



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยเรื่อง

การพัฒนาผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกที่มีคุณสมบัติในการควบคุมคุณภาพน้ำ ย่อยสลาย
ของเสีย บำบัดชี้เลนและควบคุมแบคทีเรียก่อโรคในการเลี้ยงกุ้งทะเลเศรษฐกิจ
(Development of probiotic product capable of controlling water quality,
biodegradation of waste, organic sludge treatment and controlling bacterial
pathogens in economic marine shrimps)

รองศาสตราจารย์ ดร. สุภัณฑิต นิ่มรัตน์
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
อำเภอมือทอง จังหวัดชลบุรี

ตุลาคม 2552

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยเรื่อง

การพัฒนาผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกที่มีคุณสมบัติในการควบคุมคุณภาพน้ำ ย่อยสลาย
ของเสีย บำบัดชีเลนและควบคุมแบคทีเรียก่อโรคในการเลี้ยงกุ้งทะเลเศรษฐกิจ
(Development of probiotic product capable of controlling water quality,
biodegradation of waste, organic sludge treatment and controlling bacterial
pathogens in economic marine shrimps)

รองศาสตราจารย์ ดร. สุภัททิ์ นิ่มรัตน์
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
อำเภอมือทอง จังหวัดชลบุรี

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
และสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่อง การพัฒนาผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกที่มีคุณสมบัติในการควบคุมคุณภาพน้ำ ย่อยสลายของเสีย บำบัดขี้เลนและควบคุมแบคทีเรียก่อโรคในการเลี้ยงกุ้งทะเลเศรษฐกิจ (Development of probiotic product capable of controlling water quality, biodegradation of waste, organic sludge treatment and controlling bacterial pathogens in economic marine shrimps) สำเร็จเรียบร้อยลงได้โดยได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2549 – 2552 ข้าพเจ้าได้จัดสรรงบประมาณเพื่อสนับสนุนวิทยานิพนธ์บางส่วนของนางสาวสุนิสา สุขสวัสดิ์ และนายไตรมาศ บุญไทย นิสิตภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ข้าพเจ้าขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา และภาควิชาวาริชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความอนุเคราะห์และอำนวยความสะดวกในการทดลองและอุปกรณ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในงานวิจัย

สุภัณฑิต นิมรัตน์

ตุลาคม 2552

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : RMU 5080020
ชื่อโครงการ : การพัฒนาผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกที่มีคุณสมบัติในการควบคุมคุณภาพน้ำ ย่อยสลายของเสีย บำบัดชีเลนและควบคุมแบคทีเรียก่อโรคในการเลี้ยงกุ้งทะเลเศรษฐกิจ
ชื่อนักวิจัย : รองศาสตราจารย์ ดร. สุภัตติ นิ่มรัตน์
สังกัดภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
E-mail Address : subunti@buu.ac.th
ระยะเวลาโครงการ : 3 ปี

การศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาการพัฒนาโพรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมคุณภาพน้ำ ย่อยสลายของเสีย บำบัดชีเลนและควบคุมแบคทีเรียก่อโรคในการเลี้ยงกุ้งทะเลเศรษฐกิจ โดยทำการศึกษาแบ่งออกเป็น 6 ขั้นตอน โดยขั้นตอนแรกทำการศึกษาถึงคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกทางการค้าที่จำหน่ายในประเทศไทยและต่างประเทศ จากการศึกษาพบว่าผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกจำนวน 11 ตัวอย่าง มีปริมาณแบคทีเรียน้อยกว่าปริมาณที่ระบุบนฉลาก และมีเพียงผลิตภัณฑ์เดียวเท่านั้นที่มีปริมาณแบคทีเรียใกล้เคียงกับปริมาณที่ระบุบนฉลาก แสดงให้เห็นว่าการใช้โพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่ไม่มีประสิทธิภาพในอดีตจะเป็นผลมาจากโพรไบโอติกที่มีปริมาณจุลินทรีย์น้อยกว่าที่ระบุบนฉลาก ต่อมาในขั้นตอนที่ 2 ได้ทำการแยกแบคทีเรียจากดินในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำและลำไส้กุ้งกุลาดำที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส อะไมเลสและไลเปสมาศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายแอมโมเนีย ไนเตรต ไนไตรต์ และฟอสเฟตภายในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำจำลอง พบว่ากลุ่มแบคทีเรียนี้สามารถย่อยสลายแอมโมเนีย ไนเตรต ไนไตรต์และฟอสเฟตให้อยู่ในระดับที่ไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อกุ้งกุลาดำและมีระดับต่ำกว่าชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมโพรไบโอติก ในขั้นตอนที่ 3 นำโพรไบโอติกกลุ่มดังกล่าวมาศึกษาความสามารถในการบำบัดชีเลนเปรียบเทียบกับวิธีการบำบัดชีเลนอื่นในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ พบว่าการตากแดดร่วมกับการพลิกเลนและเติมโพรไบโอติกเป็นวิธีการบำบัดชีเลนที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด โดยสามารถปรับพีเอชและปริมาณสารอินทรีย์ให้เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ และสามารถย่อยสลายสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ที่เป็นพิษได้ อีกทั้งยังสามารถกำจัดแบคทีเรียก่อโรคลกลุ่ม *Vibrios* และ *Pseudomonads* ได้เช่นเดียวกัน

ขั้นตอนที่ 4 นำกลุ่มโพรไบโอติกดังกล่าวมาศึกษาความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ พบว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับโพรไบโอติกรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์แช่แข็งมีอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นและอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อลดลงอย่างแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และการเลี้ยงกุ้งกุลาดำด้วยโพรไบโอติกรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์แช่แข็งไม่มีผลกระทบต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดหรือแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในระบบทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำ แต่สามารถควบคุมและลดปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrios* ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคของกุ้งกุลาดำได้

ขั้นตอนที่ 5 นำกลุ่มโพรไบโอติกดังกล่าวมาตรวจหา ยีนกลุ่ม *Subtilin* ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมการผลิต Antimicrobial peptide พบว่าแบคทีเรียดังกล่าวไม่มียีนกลุ่มนี้เป็นองค์ประกอบ และในขั้นตอนสุดท้ายเป็นการศึกษากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส อะไมเลสและไลเปสของโพรไบโอติกกลุ่มดังกล่าว โดยพบว่าโพรไบโอติกกลุ่มนี้มีกิจกรรมเอนไซม์เหล่านี้สูง ซึ่งให้เห็นว่าโพรไบโอติกกลุ่มนี้มีคุณสมบัติในการย่อยสลายสารอาหารประเภทโปรตีน คาร์โบไฮเดรตและไขมันซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในอาหารของสัตว์น้ำ จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าโพรไบโอติกที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกที่ดี เนื่องจากสามารถลดอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อและปริมาณแบคทีเรียก่อโรค โดยไม่มีผลกระทบต่อแบคทีเรียกลุ่มที่มีประโยชน์ต่อกุ้งกุลาดำ รวมทั้งส่งเสริมอัตราการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำและมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอินทรีย์และกำจัดแบคทีเรียก่อโรคในชีเลนที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำได้ แต่ควรทำการศึกษาถึงคุณสมบัติที่สำคัญอื่น ๆ ของโพรไบโอติกกลุ่มนี้ต่อไป เพื่อพัฒนาให้โพรไบโอติกมีประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเศรษฐกิจและให้ผลผลิตสัตว์น้ำของประเทศไทยมีคุณภาพสูงและยั่งยืนต่อไป

Keywords: โพรไบโอติก; กุ้งกุลาดำ; การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ; ยาปฏิชีวนะ; ชีเลน

