำหมักปลาไส้กึ่ง ตามลำดับ ซึ่งปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ที่พบมากที่สุดในการก้ามกราม จ. กาฬสินธุ์ก็เช่นเดียวกันซึ่งพบมากที่สุดได้แก่ *Staphylococcus aureus* เท่ากับ 1.0×10^7 - 1.4×10^7 cfu/g ของน้ำหมักปลาไส้กึ่ง รองลงมาได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa* เท่ากับ 7.2×10^6 - 1.1×10^7 cfu/g ของน้ำหมักปลาไส้กึ่ง และ *Bacillus cereus* เท่ากับ 1.6×10^6 - 1.9×10^6 cfu/g ของน้ำหมักปลาไส้กึ่ง ส่วน *Bacillus subtilis* มีจำนวนประมาณ 1.7×10^6 cfu/g ของน้ำหมักปลาไส้กึ่ง และ *Bacillus megaterium* เท่ากับ 0.9×10^6 - 1.1×10^6 cfu/g ของน้ำหมักปลาไส้กึ่ง ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Cahill (1990) ซึ่งกล่าวว่า ชนิดและปริมาณแบคทีเรียในแหล่งน้ำและในสัตว์น้ำ จะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับปัจจัยมากมาย เช่น แหล่งอาศัย คุณภาพน้ำ ระยะเวลาในการเก็บรักษา อาหารที่ได้รับ นอกจากนี้ยังพบว่าในปลาไส้กึ่งจะมีปริมาณแบคทีเรียสูงกว่าบริเวณภายนอก หรือแหล่งน้ำที่มันอาศัยอยู่ เช่นเดียวกับ ลีลา และคณะ (2540) ซึ่งกล่าวว่า ความแตกต่างของชนิดและปริมาณแบคทีเรียในสัตว์น้ำอาจจะเกิดจากปัจจัย 2 ประการ คือ ปัจจัยของสิ่งแวดล้อมที่สัตว์น้ำอาศัยอยู่ และอาหารที่ใช้เลี้ยงสัตว์น้ำ Campbell & Buswell (1983) ชี้ให้เห็นว่าเมื่อเราได้อาหารเพื่อเลี้ยงปลา ปลาจะได้รับแบคทีเรียเข้าไป และแบคทีเรานั้นจะปรับตัวเพื่อให้อยู่ในทางเดินอาหารส่วนหนึ่งส่วนใดให้ได้ ซึ่งจากการตรวจชนิดและจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงกุ้งก้ามกรามสำเร็จรูป พบเชื้อจุลินทรีย์เพียงชนิดเดียวในอาหาร คือ *Staphylococcus aureus* และพบในปริมาณ 2.3×10^3 cfu/g ของน้ำหมักอาหาร ด้วยเหตุนี้เอง ปริมาณของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่มีมากที่สุดในปลาไส้กึ่งก้ามกรามทั้งในจังหวัดขอนแก่น และจังหวัดกาฬสินธุ์ จึงน่าจะมาจากอาหารที่ใช้เลี้ยงกุ้งก้ามกรามนั่นเอง ส่วนเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ที่มีมากรองเป็นอันดับสองน่าจะเป็นแบคทีเรียที่มาจากดินที่กุ้งอาศัยอยู่และกลายเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในทางเดินอาหารของกุ้งก้ามกราม ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Yuthachit และคณะ (1990) ที่พบว่า *Vibrio* sp., *Aeromonas* sp. และ *Pseudomonas* sp. จัดว่าเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในทางเดินอาหารกุ้ง จากงานวิจัยนี้ได้ศึกษาชนิด และ

ปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อประจำถิ่นของกุ้งก้ามกรามพบแบคทีเรียแกรมลบเป็นส่วนมากซึ่งคล้ายกับงานวิจัยต่าง ๆ ที่ได้กล่าวมาแล้ว

นอกจากจะมีความแตกต่างกันในชนิดและปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ในลำไส้ของกุ้งก้ามกรามจาก 2 พื้นที่เพียงเล็กน้อยแล้ว จากการตรวจวัดค่าของ อุณหภูมิ pH ของน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยง และอัตราการเจริญเติบโตโดยชั่งน้ำหนักและวัดความยาวลำตัว (Total range) เฉลี่ยของกุ้งก้ามกรามที่สุ่มได้ พบว่ามีค่าใกล้เคียงกัน ค่าอุณหภูมิ และ pH ของน้ำในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามจังหวัดขอนแก่น อยู่ระหว่าง 28-32 °ซ และ 6.6-7.4 ตามลำดับ ส่วนอุณหภูมิ และ pH ของน้ำในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามจังหวัดกาฬสินธุ์อยู่ระหว่าง 29-32 °ซ และ 5.6-7.3 ซึ่งอุณหภูมิ และ pH ที่วัดได้จัดอยู่ในช่วงที่ไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกราม ในส่วนของน้ำหนักและความยาวลำตัวนั้น พบว่า กุ้งก้ามกรามที่เก็บจากบ่อเพาะเลี้ยงในจังหวัดกาฬสินธุ์ จะมีน้ำหนักและความยาวของลำตัว (Total range) เฉลี่ยสูงกว่าตัวอย่างกุ้งก้ามกรามที่เก็บจากจังหวัดขอนแก่น โดยที่ตัวอย่างกุ้งก้ามกรามจากจังหวัดขอนแก่นจะมีน้ำหนักและความยาวลำตัวเฉลี่ย (Total range) อยู่ในช่วง 1.1-7.9 กรัม และ 4.3-11.2 ซม. ตามลำดับ ส่วนในจังหวัดกาฬสินธุ์ 1.4-10.3 กรัม และ 3.2-14.8 ซม. แต่ทั้งนี้ก็เนื่องมาจากว่าใช้ระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างกุ้งก้ามกรามในจังหวัดกาฬสินธุ์นานกว่าในจังหวัดขอนแก่น ประมาณ 3 เดือน จึงทำให้ค่าเฉลี่ยของน้ำหนัก และความยาวลำตัว (Total range) สูงกว่า

หลังจากแยกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์จากลำไส้ของกุ้งก้ามกรามได้แล้ว นำเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดมาทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อก่อโรคในกุ้งก้ามกราม ซึ่งได้แก่ *Aeromonas hydrophila* โดยใช้วิธีการซึมผ่านกระดาษกรอง (Disc diffusion assay) และวิธีการซึมผ่าน รูน (Well diffusion assay) วิธีนี้มีข้อดีคือสะดวก เห็นผลได้ชัดเจน และใช้เวลาสั้นๆ จากผลการทดลอง พบว่ามีเพียงเชื้อจุลินทรีย์เพียงชนิดเดียวที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Aeromonas hydrophila* นั่นก็คือเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ซึ่งให้ clear zone กับเชื้อก่อโรค และให้สารที่มีสีเขียวออกมาในอาหารรูน ดังนั้นการที่เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* เป็นเชื้อประจำถิ่นในลำไส้กุ้งจึงเป็นผลดีต่อกุ้งในแง่ที่ว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคได้ แต่เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* จัดเป็นเชื้อก่อโรคในกุ้ง (กุลวรา แสงรุ่งเรือง, 2534) และ *Staphylococcus aureus* ก็จัดเป็นเชื้อก่อโรคที่เกิดจากการปนเปื้อนในระหว่างการขนส่งตัวอย่าง จากมือระหว่างการเก็บตัวอย่าง และจากการเก็บรักษา (วลัยพร ทิมบุญธรรม, 2530) จึงไม่นำมาทดลองใช้เป็นโพรไบโอติก เนื่องจากจุลินทรีย์ที่จะใช้เป็นโพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงกุ้งไม่ควรเป็นจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในกุ้ง (non pathogenic) หรือ มีโอกาสก่อให้เกิดโรค (นิรนาม, 2540) จึงได้สนใจที่จะศึกษาความเป็นไปได้ที่จะใช้เชื้อ *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* และ *Bacillus megaterium* เป็นโพรไบโอติก เนื่องจากเชื้อ จุลินทรีย์ในกลุ่มของ *Bacillus* ได้มีการศึกษาและทดลองใช้เป็นโพรไบโอติกกันอย่างแพร่หลาย อย่างเช่น การทดลองของ นิภา เพ็ชรนภักดิ์ (2540) ใช้ *Bacillus* spp. 5 สายพันธุ์ ได้แก่

B. subtilis, *B. megaterium*, *B. firmus*, *B. lentus* และ *B. marinus* เพื่อเสริมผลผลิตกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) พบว่า เมื่อนำเชื้อมาผสมกันแล้วเติมลงในน้ำเลี้ยงกุ้งจะทำให้กุ้งมีอัตราการอดสูงขึ้น

เมื่อนำเชื้อ *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* และ *Bacillus megaterium* มาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เพื่อที่จะผลิตเชื้อจุลินทรีย์ให้ได้ในปริมาณที่มากสำหรับใช้เป็นโปรไบโอติก พบว่า การแปรผันอุณหภูมิ 5 ระดับคือ 30, 35, 37, 40 และ 42 °ซ และ pH แปรผัน 6 ระดับ คือ 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0 ซึ่งจากการแปรผันอุณหภูมิและ pH ในแต่ละระดับ ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์สูงสุดไม่แตกต่างกันมากนักโดยจะแตกต่างกันตรงที่เวลาที่ใช้ในการเจริญเติบโตให้ได้ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์สูงสุด โดยพบว่า สภาวะที่เหมาะสมและให้อัตราการเจริญสูงสุดของเชื้อ *Bacillus cereus* อยู่ที่ pH 6.0 และอุณหภูมิ 30 °ซ ในชั่วโมงที่ 18 ส่วน *Bacillus subtilis* มีอัตราการเจริญสูงสุดอยู่ที่ pH 6.5 และอุณหภูมิ 37 °ซ ที่ชั่วโมงที่ 18 และ *Bacillus megaterium* มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญที่ pH 6.5 และอุณหภูมิ 40 °ซ ที่ชั่วโมงที่ 24 โดยอัตราการขยายของทุกสภาวะอยู่ที่ 200 รอบต่อนาที จึงได้เลือกสภาวะดังกล่าวเพื่อใช้ในการผลิตเพื่อขยายส่วนของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดเพื่อใช้เป็นโปรไบโอติกผสมเป็นอาหารทดลองเลี้ยงกุ้งก้ามกรามต่อไป

บทที่ 7

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

1. การศึกษาชนิดและจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของกิ้งก่ามกรามในจ.ขอนแก่น และจ. กาฬสินธุ์ พบชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ตลอดระยะเวลาของการทดลองจากตัวอย่างกิ้งก่ามกรามในจังหวัดขอนแก่น 3 สายพันธุ์ คือ *Bacillus cereus*., *Staphylococcus aureus* และ *Pseudomonas aeruginosa* และในจังหวัดกาฬสินธุ์พบ 5 สายพันธุ์ คือ *Bacillus cereus*., *Staphylococcus aureus*., *Pseudomonas aeruginosa*., *Bacillus megaterium* และ *Bacillus subtilis* เชื้อที่พบมากที่สุดรวมทั้ง 2 พื้นที่ คือ *Staphylococcus aureus* โดยที่ตรวจพบในกิ้งก่ามกรามจากจังหวัดขอนแก่น อยู่ในช่วง 1.8×10^7 - 2.4×10^7 cfu/g ของน้ำหมักไล่ไส้กิ้ง ส่วนในจังหวัดกาฬสินธุ์ พบอยู่ระหว่าง 1.0×10^7 - 1.4×10^7 cfu/g ของน้ำหมักไล่ไส้กิ้ง รองลงมาได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa* และ *Bacillus cereus* ตามลำดับ ซึ่งในจังหวัดขอนแก่นพบจำนวน 8.5×10^6 - 9.3×10^6 cfu/g และ 2.3×10^6 - 2.6×10^6 cfu/g ของน้ำหมักไล่ไส้กิ้ง ส่วนในจังหวัดกาฬสินธุ์ พบ *Pseudomonas aeruginosa* และ *Bacillus cereus* จำนวน 7.2×10^6 - 1.1×10^6 cfu/g และ 1.6×10^6 - 1.9×10^6 cfu/g ของน้ำหมักไล่ไส้กิ้ง ตามลำดับ

2. การทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรคในกิ้งก่ามกราม คือ *Aeromonas hydrophila* โดยใช้กระดาษกรอง(Disc diffusion assay) และวิธีการซึมผ่านวุ้น (Well diffusion assay) พบว่า มีเชื้อเพียงชนิดเดียวเท่านั้นที่เกิด Clear zone inhibition กับเชื้อทดสอบดังกล่าว นั่นคือเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* และให้สารที่มีสีเขียวออกมามตรงส่วนที่มีการยับยั้งด้วย ดังนั้นจึงอาจใช้ *Pseudomonas aeruginosa* เป็นตัวชี้วัดการปนเปื้อนของเชื้อก่อโรค (*A. hydrophila*) ในกิ้งได้

3. การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโพรไบโอติก พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *Bacillus cereus* อยู่ที่ pH 6.0 และอุณหภูมิ 30 °ซ ในชั่วโมงที่ 18 ส่วน *Bacillus subtilis* มีอัตราการเจริญสูงสุดอยู่ที่ pH 6.5 และอุณหภูมิ 37 °ซ ในชั่วโมงที่ 18 เช่นกัน และ *Bacillus megaterium* มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญที่ pH 6.5 และอุณหภูมิ 40 °ซ ที่ ชั่วโมงที่ 24 โดยอัตราการเขย่าของทุกสภาวะอยู่ที่ 200 รอบต่อนาที

เอกสารอ้างอิง

- กุลวรา แสงรุ่งเรือง. การศึกษาปริมาณแบคทีเรียที่เปลี่ยนแปลงในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. รายงานการสัมมนาวิชาการประจำปี 2534. กรุงเทพฯ: สถาบันวิจัยประมงน้ำจืด บางเขน กรมประมง; 2534.
- กลุ่มสถิติและสารสนเทศการประมง. สถิติผลการเลี้ยงสัตว์น้ำจืดปี 2538. กรุงเทพฯ: กองเศรษฐกิจการประมง กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์; 2541.
- คณิงนิจ ก่อธรรมฤทธิ์. การศึกษาและวิเคราะห์สถานภาพและศักยภาพการผลิต การใช้และความต้องการโปรไบโอติก ของอุตสาหกรรมอาหารสัตว์. เอกสารวิชาการ BIOTEC 3/2540; 2540.
- จารุวรรณ วีระวงษ์นุสร. พืชเลี้ยงปลาน้ำจืดของแอมโมเนียที่มีต่อกุ้งก้ามกรามวัยอ่อนระยะต่างๆ กัน [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต]. กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2525.
- ชลอ ลัมสุวรรณ, ยนต์ มุสิก, ชีระ เล็กชวฤทธิ์, กังวาลย์ จันทรโชติ, นงนุช รักสกุลไทย. โรคกุ้งทะเลและการใช้สารเคมีภัณฑ์. ว. สงขลานครินทร์; 2530.
- ชูศักดิ์ แสงธรรม. กุ้งก้ามกราม. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: ศูนย์ผลิตตำราเกษตรเพื่อชนบท; 2532.
- ชัยสิทธิ์ โพธิ์ปักษ์, บุญมี งามจรัสศรีวิชัย, เมธิ ตั้งพานิช, จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์, เปี่ยมศักดิ์ เมนะเสวด. การสำรวจเชื้อแบคทีเรียในลูกกุ้งก้ามกรามวัยอ่อนที่ป่วยและการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคในกุ้ง. ว. โรคสัตว์น้ำ 2529; 9(1-4): 71-91 .
- จิตติพงษ์ ณะรัชชติการนนท์. การใช้แอลคิกแอซิดแบคทีเรียเป็นโปรไบโอติกเสริมในอาหารไก่. [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต]. กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2539.
- ทรงชัย สหวัชรินทร์, ไพโรจน์ พรหมานนท์. ผลการเพาะพันธุ์กุ้งก้ามกรามวัยอ่อนโดยการเปรียบเทียบความเต็มและอาหาร. รายงานประจำปีสถานีวิจัยประมงทะเลสงขลา. กรุงเทพฯ: กรมประมง; 2513.
- ทัศนีย์ เชื้อทอง. โปรไบโอติก. รายงานประกอบวิชา Advance in Regulation and Control of Microbial Synthesis. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ; 2539.
- นิรนาม. ระบบนิเวศน์และความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กในบ่อกุ้ง. ว. ข่าวกุ้ง 2540; 2(106): 2.
- บรรจง เทียนสงรัสมิ. หลักการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม. คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ; 2521.
- บรรจง เทียนสงรัสมิ. หลักการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ; 2535.