Abstract

Project Code : RMU 5080020
Project Title : Development of probiotic product capable of controlling water quality, biodegradation of waste, organic sludge treatment and controlling bacterial pathogens in economic marine shrimps
Investigator : Associate Prof. Subuntith Nimrat
Department of Microbiology, Faculty of Science, Burapha University
E-mail Address : subunti@buu.ac.th
Project Period : 3 years

This purpose of this research was to develop the potential probiotic for controlling water quality, biodegradation of waste, organic sludge treatment and controlling bacterial pathogens in economic marine shrimps. The experiment was divided into 6 phases. In the first phase, the characteristics of probiotic products vended in domestic and foreign countries were examined. Results demonstrated that 11 probiotic products had the lowered bacterial number, compared to those in manufacturer's label. Only 1 sample in this study associated with the number of microbes cited on the probiotic product's label. This phenomenon indicated that the ineffective probiotic use in the past may be caused by the less of microbial load than those mentioned in commercial probiotic products. In the second phase, the potential bacteria were isolated from black tiger shrimp pond bottom soil and its intestine. They presented high protease, amylase and lipase activities and were capable for controlling water quality in term of lowering the levels of ammonia, nitrate, nitrite and phosphate in simulated shrimp ponds, compared to the controls. In the third phase, beneficial bacteria probiotics were studied for the effectiveness of stabilize pH, organic matter level and pathogenic bacteria removal in organic sludge, compared to other treatments. Drying in sun light, tilling and addition of probiotics showed high efficiency because this treatment improved pH, degraded hazardous organic and inorganic matter resulting in the quality of reared aquatic-animal water was ameliorated. Organic sludge dried in sunlight, tilled and added with probiotics annihilated shrimp pathogenic bacteria, *Vibrios* and *Pseudomonads*. In the forth phase, bacteria probiotics were evaluated for the effect on the promoting shrimp growth. Shrimp supplemented with live-spayed and freeze-dried presented higher growth rate and lower feed conversion ratio and was significantly difference ($p < 0.05$) with control group. As a consequence, bacteria probiotics did not affect on the change of total heterotrophic bacteria or beneficial bacteria and controlled the pathogenic *Vibrios*. In the fifth phase, bacteria probiotics were investigated for *Subtilin* genes, the gene that regulates antimicrobial peptide production in microbes. None of the tested bacteria probiotics exhibited the *Subtilin* genes. In the final phase, protease, amylase and lipase activities of beneficial bacteria probiotics were detected. All of probiotics showed high all three enzymes activities indicating that candidated probiotics were able to use protein, carbohydrate and lipid, the main compositions in aquatic-animal diets. As a consequence, bacteria probiotics in this study could be potential probiotics because of reducing food conversion ratio and shrimp pathogens, no effect on beneficial bacteria, advocating shrimp growth rate, deterioration of organic matter and elimination of shrimp pathogenic bacteria. In addition, the other crucial characteristics of probiotics should be studied further in order to develop the effective probiotic products. The novel product can support the important economic aquaculture for sustainability.

Keywords: Probiotics; Black tiger shrimp; Aquaculture; Antibiotics; Organic sludge

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	ii
บทคัดย่อ.....	iii
Abstract.....	iv
สารบัญ.....	v
สารบัญตาราง.....	vi
สารบัญภาพ.....	viii
บทที่	
1 ความสำคัญที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย.....	1
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	33
4 ผลการวิจัย.....	46
5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง.....	90
เอกสารอ้างอิง.....	104
Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.	119
ภาคผนวก.....	122

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	คุณภาพน้ำที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ.....	12
2	มาตรฐานน้ำทิ้งจากบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ.....	12
3	ความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ.....	16
4	ชนิดของโพรไบโอติกและการใช้โพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชนิดต่าง ๆ.....	22
5	ชนิดของโพรไบโอติกเพื่อควบคุมคุณภาพน้ำในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชนิดต่าง ๆ.....	24
6	องค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR.....	43
7	ขั้นตอนของปฏิกิริยา PCR.....	44
8	ปริมาณแบคทีเรียของผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกที่ผลิตในประเทศและนำเข้าจากต่างประเทศ.....	47
9	ชนิดของแบคทีเรียของผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกที่ผลิตในประเทศและนำเข้าจากต่างประเทศ.....	49
10	ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอาหารของผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก.....	50
11	ประสิทธิภาพในการย่อยสลายแอมโมเนีย ไนเตรต ไนไตรต์และฟอสเฟต โดยแบคทีเรียผสม 6 ชนิดภายในขวดซีรัม.....	52
12	เปอร์เซ็นต์การลดลงของแอมโมเนีย ไนเตรต ไนไตรต์และฟอสเฟต โดยการย่อยสลายของแบคทีเรียผสม 6 ชนิดภายในขวดซีรัม.....	53
13	คุณภาพน้ำทางกายภาพและทางเคมี ณ จุดเก็บตัวอย่างน้ำและดินตะกอนจากบ่อกุ้งกุลาดำ อำเภอราชสาส์น จังหวัดฉะเชิงเทรา.....	54
14	ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบไนโตรเจนและฟอสฟอรัสของแบคทีเรียผสม.....	55
15	ประสิทธิภาพการลดลงของสารประกอบไนโตรเจนและฟอสเฟตในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำจำลอง.....	57
16	พีเอชของซีเลนที่บำบัดด้วยวิธีการต่างกันในการทดลองรอบที่ 1.....	59
17	พีเอชของซีเลนที่บำบัดด้วยวิธีการต่างกันในการทดลองรอบที่ 2.....	61
18	ปริมาณอินทรีย์วัตถุของซีเลนที่บำบัดด้วยวิธีการแตกต่างกันในการทดลองรอบที่ 1.....	63
19	ปริมาณอินทรีย์วัตถุของซีเลนที่บำบัดด้วยวิธีการแตกต่างกันในการทดลองรอบที่ 2.....	65
20	ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม Vibrios (การทดลองรอบที่ 1).....	67

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
21	ปริมาณ <i>V. parahaemolyticus</i> ในตัวอย่างซีเลนที่บำบัดด้วยวิธีการต่างกัน ในการทดลองรอบที่ 1.....	68
22	ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม Pseudomonads (การทดลองรอบที่ 1).....	70
23	ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม Pseudomonads (การทดลองรอบที่ 2).....	72
24	ปริมาณ <i>Ps. aeruginosa</i> ในตัวอย่างซีเลนที่บำบัดด้วยวิธีการต่างกันใน การทดลองรอบที่ 1.....	73
25	ปริมาณ <i>Ps. aeruginosa</i> ในตัวอย่างซีเลนที่บำบัดด้วยวิธีการต่างกันใน การทดลองรอบที่ 2.....	74
26	คุณภาพน้ำที่ใช้ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ.....	76
27	การเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ.....	80
28	กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส อะไมเอสและไลเปสจากแบคทีเรียที่มีแนวโน้ม เป็นโพรไบโอติก.....	89

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะและสีของกุ้งกุลาดำ.....	5
2	รูปแบบการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำระบบเปิด.....	10
3	รูปแบบการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำระบบปิด.....	10
4	รูปแบบการเพาะเลี้ยงกุ้งแบบระบบหมุนเวียนน้ำกลับมาใช้ใหม่.....	11
5	แผนภาพแสดงการเปลี่ยนแปลงของปริมาณก๊าซออกซิเจน และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และค่าความเป็นกรด-ด่างที่ช่วง เวลาต่างๆ.....	15
6	จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก.....	21
7	น้ำหนักกุ้งกุลาดำตลอดระยะเวลาการทดลอง 90 วัน.....	77
8	ความยาวของกุ้งกุลาดำตลอดระยะเวลาการทดลอง 90 วัน.....	78
9	ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดของกุ้งกุลาดำตลอดระยะเวลาการทดลอง 90 วัน.....	82
10	ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม <i>Vibrios</i> ของกุ้งกุลาดำตลอดระยะเวลาการ ทดลอง 90 วัน.....	84
11	ปริมาณ <i>Bacillus</i> spp. ของกุ้งกุลาดำตลอดระยะเวลาการทดลอง 90 วัน.....	86
12	ลักษณะแบนของ Genomic DNA ของแบคทีเรียโพรไบโอติก.....	87
13	ลักษณะแบนของ Genomic DNA ของ A2.....	87
14	ลักษณะแบนของ Genomic DNA ของ A4.2.....	88