ประจวบ หล้าอุบล. ความรู้เรื่องการเลี้ยงกุ้ง. พิมพ์ครั้งที่ 3. ฝ่ายสื่อการศึกษา. สำนักส่งเสริมและฝึกอบรม. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ; 2529.

เปรมสุดา สมาน. จุลินทรีย์สำหรับบำบัดน้ำเสียจากการเลี้ยงกุ้งทะเล. [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต]. กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2539.

พันทิพา พงษ์เพ็ญจันทร์. หลักโภชนศาสตร์และการประยุกต์. หลักการอาหารสัตว์ เล่ม 2. ภาควิชาสัตวศาสตร์. คณะเกษตรศาสตร์. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่; 2528.

เพิ่มพงษ์ ศรีประเสริฐศักดิ์. การผลิตและเก็บรักษาแบคทีเรียแลคติกเพื่อใช้เสริมอาหารสุกรในรูปผง. [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต]. กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2524.

มณจันทร์ เมฆธน. การใช้จุลินทรีย์ในบ่อกุ้ง. ใน: การสัมมนาและนิทรรศการทางวิชาการ งานวันกุ้ง จันทบุรี 40. กรุงเทพฯ: กรมประมง; 2540.

รัตน์ชัย ลีโทชวลิต, วิวัฒน์ ชัยชนะศิริวิทยา. การศึกษาจุลินทรีย์ในลำไส้กุ้งกุลาดำปกติและน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้ง. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์. คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2531.

ลิตา เรืองแป้น, ยาใจ เจริญวิริยะกุล, เยาวนิตย์ คนยดล. โรคและพยาธิในกุ้งทะเลของไทย. เอกสารวิชาการฝ่ายทดลองและวิจัยเพื่อการเพาะเลี้ยง. กรุงเทพฯ: กองประมงน้ำกร่อย กรมประมง บางเขน; 2528.

วรรณภา เพ็ชรนัฏกร. การใช้แบคทีเรียเสริมในอาหารกุ้ง. [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต]. กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2539.

วลัยพร ทิมบุญธรรม. การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม. [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต]. กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2544.

วิศณุ บุญญาวิวัฒน์. โรคและความถดถอยทางพันธุกรรมของกุ้งก้ามกราม. จากการอภิปรายทางวิชาการงานวันเกษตรแห่งชาติประจำปี 2541. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน. นครปฐม; 2541.

วิเชียร ลีลาวัชรมาศ. โปรไบโอติก : อาหารสุขภาพสำหรับมนุษย์และสัตว์ (ตอนที่ 2). ว. จารพา 2541; 42: 54-57.

เศรษฐเกียรติ กระจ่างวงษ์, สุพจน์ วัฒนพงศ์ชาติ, ธนพงศ์ อินทรธนู. การศึกษาเชื้อแบคทีเรียในอวัยวะภายในของพ่อ-แม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์. คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ; 2533.

สนธิ แดงสกุล, ลิตา เรืองแป้น. ประสิทธิภาพของโปรไบโอติกที่ผลิตจาก *Bacillus* เพื่อการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. ว. การประมง 2541; 51(5): 446-456.

- สมบัติ รักประทานพร. การเสริมภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* ด้วย *Bacillus* สายพันธุ์ S11. [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต]. กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2542.
- สิทธิ บุญรัตนผลิน. โรคกุ้งก้ามกรามและวิธีป้องกันรักษา. เอกสารประกอบการอบรมเกษตรกร. กรุงเทพฯ: สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ; 2526.
- Adler HE, and Damassa AJ,. Effects of ingested lactobacilli on *Salmonella infantis* and *Escherichia coli* and on intestinal flora, pasted vents and chick growth. **Avian. Dis.** 1980; 24: 868-878.
- Alexander M. **Microbiology Ecology**. New York: John Wiley and Sons, Inc; 1971.
- Arends LG. Influence of *L. acidophilus* administered via the drinking water on broiler performance. **Poultry Sci.** 1981; 60: 1617.
- Amstrong DA, Stephenson MJ, and Knight AW. Acute toxicity of nitrite to larvae of the giant Malaysia prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. **Aquaculture**. 1976; 9: 39-46.
- Austin B, Baudet E, and Stobie M. Inhibition of bacterial fish pathogens by *Tetraselmis suecica*. **J. Fish Dis.** 1992; 15: 55-61.
- Austin B, Stuckey LF, Robertson PAW, Effendi I, and Griffith DRW. A probiotics strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. **J. Fish Dis.** 1995; 18: 93-96.
- Boonyaratpalin S, and Kasornchadra J. Common pathogenic bacteria of some economic aquatic animals found in Thailand. **Thai Fisheries Gazette**. 1984; 37(6): 522.
- Burnett GS, and Neil EI. A note on the effect of probioticum feed additive on the live-weight gain, feed conversion and carcass quality of bacon pigs. **Anim. Prod.** 1977; 25: 95-98.
- Canganella F, Zirletta G, Gualterio L, Massa S, and Trovatelli LD. Anaerobic facultative bacteria isolated from the gut of rabbits fed different diets. **Zentralbl. Mikrobiol.** 1992; 147: 537-540.
- Chandrasekaram M, Lakshmanaperumlsamy P, and Chandramohan D. Occurrent of *Vibrio* during fish spoilage. **Curr.Sci.** 1984; 53: 31-32.
- Chui YN. Water quality managment for intensive prawn ponds. In Y.N. Chui, L.M. Stantos and R.O. Juliano (eds.) **Technical considerations for the management and operation of intensive prawn farms**. Philippines : UP Aquaculture Society, Collage of Fisheries, UP in the Visayas, Iloilo city. 1988.
- Couch JR. Poultry researchers outline benefits of bacteria, fungistatic compounds, other feed additives. **Feedstuffs**. 1978; 50: 6.

- Cowman GL, Davis LW, Duncan MS, and Trammell JH. Dose response relationship in post-weaned pigs fed a non-viable *Lactobacillus* fermentation product. **J. Anim. Sci.** 1978; 47: 198.
- Dempsey AC, and Kitting CL. Characteristics of bacteria isolated from penaeid shrimp. **Crustaceana**. 1987; 52: 90-93.
- Dempsey AC, Kitting CL, and Rosson RA. Bacterial variability among individual penaeid shrimp digestive tracts. **Crustaceana**. 1989; 56: 267-276.
- Dilworth BC, and Day EJ. *Lactobacillus* cultures in broiler diets. **Poultry Sci.** 1978; 57: 1101.
- Douillet PA, and Langdon CJ. Use of a probiotic for the culture of larvae of the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg). **Aquaculture**. 1994; 119: 25-40.
- Ervolder TM, Gudkov AV, Gerdokov SA. Use of bifidobacteria in control of gastrointestinal disease in piglets and broiler chicks. **Molochnaya Promyshlennost**. 1984; 8: 18-20. (in Daily Sci Abstr. 1985. 47 : 714.)
- Fox SM. Probiotics : intestinal inoculants for production animals. **Vet. Med.** 1988; 83: 806-830.
- Fujimura T. Notes on the development of a practical mass culturing technique of the giant prawn *Macrobrachium rosenbergii*. **Proc. Indo. Pacif. Fish. Coun.** 12th Session, Honolulu, Hawaii; 1966.
- Fuller R. **Probiotics The Scientific Basis**. Chapman & Hall, London; 1992.
- Fuller R. Probiotics in man and animals. **J. Appl. Bacteriol.** 1989; 66: 365- 378.
- Gildberg A, Johansen A, and Bogwald J. Growth and survival of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry given diets supplemented with fish protein hydrolysate and lactic acid bacteria during a challenge trial with *Aeromonas salmonicida*. **Aquaculture**. 1995; 138: 23-34.
- Gomerz DG, and Ohno A. Possible significance of rearing conditions of origerous *Macrobrachium rosenbergii*. (de Man). Pp. 45-48. In L.B. Maclean and L.V. Hosillos(eds.) The First Fisheries Forum. Asia Fisheries Society. Manila; 1986.
- Gram L, Melchiorson J, Spanggaard B, Huber I, and Nielsen TF. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. **Appl. Environ. Microbiol.** 1999; 65: 969-973.
- Gualtieri M, and Betti S. Effects of the administration of *Streptococcus faecium* to suckling piglet. **Riv. Suinicoltura**. 1984; 25: 39-43.
- Guarner F, and Schafsma GJ. Probiotics. **Int. J. Food Microbiology**. 1998; 39: 237- 238.

- Gudding R, and Larssen RB. Some effect of *Streptococcus faecium* M74 in piglets. **Nord. Vet. Med.** 1985; 37: 48-49.
- Hale OM, and Newton GL. Effects of a nonviable *Lactobacillus* species fermentation product on performance of pigs. **J. Anim. Sci.** 1979; 48: 770-775.
- Hammer BW, and Babel FT. Bacteriology of butter culture : A review. **J. Dairy Sci.** 1943; 26: 83.
- Han I, Lee SC, Lee JH, Lee KK, and Lee JC. Studies on the growth effect of probiotics I. The effects of *Lactobacillus sporogenes* in the growing performance and the change in microbial flora of the faeces and intestinal contents of the broiler chicks. **Korean J. Anim. Sci.** 1984a; 26: 150-157.
- Han I, Lee SC, Lee JH, Kim JD, Jung PK, and Lee JC. Studies on the growth effect of probiotics II. The effects of *Clostridium butyricum* ID on the growing performance and the change in microbial flora of the faeces and intestinal contents of the broiler chicks. **Korean J. Anim. Sci.** 1984b; 26: 158-165.
- Han I, Lee SC, Lee JH, Kim TH, and Kwag JH. Studies on the growth effect of probiotics III. The effects of *Clostridium butyricum* ID on the growing performance and the change in microbial flora of the faeces and intestinal contents of the broiler chicks. **Korean J. Anim. Sci.** 1984c; 26: 166-171.
- Havenaar R, and Huis in't Veld JHJ. Probiotics: a general views. In Wood, B.J.W. (ed.), The lactic acid bacteria in health & disease. London: **Elsevier Applied Science.** 1992; 1: 151-170.
- Havenaar R, and Spanhaak S. Probiotics from an immunological point of view. **Current Opinion in Biotechnology.** 1994; 5: 320-325.
- Holzapfel WH, Haberer P, Snel J, Schillinger U, and Huis in't Veld JHJ. Overview of gut flora and probiotics. **Int. J. Food Microbiol.** 1998; 41: 85-101.
- Hsieh CH, Chao NH, Oliviala D, Gomes LA, and Liao IC. Culture practices and status of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*, in Taiwan. Paper presented at the third Brazilian shrimp framing congress. Joao Pessoa-PB. Brazil. (15-20 October) : 25 p. (Unpublished Manuscript). Quoting New, M.B. 1990. Freshwater prawn culture : A review. **Aquaculture** 1989; 88: 99-144.
- Ingram SH, Lennon AM, and Albin RC. *Lactobacillus acidophilus* for pigs at weanling. **J. Anim. Sci.** 1973; 36 : 207.
- Jensen H. Biological effects of feeding pigs with *Lactobacillus acidophilus*. **Proc. XIX Intern. Dairy Congress India;** 1974.