บทที่ 1

ความสำคัญที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ความสำคัญที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

สัตว์น้ำเป็นสินค้าการเกษตรที่สำคัญของประเทศไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งกุ้งกุลาดำ จัดเป็นกุ้งทะเลเศรษฐกิจที่สำคัญเพราะเป็นสินค้าส่งออกทำรายได้ให้ประเทศไทยปีละเกือบแสนล้านบาท (Department of Fisheries, 2000) อีกทั้งความต้องการบริโภคกุ้งทะเลเศรษฐกิจในตลาดโลกที่สูงขึ้นส่งผลทำให้การเลี้ยงกุ้งกุลาดำต้องเลี้ยงในระบบปิดที่มีการปล่อยลูกกุ้งจำนวนมากพร้อมกับให้อาหารกุ้งอย่างเต็มที่เพื่อเร่งเพิ่มผลผลิต แต่ระบบการเลี้ยงแบบพัฒนาดังกล่าวมีข้อเสียตามมาอย่างมากมายคือ ทำให้คุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำเสื่อมโทรมอย่างรวดเร็วในระหว่างการเลี้ยงเนื่องจากการเลี้ยงแบบระบบปิดไม่มีการเปลี่ยนน้ำใหม่ทำให้โปรตีนในอาหารเม็ดที่กุ้งกินเหลือให้กลายเป็นสารประกอบไนโตรเจนแอมโมเนียและไนไตรต์สะสมในดินพื้นบ่อรวมทั้งในน้ำเพาะเลี้ยง ซึ่งสารพิษดังกล่าวจะทำให้กุ้งเกิดความเครียด และทำให้เกิดการติดเชื้อก่อโรคได้ง่าย ทำให้เกิดโรคและกุ้งมีอัตราการตายที่สูง รวมทั้งก่อให้เกิดโรคระบาดในการเพาะเลี้ยงกุ้ง ดังเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นในการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำในระยะเวลา 4-6 ปีที่ผ่านมา (สุภันทิต นิมรรัตน์ และคณะ, 2550a; Lin & Nash, 1996; Shang et al., 1998; Gross et al., 2003)

นอกจากนั้นในการเลี้ยงแบบพัฒนาจะมีการสะสมของเสีย (เช่น ขี้กุ้ง รวมทั้งเศษอาหารที่เหลือ) หรือที่เรียกว่า ขี้เลน ภายในบ่อมากขึ้นเนื่องจากระบบการเลี้ยงแบบที่ให้อาหารแบบเต็มที่และไม่มีการเปลี่ยนน้ำในบ่อซึ่งการสะสมของเสียจะมีผลให้มีการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียก่อโรคมมากขึ้นโดยเฉพาะแบคทีเรียก่อโรคชนิดต่างๆ เช่น *V. parahaemolyticus* เป็นต้น และมีสารประกอบไนโตรเจนที่เป็นพิษต่อกุ้งดังกล่าวข้างต้นสะสมในบ่อเลี้ยงมากขึ้น ดังนั้นควรมีกระบวนการบำบัดขี้เลนก่อนการเพาะเลี้ยงในรอบต่อไปเนื่องจากการสะสมของเสียและจุลินทรีย์ก่อโรค ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว มิฉะนั้นจุลินทรีย์ก่อโรคที่สะสมจะทำให้การเพาะเลี้ยงในรอบต่อไปมีโอกาสในการติดโรคและการระบาด รวมทั้งตามธรรมชาติของกุ้งทะเลจะมีการฝังตัวอยู่ในดินพื้นบ่อถ้ามีการสะสมขี้เลนในดินพื้นบ่อจะทำให้การป้องกันโรคของกุ้งเป็นไปได้ยากเนื่องกุ้งทะเลจะฝังตัวอยู่ในดินซึ่งจะทำให้เกิดการติดโรคได้มากถ้าไม่มีการกำจัดจุลินทรีย์ก่อโรคดังกล่าวก่อนที่ทำการเพาะเลี้ยงในรอบต่อไป

จากกระบวนการการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบพัฒนาในประเทศไทยทำให้เกิดโรคระบาดของโรคกุ้งกุลาดำในจังหวัดต่างๆในช่วง 4-6 ปีที่ผ่านมา (สุภันทิต นิมรรัตน์ และคณะ, 2550b) และเมื่อมีการเกิดโรคระบาดจึงต้องมีการนำยาปฏิชีวนะมาใช้เพื่อป้องกันและรักษาโรคที่เกิดในการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล แต่อย่างไรก็ตามยาปฏิชีวนะเป็นสารที่มีผลกระทบตามมามากมายรวมทั้งเป็นสารที่ต้องไม่พบในกุ้งทะเลที่ส่งออกไปยังประเทศผู้นำเข้ากุ้ง ซึ่งในยุโรปและอเมริกาได้ต่อต้านและไม่ยอมรับสินค้าที่มีการปนเปื้อนยาปฏิชีวนะ ดังนั้นเพื่อทำให้การเพาะเลี้ยงกุ้ง

ทะเลเศรษฐกิจในประเทศไทยมีความยั่งยืนและไม่มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและเกษตรกรผู้เลี้ยงที่ต้องอาศัยน้ำจากแหล่งน้ำตามธรรมชาติในการเพาะเลี้ยงจำเป็นต้องใช้วิธีทางชีวภาพในการควบคุมคุณภาพน้ำ ลดของเสีย บำบัดชีเลนและควบคุมเชื้อก่อโรคในการเลี้ยงกุ้งทะเลเศรษฐกิจ ในปัจจุบันการใช้โพรไบโอติกเป็นวิธีทางชีวภาพที่ได้รับความนิยมอย่างมากเนื่องจากเป็นวิธีที่ไม่มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและระบบนิเวศในบ่อเลี้ยงกุ้งทะเลและยังช่วยในการบำบัดน้ำที่ปล่อยออกจากบ่อเลี้ยงหลังจากการจับกุ้งออกไปแล้ว

จากนิยามของคำว่าโพรไบโอติกที่มีความหมายหลากหลายมากขึ้นทำให้โพรไบโอติกหมายถึงสิ่งมีชีวิตหรือจุลินทรีย์หรือผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์ที่ไม่ก่อโรคต่อคน สัตว์และสิ่งแวดล้อมและสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ 2 ประเภทคือ นำมาผสมกับอาหารสัตว์เพื่อเพิ่มความต้านทานโรคหรือเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยอาหารซึ่งเป็นนิยามที่ทราบกันโดยทั่วไป (Nemcova et al., 1997; Salminen et al., 1999; Ronnestad et al., 1999; Gatesoupe, 1999) และชนิดที่ 2 คือการนำมาเติมในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเพื่อควบคุมคุณภาพน้ำและคุณภาพดินในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำหรือที่เรียกว่า Remediation agent (Vadstein et al., 1993; Skjermo and Vadstein, 1999; Gatesoupe, 1999; Panigrahi et al., 2005) โพรไบโอติกที่ได้นำมาใช้ในปัจจุบันได้แก่ แบคทีเรียกลุ่ม Vibrionaceae, Pseudomonads, Lactic acid bacteria, *Bacillus* spp. และยีสต์ (Gatesoupe, 1999; Nimrat et al., 2008)