- Johnson SK. Handbook of Shrimp Diseases. Texas A and M University Sea Grant College Program, Texas; 1978.
- Johnson SK. Diseases of Macrobrachium. In : **Giant Prawn farming developments in aquaculture and fisheries Science**. In M.B. New (ed.), Amsterdam-Oxford-New York, Elsevier Scientific Publishing Co, New York. 1982; 10: 89-90.
- Jonsson E. Persistence of *Lactobacillus* strain in the gut of sucking piglets and its influence on performance and health. **Swed. J. Agric. Res.** 1986; 16: 43-47.
- Kaper JB, Lockman H, Remmer EF, Kristensen K, and Colwell RP. Numerical taxonomy of *Vibrio* isolated from estuarine environments. **Inter. J. Sys. Bacteriol.** 1983; 229-255.
- Kenworthy R. Intestinal microflora of the pig. **Adv. Appl. Micro.** 1973; 16: 1-28.
- Kimura N, Yoshikane M, Kabayashi A, and Mitsuoka T. An application of dried *bifidobacteria* preparation to scouring animals. **Bifido. Micro.** 1983; 2: 41-55.
- Kluber ET, Pollman DS, and Blecha F. Effect of feeding *Streptococcus faecium* to artificially reared pigs on growth, haematology and cell-mediated immunity. **Nutr. Rep. Intern.** 1985; 32: 57-66.
- Kornegay ET, and Thomas HR. **Bacterial and yeast preparations for starter and grown rations**. Virginia Polytechnic Institute and State University, Research Division Report. USA : Virginia; 1973.
- Kornegay ET. **Effect of dosing or feeding *Lactobacillus acidophilus* on blood cholesterol levels and growth rate weanling and growing pigs**. Virginia Polytechnic Institute and State University, Research Division Report. USA : Virginia; 1985/86.
- Lessard M, and Brisson GJ. Effect of a *Lactobacillus* fermentation product on growth, immune response and fecal enzyme activity in weaned pigs. **Can. J. Anim. Sci.** 1987; 67: 509-516.
- Lilley DM, and Stillwell RH. **Probiotic: growth promoting factors produced by microorganisms**. Science. 1965; 147: 747-8.
- Moriarty DJW. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. **Aquaculture**. 1998; 164: 351-358.
- Muralidhara KS, Sheggeby GG, and Elliker PR. Effect of feeding lactobacilli on the coliform and *Lactobacillus* flora of intestinal tissue and faeces from piglets. **J. Food. Protect.** 1977; 40: 188-215.
- New MB. Freshwater prawn culture : a review. **Aquaculture**. 1990; 88: 99-144.

- Ogle RB, and Inbarr J. **Alternative to low dose antibiotics in piglet feed in Sweden.** 38th meeting of the European Association for Animal Production, Portugal, Commission on Pig Production, Session 4; 1987.
- Ozawa K, Yokota H, Kimura M, and Mitsuoka T. Effect of administration of *Bacillus subtilis* BN on intestinal flora of weanling piglets. *Japan. J. V. Sci.* 1981; 13: 771-775.
- Ozawa K, Yabu-Ochi K, and Yamanaka K. Effect of *Streptococcus faecalis* BIO-4R on intestinal flora of weanling piglets and calves. *Appl. Environ. Microbiol.* 1983; 45: 1513-1516.
- Parker RB. Probiotic, the other half of the antibiotic story. *Anim. Nutr. Health.* 1974; 29: 4-8.
- Pedigon G, Alvarez S, Rachid M, Agüero G, and Gobbato N. Symposium: Probiotic bacteria for human: Clinical systems for evaluation of effectiveness, Immune system stimulation by probiotics. *J. Dairy Sci.* 1995; 78: 1597-1606.
- Pollman DS, Danielson DM, and Peo ER Jr. Effect of microbial feed additives on performance of starter and growing-finishing pigs. *J. Anim. Sci.* 1980a; 51: 577-581.
- Pollman DS, and Wren WB. Influence of *Lactobacillus acidophilus* inoculum on gnotobiotic and conventional pigs. *J. Anim. Sci.* 1980b; 51: 629-637.
- Pollman DS, and Peo ER Jr. Effect of *Lactobacillus acidophilus* on starter pigs fed a diet supplemented with lactose. *J. Anim. Sci.* 1980c; 51: 638-644.
- Pollman DS, Kennedy GA, Koch BA, and Allee GL. Influence of nonviable *Lactobacillus* fermentation product in artificially reared pigs. *Nutr. Rep. Int.* 1984; 29: 977-982.
- Rafter JJ. The role of lactic acid bacteria in colon cancer prevention. *Scand. J. Gastroenterol.* 1995; 30: 497-502.
- Rengpipat S, Phianphak W, Piyatiratitivorakul S, and Menasveta P. Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. *Aquaculture.* 1998a; 167: 301-313.
- Rengpipat S, Rukpratanporn S, Piyatiratitivorakul S, and Menasveta P. **Probiotics in Aquaculture :** A case study of probiotics for Larvae of the Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*). In Flegel, T.W. (ed.), *Advances in shrimp biotechnology.* National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok; 1998b.
- Riquelme C, Araya R, Vergara N, Rojas A, Guaita M, and Candia M. Potential probiotic strains in the culture of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Aquaculture.* 1997; 154: 17-26.