การใช้โพรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพเพื่อใช้ในการควบคุมการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลต้องอาศัยคุณสมบัติทั้ง 4 ประการคือ การควบคุมคุณภาพน้ำ ลดของเสีย บำบัดชีเลนและควบคุมเชื้อก่อโรคในการเลี้ยงกุ้งทะเลเศรษฐกิจ ซึ่งจะส่งผลให้การเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลเศรษฐกิจได้ผลผลิตเพิ่มขึ้นคือ มีน้ำหนักเพิ่มขึ้นและมีอัตราการรอดตายที่สูงโดยไม่มีการเกิดโรค แต่อย่างไรก็ตามในปัจจุบันโพรไบโอติกที่มีใช้ในท้องตลาดทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศมีข้อจำกัดดังนี้คือ โพรไบโอติกที่มีใช้ในปัจจุบันมักมีคุณสมบัติเพียงบางประการในคุณสมบัติที่ต้องการทั้ง 4 ประการทำให้ต้องมีการซื้อหาโพรไบโอติกจำนวนอย่างน้อย 4 ชนิดและต้องมีการใช้ที่แตกต่างกันไปตามสภาวะของการเปลี่ยนแปลงในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำซึ่งทำให้เกิดความยุ่งยากต่อเกษตรกรผู้ใช้อย่างมากเพราะต้องทำการตรวจวัดและวิเคราะห์ข้อมูลก่อนที่จะทำการเติมโพรไบโอติกแต่ละชนิด ดังนั้นการใช้โพรไบโอติกที่มีคุณสมบัติเพียงบางประการจะทำให้เกษตรกรยากต่อการทราบสภาวะว่าต้องใช้แบคทีเรียชนิดใด ณ เวลาใด รวมทั้งถ้ามีการใช้ที่ไม่ถูกต้องตามสภาวะจะทำให้การใช้ผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกดังกล่าวไม่มีประสิทธิภาพตามที่ต้องการ ทำให้สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายโดยที่ไม่ทำให้ผลผลิตเพิ่มขึ้นเลย (Moriarty, 1998) ข้อจำกัดประการที่ 2 ของการใช้ผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกทั้งในประเทศไทยและจากต่างประเทศในปัจจุบันคือคุณสมบัติและปริมาณจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ที่ต่ำกว่าที่ได้ทำการโฆษณาข้างขวดผลิตภัณฑ์ดังกล่าวการศึกษาของสุภนิต นิมรัตน์ และคณะ (2550a) ทำให้เกิดความไม่แน่ใจถึงประสิทธิภาพในการใช้ผลิตภัณฑ์ดังกล่าวในการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลของเกษตรกรไทย ส่วนข้อจำกัดประการที่ 3 คือ ผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกจากต่างประเทศนั้นนอกจากจะมีราคาแพง

แล้วและพบว่ามีความสัมพันธ์และปริมาณจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ที่ต่ำกว่าที่ได้ทำการโฆษณาข้างขวดผลิตภัณฑ์ดังกล่าวมาแล้ว อีกประการหนึ่งคือจากการคัดแยกและศึกษาผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกจากต่างประเทศซึ่งได้พัฒนาขึ้นมาในสภาพอากาศที่แตกต่างจากประเทศไทยอย่างสิ้นเชิงน่าจะทำให้ประสิทธิภาพของโพรไบโอติกดังกล่าวเมื่อนำมาใช้ในประเทศไทยน่าจะมีประสิทธิภาพที่ไม่ดีนักทำให้ไม่คุ้มค่าต่อค่าใช้จ่ายที่สูง (สุบัญญัติ นิมรัตน์ และคณะ, 2550a)

จากเหตุผลที่กล่าวมาข้างต้น คณะผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่พัฒนาผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกที่แยกจากประเทศไทยที่มีความสัมพันธ์ครบทั้ง 4 ประการคือ การควบคุมคุณภาพน้ำ ลดของเสีย บำบัดขี้เลนและควบคุมเชื้อก่อโรคในการเลี้ยงกุ้งทะเลเศรษฐกิจ ซึ่งจะนำไปสู่ผลิตภัณฑ์ลักษณะดังกล่าวจำหน่ายในท้องตลาดที่ผ่านกระบวนการวิจัยที่เปิดเผยได้ในประเทศไทยและเพื่อที่จะทำให้กุ้งทะเลของไทยมีผลผลิตที่คุ้มทุน กุ้งมีอัตราการรอดสูงและทำให้การเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลอย่างยั่งยืนโดยสามารถลดมลภาวะของน้ำที่ปล่อยออกมาจากบ่อเลี้ยงกุ้ง นอกจากนี้ถ้าสามารถพัฒนาการผลิตโพรไบโอติกที่มีความสามารถทั้ง 4 ประการด้วยแบคทีเรียกลุ่มเดียวนั้นจะทำให้การใช้โพรไบโอติกมีความสะดวก ราคาถูกและมีประสิทธิภาพเหมาะต่อการใช้ภายในประเทศไทยและประเทศอื่นๆที่มีภูมิประเทศและภูมิอากาศใกล้เคียงกัน และโพรไบโอติกที่จะนำมาใช้นั้นจะมีการพัฒนาประสิทธิภาพที่ดีขึ้นเนื่องจากการศึกษาการใช้ทั้งในห้องปฏิบัติการและบ่อจำลอง และยังได้มีการศึกษาถึงความรู้เชิงลึกเพื่อพัฒนาองค์ความรู้ใหม่ทั้งในด้านยีนและเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญต่อคุณสมบัติทั้ง 4 ประการซึ่งองค์ความรู้ดังกล่าวจะนำมาซึ่งการพัฒนาศักยภาพของโพรไบโอติกกลุ่มนี้ให้มีประสิทธิภาพให้ดีขึ้นในอนาคต

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาจำแนกได้เป็น 8 หัวข้อ ได้แก่

1. ชีวิตวิทยาและลักษณะทั่วไปของกุ้งกุลาดำ
2. อนุกรมวิธานของกุ้งกุลาดำ
3. การพัฒนาการของกุ้งกุลาดำ
4. ลักษณะของการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ
5. คุณภาพน้ำในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ
6. ดินพื้นบ่อและการสะสมชีเลนในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ
7. โพรไบโอติก
8. รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ชีวิตวิทยาและลักษณะทั่วไปของกุ้งกุลาดำ

กุ้งกุลาดำเป็นกุ้งขนาดใหญ่ มีกริยาวเรียวโค้งขึ้นลักษณะเป็นรูปซีกมอยด์ ปลายกริสิ้นสุดบริเวณปลายก้านหนวดคู่ที่ 1 ขอบด้านบนมีฟัน 7-8 ซี่ ขอบด้านล่างมีฟัน 3 ซี่ สันหลังกริยาวเกือบถึงด้านหลังเปลือกคลุมหัว สันข้างกริยาวประมาณฟันกริที่อยู่เหนือกระเพาะอาหาร ไม่มีเอกโซโปไดต์ (Exopodite) ลำตัวมีสีซึ่งอาจเปลี่ยนแปลงได้ตามขนาดหรือสภาพแวดล้อม เช่น สีน้ำตาลเข้มแถบน้ำเงิน สีน้ำเงินแถบม่วง สีแดงคล้ำ สีม่วงหรือสีเทา บริเวณปล้องท้องจะมีแถบสีดำหรือเทาเข้มพาดขวางหรือสลับกับสีขาว ขาววายน้ำมีสีน้ำตาลปนน้ำเงินส่วนโคนแต้มสีขาว ส่วนปลายมีขนสีแดงอยู่โดยรอบ ขาเดินมีสีแดงดำ มีสีขาวอยู่ประปราย แพนหางและหางมีสีแดงกับลำตัว หนวดคู่ที่ 2 มีสีดำ มีลายแต่เห็นไม่ชัดเจน โดยทั่วไปกุ้งที่พบมีความยาวลำตัวทั้งหมดระหว่าง 80-377 มิลลิเมตร (บุญรัตน์ ประทุมชาติ, 2546) **ดังภาพที่ 1** พบได้ทั่วไปตามฝั่งทะเลของประเทศไทย มาเลเซีย สิงคโปร์ ฟิลิปปินส์ อินโดนีเซีย ออสเตรเลีย ไต้หวัน อินเดีย ศรีลังกาและญี่ปุ่น (ประจวบ, 2527) และเป็นกุ้งทะเลที่นิยมนำมาเพาะเลี้ยงทั่วโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศไทย ไต้หวัน ฟิลิปปินส์และอินโดนีเซีย (Kongkeo, 1997; Chen and Lin, 1992) สำหรับประเทศไทยจังหวัดที่มีการเลี้ยงกุ้งชนิดนี้มากได้แก่ จันทบุรี ตราด ระยอง สุราษฎร์ธานี ปัตตานี สงขลา และจังหวัดแถบชายฝั่งทะเลอันดามัน เช่น ระนอง สตูล ภูเก็ต กุ้งกุลาดำนิยมเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายเนื่องจากสามารถเพาะเลี้ยงให้เจริญเติบโตในบ่อได้ดี โตเร็ว ทนทานต่อการขนส่งได้ดี มีขนาดใหญ่ กินอาหารได้ตลอดเวลา ไม่ตื่นตกใจง่าย และสามารถเลี้ยงแบบหนาแน่นได้ (ประจวบ, 2531; Chen *et al.*, 1989) กุ้งกุลาดำจัดเป็นสัตว์ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจจึงได้มีการวิจัยพัฒนากระบวนการที่ช่วยในการเลี้ยงกุ้งให้ได้ผลผลิตสูงและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม (Nimrat *et al.*, 2003) รวมทั้งเพื่อเป็นการเพิ่มผลผลิตให้เพียงพอต่อความต้องการของผู้บริโภคในประเทศและการส่งออกไปยังต่างประเทศ

(ที่มา : <http://kanchanapisek.or.th/kp6/BOOK13/chapter10/t13-10-s.htm>)

2. อหุกรรมวิธานของกัณฑ์กุลาดำ

กุ้งกุลาดำเป็นกุ้งที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในวงศ์ปีนังไอดี (Penaeidae) และอนุกรมวิธานของ กุ้งกุลาดำเป็นดังนี้ (ประจวบ หล้าอุบล, 2527)

Phylum Artropoda

Class Crustacea

Order Decapoda

Suborder Natantia

Tribe Penaeidea

Family Penaeidae

Genus *Penaeus*Species *monodon*

กุ้งกุลาดำมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Penaeus monodon* Fabricius และมีชื่อสามัญว่า Giant tiger prawn กุ้งกุลาดำ กุ้งทะเล กุ้งเสือดำนก กุ้งเสื่อ กุ้งลาย

3. การพัฒนาการของกุ้งกุลาดำ

การพัฒนาการของกุ้งกุลาดำสามารถแบ่งออกเป็นระยะต่าง ๆ ดังนี้ (บุญรัตน์ ประทุมชาติ, 2546)

3.1 ระยะหอยเฟลียส (Nauplius stage)

ลูกกุ้งที่ฟักออกมาจากไข่ใหม่ ๆ จะมีขนาดเล็กมาก รูปร่างค่อนข้างกลม มีรยางค์ 3 คู่ คู่แรกจะเจริญเป็นหนวดคู่สั้น (1st Antenna) อยู่ด้านหัวสุด รยางค์คู่ที่ 2 จะเจริญเป็นหนวดคู่ยาว (2nd Antenna) และคู่ที่ 3 จะเจริญเป็นขากรรไกร (Mandible) อยู่ต่ำลงมาตามลำดับ ระยะนี้ลูกกุ้งจะไม่กินอาหาร เนื่องจากได้อาหารจากถุงไข่แดง (Yolk sac) ที่ติดตัวมา ลูกกุ้งจะอยู่ในระยะนี้ประมาณ 45-50 ชั่วโมง มีการลอกคราบ 6 ครั้ง

3.2 ระยะซุเอีย (Zoea stage)

ลูกกุ้งจะมีลำตัวยาวขึ้น ส่วนหัวโตเห็นได้ชัด ลูกกุ้งจะค่อย ๆ ลอยตัวขึ้นสู่ผิวน้ำและเริ่มกินอาหาร อาหารของลูกกุ้งในระยะนี้ส่วนใหญ่เป็นกลุ่มแพลงก์ตอนพืชขนาด 50-100 ไมโครเมตร จะอยู่ในระยะนี้ประมาณ 4 วัน ลอกคราบ 3 ครั้ง แต่ละครั้งรูปร่างจะเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม

3.3 ระยะไมซิส (Mysis stage)

ลูกกุ้งในระยะนี้มีลักษณะคล้ายพ่อแม่มากขึ้น สามารถมองเห็นส่วนหัวและส่วนท้องได้อย่างชัดเจน ส่วนนอกนั้นยังรวมอยู่กับส่วนหัวมีเปลือกคลุม กริเห็นได้ชัด ส่วนท้องมี 6 ปล้อง ปล้องที่ 1 ถึงปล้องที่ 5 มีขนาดเท่ากัน ส่วนปล้องที่ 6 ยาวกว่าปล้องอื่น ๆ และมีแพนหาง ลำตัว (วัดจากปลายกริถึงปลายหาง) ยาว 2.56 มิลลิเมตร ขาสำหรับการเดินเริ่มมีข้อปล้องเห็นชัดขึ้น ขา 3 คู่แรกจะมีลักษณะคล้ายก้ามและค่อย ๆ ยาวขึ้นเรื่อย ๆ ขาวายน้ำเริ่มเกิด ปล้องท้องอันที่ 6 จะยาวกว่าลูกกุ้งที่อยู่ในระยะที่ 2 เปลือกคลุมปล้องต่าง ๆ ของส่วนนอกทั้งหมดยาว 1.0 มิลลิเมตร รยางค์คู่ที่ 6 (Uropod) เจริญมากขึ้น หางจะแคบเข้ามามีขนข้างละ 7 เส้น ลูกกุ้งจะอยู่ในระยะนี้ประมาณ 3-5 วัน ลอกคราบ 3 ครั้ง จึงจะพัฒนาการเข้าสู่ระยะโพสลาวา

3.4 ระยะโพสลาวา (Post-larva stage)

ระยะนี้ลูกกุ้งจะมีลำตัวยาวประมาณ 5.56 มิลลิเมตร เปลือกคลุมส่วนหัวยาวประมาณ 1.57 มิลลิเมตร ขาเดิน 3 คู่ มีลักษณะเป็นก้าม มองเห็นชัด คู่แรกสั้นและคู่ที่ 3 ยาวที่สุด หางจะแคบเข้าจนแหลม ลูกกุ้งในระยะนี้เริ่มมีรยางค์คราบเหมือนกุ้งเต็มวัย ลูกกุ้งจะพัฒนาการไปเรื่อย ๆ จนเข้าสู่กุ้งวัยรุ่น กุ้งจะอยู่ในระยะนี้ประมาณ 30 วัน มีความยาวประมาณ 1.5-2.0 เซนติเมตรหนักประมาณ 1.01-1.02 กรัม

4. ลักษณะของการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

การเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำในแต่ละประเทศจะมีลักษณะการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกันตามภูมิประเทศและภูมิอากาศที่เหมาะสม ซึ่งการเลี้ยงกุ้งกุลาดำในประเทศไทยแม้ว่าจะมีการพัฒนารูปแบบและวิธีการเลี้ยงอย่างต่อเนื่องในช่วงระยะเวลา 10 ปีที่ผ่านมา แต่การจัดการเกี่ยวกับสภาวะแวดล้อมในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำยังไม่ได้มีการนำเทคโนโลยีใหม่ๆ เข้ามาช่วยบรรเทาปัญหาหมกหมวนหรือการควบคุมคุณภาพน้ำที่เกิดจากการเลี้ยงกุ้งกุลาดำอย่างเพียงพอ ดังนั้นเพื่อเป็นการเข้าใจถึงข้อดีและข้อเสียของการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำแต่ละรูปแบบ จึงขอกล่าวถึงรูปแบบของการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำในประเทศไทย ซึ่งการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำมีได้หลากหลายรูปแบบขึ้นอยู่กับความต้องการผลผลิตและความรวดเร็วในการเลี้ยง โดยสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่

4.1 การแบ่งรูปแบบการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลตามความหนาแน่นและการประยุกต์ใช้เทคนิคต่าง ๆ (Shang *et al.*, 1998) สามารถแบ่งได้ 3 ประเภท ได้แก่

4.1.1 การเพาะเลี้ยงแบบดั้งเดิม (Extensive production system)

การเพาะเลี้ยงกุ้งแบบดั้งเดิมเป็นการเพาะเลี้ยงกุ้งที่มีการพัฒนาวิธีการเลี้ยงจากสมัยโบราณน้อยมากจึงเรียกวิธีนี้ว่า การเพาะเลี้ยงแบบหนาแน่นต่ำ (Low-density system) และเป็นการเพาะเลี้ยงที่มีการลงทุนต่ำ (Low-input system) โดยการระบายน้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติเข้าหากุ้งซึ่งจะได้ลูกกุ้งจากแหล่งน้ำธรรมชาติ การเพาะเลี้ยงรูปแบบนี้ให้ผลผลิตต่ำเนื่องจากอาจมีศัตรูของกุ้ง เช่น ปู หอย ลูกปลาปะปนมากับน้ำ ไม่มีการให้อาหารเม็ด ไม่มีการใช้เครื่องเติมอากาศและระยะเวลาการเลี้ยงไม่แน่นอน แต่อาจจะมีการเติมปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยอินทรีย์เพื่อเพิ่มปริมาณอาหารตามธรรมชาติให้กุ้ง (Muluk and Baily, 1996) บ่อกุ้งที่ใช้เลี้ยงมีตั้งแต่ 10 – 1,000 ไร่ และให้ผลผลิตประมาณ 200-300 กิโลกรัมต่อเฮกเตอร์ต่อปี และมักเป็นพื้นที่ติดชายทะเลหรือเป็นพื้นที่ป่าชายเลน ซึ่งประเทศที่ยังมีการเลี้ยงกุ้งแบบดั้งเดิมได้แก่ ประเทศบังคลาเทศซึ่งเรียกระบบการเลี้ยงลักษณะนี้ว่าระบบ Gher (Gher systems; Wahab *et al.*, 2003)

ปัจจุบันในประเทศไทยการเพาะเลี้ยงกุ้งด้วยวิธีนี้เกือบไม่มีเหลือแล้ว ซึ่งกุ้งที่นิยมนำมาเพาะเลี้ยงแบบดั้งเดิม ได้แก่ กุ้งตะกาด กุ้งแชบ๊วย กุ้งแป๊ะแห กุ้งหัวมันหรือกุ้งหลังไข การเพาะเลี้ยงแบบดั้งเดิมเป็นวิธีการเลี้ยงที่มีปริมาณการปนเปื้อนของสารอาหารในน้ำที่น้อย (Muluk and Baily, 1996) แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Burford และคณะ (2003) พบว่าการเลี้ยงกุ้งแบบดั้งเดิมจะมีปริมาณสารอินทรีย์มาก ซึ่งจะส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรฟที่มีการใช้ออกซิเจนในปริมาณมากจึงอาจมีผลยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่ลดปริมาณแอมโมเนียที่เป็นอันตราย นอกจากนี้การเลี้ยงด้วยวิธีนี้จะมีการสะสมของซีเลนมากซึ่งก่อให้เกิดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ และมีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มไนโตรไฟเอร์ ส่งผลให้การผลิตไนเตรตที่เป็นสารตั้งต้นของการเกิดปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชันเคชันลดลง

4.1.2 การเพาะเลี้ยงแบบกึ่งพัฒนา (Semi-intensive production system)

การเพาะเลี้ยงแบบกึ่งพัฒนาเป็นวิธีการเพาะเลี้ยงกึ่งธรรมชาติผสมกับการให้อาหารเสริมและอาหารสด เช่น อาร์ทีเมีย หอยสับหรือให้อาหารเม็ดชนิดโปรตีนสูง อาจมีการใช้เครื่องเติมอากาศบ้าง บ่อกึ่งมีขนาดตั้งแต่ 15 – 60 ไร่ต่อบ่อ การเพาะเลี้ยงรูปแบบนี้เป็นการนำพันธุ์กุ้งจากบ่ออนุบาลกึ่งไปปล่อยรวมกับลูกกุ้งในบ่อกึ่งแบบธรรมชาติ มีอัตราการปล่อยลูกกุ้ง 5,000 – 8,000 ตัวต่อไร่ ซึ่งการเลี้ยงกึ่งแบบนี้ต้องมีการควบคุมคุณภาพน้ำในบ่อ เพราะอาจมีปัญหาหน้าเสียได้ถ้ามีการให้อาหารมากเกินไป จึงต้องให้อาหารอย่างพอเหมาะเพื่อไม่ให้อาหารเหลือตกค้างในบ่อและต้องเปลี่ยนถ่ายน้ำบ่อยๆ ประมาณ 10 – 50% ต่อวัน ซึ่งในกรณีที่น้ำมีความเค็มต่ำกว่า 10 ส่วนในพันส่วน ลูกกุ้งจะโตช้า เปลือกนึ่มและตายได้ (กองเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง, 2534; Wahab *et al.*, 2003) ในประเทศในเอเชียส่วนใหญ่ (มากกว่า 90%) มักจะเพาะเลี้ยงกึ่งแบบดั้งเดิมและแบบกึ่งพัฒนา (Shang *et al.*, 1998) แต่ยกเว้นประเทศไทยมีการเพาะเลี้ยงทั้ง 2 แบบเพียง 15 %

4.1.3 การเลี้ยงแบบพัฒนา (Intensive production systems)