- Sachlan M. **Parasites and pests of *Macrobrachium rosenbergii* de Man and their control**. Report of the Training Course on Prawn Farming for Asia and the Pacific. 5 October-15 November 1980. Jepara, Central Java, Indonesia. Manila, South China Sea Fisheries Development and Coordinating Programme, 19980. FAO; 1980.
- Saman P, Sassanarakkit S, Boonsong P, Kraykaw D, Benno Y, and Suyanandana P. **New Effective Probiotics for Fresh Water Fish Culture**. Abstracts. 10th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and the 1998 Annual Meeting of the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology on BIOTECHNOLOGY FOR A SELF-SUFFICIENT ECONOMY, Bangkok, Thailand; 1998.
- Schillinger U, and Lucke FK. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated American Marine Aquaculture. **Elsevier**. Amsterdam. 1989; 42-47.
- Shang YC, and Fujimura T. The production economics of freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) farming in Hawall. **Aquaculture**. 1977; 11(2): 99-110.
- Sindermann CJ. Filamentous bacterial infestation (Leucothrix) In : Disease diagnosis and control in North American marine aquaculture. Developments in aquaculture and fisheries science. In C.J. Sindermann (ed.), Amsterdam-Oxford-New York, Elsevier Scientific Publishing Co, New York. 1977; 685-86.
- Sindermann CJ, and Lightner DV. Disease diagnosis and control in North American Marine Aquaculture. **Elsevier**. Amsterdam. 1988; 42-47.
- Smith P, and Savey S. Evidence for the competitive exclusion of *Aeromonas salmonicida* from fish with stress-inducible furunculosis by a fluorescent pseudomonad. **J. Fish Dis**. 1993; 16: 521-524.
- Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, and Holt JG. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore : Williams & Wilkins. 1986; 2.
- Tanner F W. The microbiology of foods. 2nd ed. Published in Champaign, Illinois: Garrard Press; 1944.
- Tannock GW. Genetic manipulation of gut microorganisms. In **probiotics : The scientific basis**. Ed. Fuller R. CHAPMAN & HALL. 1992; 181-207.
- Tannock GW. In Chapter eight : **Genetic manipulation of gut microorganisms. Probiotics : The scientific basis**. Ed. Fuller R. CHAPMAN & HALL. 1992; 181-207.

- Tortuero F. **Influence of implantation of *Lactobacillus acidophilus* in chicks on the growth, feed conversion, malabsorption of fats syndrome and intestinal flora.** Poultry. Sci. 1973; 52: 197-203.
- Yuthachit P, Vaoravuthikunchai S, and Sutinanalert P. **Studies of bacterial microbiota in the gastrointestinal tract of cultured tiger prawn (*penaeus monodon*).** Songklanakarin. J. Sci. Technol. 1990; 12: 151-157.

Output ที่ได้จากโครงการ

งานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโทของนายทะเบียน อุดุทธิ์ ซึ่งได้สำเร็จการศึกษาแล้วเมื่อปีการศึกษา 2544 ขณะนี้นายทะเบียน ได้ทำงานที่ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพทางด้านการแพทย์และสาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ในตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในปัจจุบันมีนักศึกษาในระดับปริญญาเอก กำลังทำการศึกษาต่อเนื่องจากผลที่ได้จากโครงการวิจัยนี้

การตีพิมพ์ผลงานวิจัยนี้ยังรอผลยืนยันการนำเชื้อที่แยกได้นี้ไปใช้เป็นโปรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม ซึ่งได้ทดลองไปแล้วหนึ่งรอบ และได้ผลเป็นที่น่าพอใจ ขณะนี้กำลังทดลองซ้ำ เพื่อยืนยันผลการทดลอง

רוג עלזער

ภาคผนวก ก
อาหารเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์

Nutrient agar

สารละลาย 1000.0 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนสารละลายมีปริมาตรครบ 1,000.0 มล.

ปรับ pH เป็น 6.8-7.0

Nutrient broth

สารละลาย 1000.0 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนสารละลายมีปริมาตรครบ 1,000.0 มล.

ปรับ pH เป็น 6.8-7.0

Potato dextrose agar

สารละลาย 1000.0 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

Potato	200.0	กรัม
Dextrose	20.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนสารละลายมีปริมาตรครบ 1,000.0 มล.

บรรจุอาหารใส่หลอดประมาณ 5 มล. นึ่งฆ่าเชื้อ เสร็จแล้ววางเอียงให้มีทั้งส่วนลึกตรงกันหลอดเล็กน้อย และส่วนบนเป็นผิวเอียง

Yeast extract malt extract medium

สารละลาย 1000.0 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

Yeast extract	3.0	กรัม
Malt extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Glucose	10.0	กรัม
Agar	20.0	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนสารละลายมีปริมาตรครบ 1,000.0 มล.