การเพาะเลี้ยงแบบพัฒนาเป็นการเพาะเลี้ยงที่ปล่อยลูกกุ้งหนาแน่นมากและมีการลงทุนสูง (High density and high inputs; Shang *et al.*, 1998) การเลี้ยงรูปแบบนี้เริ่มขึ้นในช่วงปี พ.ศ. 2524 – 2525 ซึ่งเป็นระบบการเพาะเลี้ยงที่ได้ผลผลิตมากกว่าการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งพัฒนาและแบบดั้งเดิม (Rosenberry, 1996) ประเทศไทยนิยมเลี้ยงกึ่งแบบพัฒนาประมาณ 85% ของฟาร์มเพาะเลี้ยงทั้งหมด สำหรับกุ้งที่นิยมนำมาเพาะเลี้ยงแบบพัฒนาได้แก่ กุ้งกุลาดำ กุ้งแชบ๊วย และกุ้งขาวแวนนาไม (ประจวบ, 2531) การเพาะเลี้ยงรูปแบบนี้เป็นการนำลูกกุ้งจากบ่อเพาะเลี้ยงหรือบ่ออนุบาลกึ่งมาเลี้ยงในบ่อดิน ร่วมกับการใช้อุปกรณ์เทคนิคและการจัดการบ่อเพาะเลี้ยงที่ดี ทำให้ผลผลิตมีปริมาณเพิ่มขึ้น มีอัตราการปล่อยลูกกุ้ง 10 – 30 ตัวต่อตารางเมตร ให้อาหารเม็ด 5 – 6 มื้อต่อวัน และมีการใช้เครื่องเติมอากาศ น้ำในบ่อเลี้ยงควรมีความลึกไม่ต่ำกว่า 1.50 เมตร เพื่อช่วยชะลอการเปลี่ยนแปลงความเค็มและอุณหภูมิของน้ำ เพราะในช่วงที่อากาศร้อนจัดอุณหภูมิจะเปลี่ยนแปลงมาก กุ้งจะเกิดการงอตัวและการเกร็งของกล้ามเนื้อทำให้กุ้งช็อกตายได้ รวมทั้งบ่อที่มีระดับน้ำต่ำมากทำให้แสงแดดสามารถส่องถึงพื้นบ่อ ส่งผลให้เกิดการเจริญของแพลงก์ตอนอย่างรวดเร็ว (Plankton bloom) เมื่อแพลงก์ตอนเหล่านี้ตายจะเกิดการย่อยสลายภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจนทำให้พื้นบ่อเน่าเสียเกิดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์อันเป็นอันตรายต่อกุ้งโดยตรง (Muluk and Bailly, 1996)

เนื่องจากการเพาะเลี้ยงแบบพัฒนาให้ผลผลิตสูงกว่าการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งพัฒนาอย่างมาก ดังนั้นปัจจุบันการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทั้งสัตว์น้ำจืดและสัตว์น้ำเค็มที่สำคัญทางเศรษฐกิจของไทยจึงนิยมเลี้ยงแบบพัฒนา แต่อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงแบบพัฒนามีข้อเสีย คือ การเพาะเลี้ยงแบบพัฒนาทำให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อม คุณภาพน้ำและคุณภาพพื้นบ่อเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว (Lin, 1989; Phillips *et al.*, 1993) เนื่องจากถ้ามีการเพาะเลี้ยงหนาแน่นขึ้นจะมีการสะสมของขี้เลนเพิ่มขึ้น และหากมีการจัดการที่ไม่ดีจะทำให้สารอินทรีย์

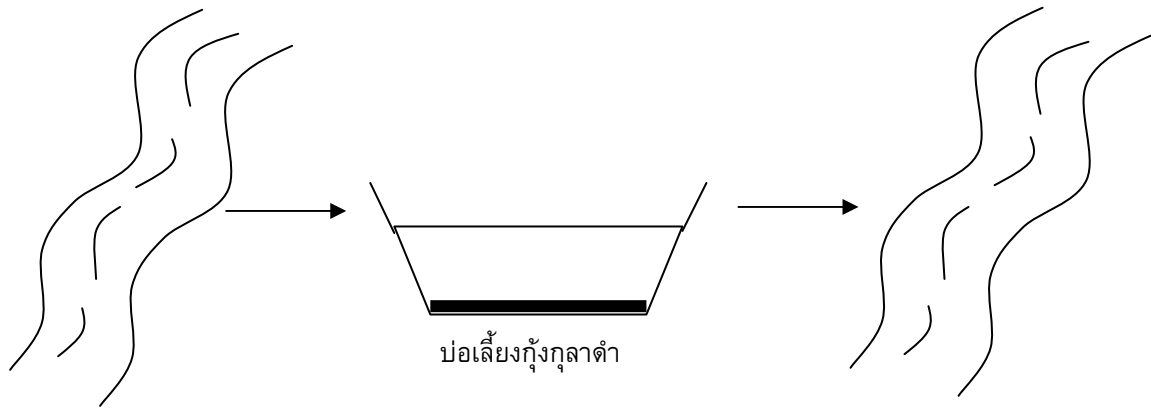
สะสมบริเวณพื้นบ่อเป็นจำนวนมาก และกักตุนเชื้อก่อโรคได้ง่าย (Primavera, 1994; Lightner and Redman, 1998) สารอินทรีย์ที่สะสมอยู่บริเวณพื้นบ่อ ได้แก่ เศษอาหารที่เหลือจากการให้อาหารมากเกินไป (Schroeder, 1975) ของเสียที่กักปล่อยออกมาและเปลือกที่เกิดจากการลอกคราบ เป็นต้น (ธนาคารกสิกรไทย, 2535) ดังนั้นการเพาะเลี้ยงด้วยระบบนี้จึงต้องมีการจัดการที่ดีและมีประสิทธิภาพ

การสะสมของสารอินทรีย์มากเกินไปทำให้คุณภาพน้ำ คุณภาพดินตะกอนและสุขภาพสัตว์น้ำเสื่อมโทรมลง และมีผลทำให้มีการขยายพื้นที่การเลี้ยงสัตว์น้ำไปในพื้นที่ที่ไม่เหมาะสม ยกตัวอย่างเช่น การนำกุ้งกุลาดำเข้ามาเลี้ยงในบริเวณน้ำจืดหรือบริเวณน้ำที่มีความเค็มต่ำในพื้นที่จังหวัดฉะเชิงเทรา ปราจีนบุรีและนครนายก ซึ่งส่งผลกระทบต่อสุขภาพของปลุก้าวในพื้นที่เหล่านี้ ดังนั้นปัญหามลภาวะน้ำเน่าเสียจากสัตว์น้ำเศรษฐกิจจึงเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้การเลี้ยงสัตว์น้ำมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและทำให้การเลี้ยงสัตว์น้ำเศรษฐกิจไม่ยั่งยืน มีผลทำให้เศรษฐกิจของประเทศได้รับผลกระทบอย่างมาก ดังนั้นในหนังสือเล่มนี้จึงขอกล่าวถึงตั้งแต่ลักษณะการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเศรษฐกิจในปัจจุบันต่อเนื่องไปจนถึงการจัดการให้การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเศรษฐกิจมีความยั่งยืนและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

4.2 การแบ่งรูปแบบการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลตามการหมุนเวียนน้ำ สามารถแบ่งได้ 3 ประเภท (คเชนทร, 2544; อนันต์, 2537) ได้แก่

4.2.1 การเพาะเลี้ยงระบบเปิด (Open system)