Gelatin agar

สารละลาย 1000.0 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Gelatin	6.0-8.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนสารละลายมีปริมาตรครบ 1,000.0 มล.

Motility medium (semi-solid medium)

สารละลาย 1000.0 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

Tryptose	10.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
Agar	5.0	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนสารละลายมีปริมาตรครบ 1,000.0 มล.

ปรับ pH เป็น 7.2

Nutrient gelatin

สารละลาย 1000.0 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Gelatin	120.0	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนสารละลายมีปริมาตรครบ 1,000.0 มล.

ปรับ pH เป็น 7.0

Peptone iron agar

สารละลาย 1000.0 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

Tryptone	3.0	กรัม
Ferric ammonium citrate	0.5	กรัม
K_2HPO_4	1.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนสารละลายมีปริมาตรครบ 1,000.0 มล.

Simmons citrate agar

สารละลาย 1000.0 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

$(NH_4) H_2PO_4$	1.0	กรัม
K_2HPO_4	1.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
Sodium citrate	2.0	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2	กรัม
Brom thymol blue	0.08	กรัม
Agar	15.0	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนสารละลายมีปริมาตรครบ 1,000.0 มล.

บรรจุอาหารใส่หลอดประมาณ 5 มล. ปิดฝาเชื้อ เสร็จแล้ววางเอียงให้มีทั้งส่วนลึกตรงกันหลอดเล็กน้อย และส่วนบนเป็นผิวเอียง

ภาคผนวก ข
สีและน้ำยาที่ใช้ทดสอบ

Gram stain

Crystal violet

สารละลาย A

Crystal violet (85% dry)	2.0	กรัม
--------------------------	-----	------

Ethyl alcohol 95%	20.0	มล.
-------------------	------	-----

ละลายสีในแอลกอฮอล์จนสีละลายหมด

สารละลาย B

Ammonium oxalate	0.8	กรัม
------------------	-----	------

น้ำกลั่น	80.0	มล.
----------	------	-----

ผสมสารละลาย A และสารละลาย B ฉ่ำมีตะกอนกรองก่อนการใช้ และถ้าสีเข้มเกินไป อาจเจือจางสารละลาย A เป็น 1: 10 ก่อนการผสมกับสารละลาย B

Safranin O counterstain (stock solution)

Safranin	2.5	กรัม
----------	-----	------

Ethyl alcohol 95%	100.0	มล.
-------------------	-------	-----

ถ้าจะใช้สีในการย้อมให้เจือจางเป็น 1: 10 (stock safranin 10 มล. ผสมกับน้ำกลั่น 90 มล.) ฉ่ำมีตะกอนกรองก่อนใช้ทุกครั้ง

Gram's iodine solution (mordant)

Iodine (crystal)	1.0	กรัม
------------------	-----	------

Potassium iodide (KI)	2.0	กรัม
-----------------------	-----	------

น้ำกลั่น	300.0	มล.
----------	-------	-----

ละลาย iodine และ KI ในน้ำกลั่นปริมาณน้อยๆ ก่อน แล้วคั้นน้ำให้ครบแล้วกับไว้ในขวดสีน้ำตาล

Alcohol-acetone (decolorizer)

Ethyl alcohol 95%	250.0	มล.
-------------------	-------	-----

Acetone	250.0	มล.
---------	-------	-----

Endospore stain

Malachite green	5.0	กรัม
-----------------	-----	------

น้ำกลั่น	100.0	มล.
----------	-------	-----

เมื่อละลายสีในน้ำกลั่นแล้ว พกมีตะกอนต้องกรองก่อนใช้ทุกครั้ง

น้ำยาทดสอบ

Indole test reagent (Ehrlich's method)

สารละลาย A

paradimethylaminobenzaldehyde	1.0	กรัม
Ethyl alcohol 95%	95.0	มล.

สารละลาย B

สารละลายอิ่มตัวของ $K_2S_2O_8$

วิธีทดสอบ : เติมสารละลาย A 1 มล. ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 มล. ตามด้วยการเติมสารละลาย B ลงไป 1 มล. ถ้ามีสีแดงเกิดขึ้นแสดงว่าผลการทดสอบเป็นบวก

Methyl red

Methyl red	0.1	กรัม
Ethyl alcohol 95%	300.0	มล.
น้ำกลั่น	200.0	มล.

Voges-Proskauer test reagents

วิธีที่ 1

สารละลาย A

$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	1.0	กรัม
NH_4OH	40.0	มล.

สารละลาย B

KOH	10.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มล.

ผสมสารละลาย A 40 มล. กับ สารละลาย B 960 มล.

วิธีทดสอบ : เติมสารละลายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณที่เท่ากัน ถ้าให้ผลบวกควรจะมีสีแดงเกิดขึ้นภายใน 20 นาที

วิธีที่ 2

สารละลาย A

Alpha naphthol	6.0	กรัม
Ethyl alcohol 95%	100.0	มล.

สารละลาย B

KOH	16.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มล.

วิธีทดสอบ : เติมสารละลาย A ลงในหลอด 0.5 มล. ตามด้วยการเติมสารละลาย B ลงไป 0.5 มล. ถ้าผลการทดสอบเป็นบวกจะเกิดสีแดงอมชมพู