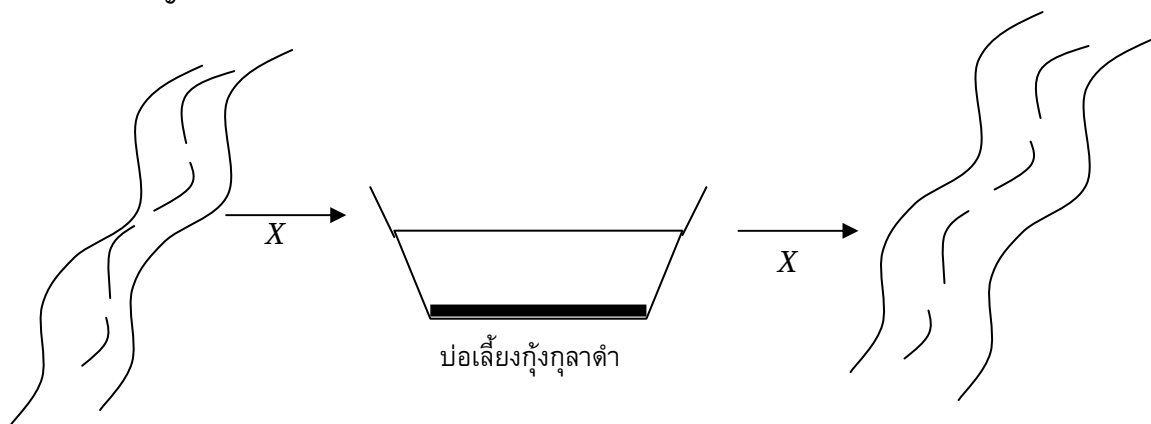
การเพาะเลี้ยงระบบเปิดเรียกได้ 3 แบบ คือ Open system หรือ Open water system หรือ Flow - through system คือ ระบบที่มีการถ่ายน้ำที่ผ่านการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแล้วทิ้งออกนอกระบบเพาะเลี้ยงหรือทิ้งออกจากฟาร์มสู่แหล่งน้ำตามธรรมชาติ **ดังภาพที่ 2** โดยเป็นการเปลี่ยนถ่ายน้ำในระยะสั้นๆ เพื่อควบคุมคุณสมบัติของน้ำภายในบ่อให้มีคุณภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกุ้ง และเป็นการเพาะเลี้ยงแบบดั้งเดิมในประเทศต่างๆ รวมทั้งประเทศไทยด้วย (Chuntapa *et al.*, 2002) ซึ่งระบบเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบดั้งเดิม แบบกึ่งพัฒนาและแบบพัฒนา ส่วนใหญ่จะเป็นแบบระบบเปิด แต่เนื่องจากการเพาะเลี้ยงระบบเปิดจะมีการใช้น้ำปริมาณมากจากแหล่งน้ำภายนอก จึงทำให้เกิดปัญหาการขาดแคลนน้ำได้ รวมทั้งยังก่อให้เกิดปัญหาการติดเชื้อมากจากแหล่งน้ำภายนอกที่ปนเปื้อน นอกจากนั้นน้ำทิ้งที่ออกจากบ่อเลี้ยงกุ้งยังก่อให้เกิดมลภาวะในแหล่งน้ำที่รองรับน้ำทิ้ง



ภาพที่ 2 รูปแบบการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำระบบเปิด

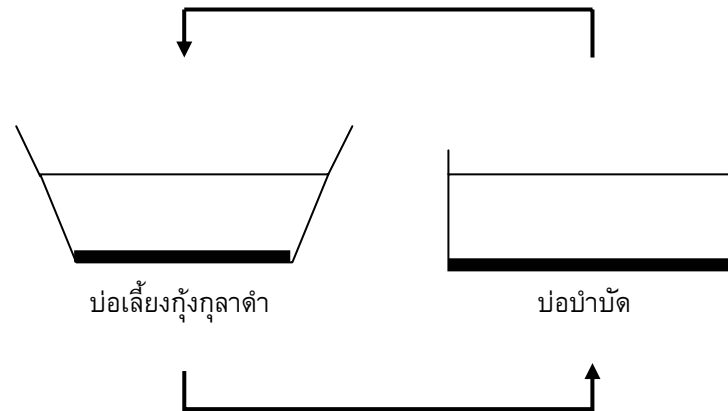
4.2.2 การเพาะเลี้ยงระบบปิด (Close water system)

การเลี้ยงระบบปิด (Close water system) เรียกว่าได้ 2 แบบ คือ Close system และ Recirculating system เป็นการเพาะเลี้ยงโดยไม่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำดังภาพที่ 3 แต่มีการซัดเซบน้ำในส่วนที่ระเหยไปรวมทั้งส่วนที่รั่วซึมและส่วนที่นำไปใช้ประโยชน์อื่นๆ การเพาะเลี้ยงแบบระบบปิดต้องใช้กระบวนการทางชีวเคมีและทางกายภาพเพื่อรักษาคุณภาพน้ำ โดยการแก้ปัญหาต่างๆ จะกระทำภายในบ่อระหว่างการเพาะเลี้ยงเพื่อให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำ



ภาพที่ 3 รูปแบบการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำระบบปิด

การเพาะเลี้ยงด้วยระบบนี้ต้องมีการสร้างบ่อบำบัดน้ำเพื่อตกตะกอนสารแขวนลอยและสารอินทรีย์ในน้ำที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง รวมทั้งกำจัดแพลงก์ตอนพืชและแพลงก์ตอนสัตว์ด้วยสัตว์น้ำอื่น เช่น ปลานวลจันทร์ ปลานิลและหอยแมลงภู่ เป็นต้น เพื่อป้องกันการเจริญของแพลงก์ตอนอย่างรวดเร็ว เมื่อสารแขวนลอยในน้ำตกตะกอนทำให้น้ำบริเวณผิวน้ำใสมากขึ้น จากนั้นจะนำน้ำบริเวณดังกล่าวมาเพิ่มปริมาณออกซิเจนและกำจัดก๊าซพิษก่อนนำกลับมาใช้งานใหม่อีกครั้ง (Kongkeo, 1997) ซึ่งลักษณะการหมุนเวียนน้ำกลับมาใช้ใหม่ของการเลี้ยงระบบปิดนี้แสดงดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 รูปแบบการเพาะเลี้ยงกุ้งแบบระบบหมุนเวียนน้ำกลับมาใช้ใหม่

การนำน้ำหมุนเวียนกลับมาใช้ใหม่กระทำได้ตั้งแต่หลังเริ่มการเพาะเลี้ยง 2-3 เดือน โดยถ่ายน้ำจากบ่อเลี้ยงสู่บ่อบำบัดประมาณ 20% ของปริมาณน้ำทั้งหมด ทุก 3 วัน และเพิ่มเป็น 30% ในช่วงเดือนสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง (Kongkeo, 1997) และระบบการเลี้ยงแบบนี้เป็นที่น่าสนใจอย่างมากเนื่องจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเศรษฐกิจขยายตัวอย่างรวดเร็วทั่วโลก จึงทำให้เกิดปัญหาการปล่อยน้ำทิ้งจากระบบเพาะเลี้ยงแบบเปิดปริมาณมากลงสู่แหล่งน้ำตามธรรมชาติและการเพาะเลี้ยงแบบระบบหมุนเวียนยังใช้น้ำน้อยกว่าการเพาะเลี้ยงแบบระบบเปิดประมาณ 50-60 เท่า รวมทั้งมีการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในบริเวณที่ห่างจากชายทะเล (Adams, 1998) ซึ่งทำให้ต้องมีการขนส่งน้ำทะเลเป็นระยะทางไกลมาใช้ในการเพาะเลี้ยง จากเหตุผลดังกล่าวจึงทำให้การเพาะเลี้ยงแบบระบบหมุนเวียนน้ำกลับมาใช้ใหม่เป็นระบบที่กำลังได้รับความนิยมอย่างยิ่งในปัจจุบัน

4.2.3 การเพาะเลี้ยงระบบกึ่งปิด (Semi-closed system)

การเพาะเลี้ยงแบบกึ่งปิด มีชื่อเรียก 2 แบบ คือ Semi-closed และ Semi-closed recirculating system คือ ระบบการเพาะเลี้ยงที่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำบางส่วนเมื่อบ่อเพาะเลี้ยงมีปริมาณแอมโมเนียและไนไตรต์สูงเกินไป ซึ่งรูปแบบการเพาะเลี้ยงนี้จะมีการบำบัดและหมุนเวียนน้ำเหมือนกับการเพาะเลี้ยงระบบเปิด

5. คุณภาพน้ำในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

5.1 คุณภาพน้ำที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

คุณภาพน้ำในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ หมายถึง คุณสมบัติโดยรวมทั้งในด้านกายภาพ เคมีและชีวภาพของน้ำในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเพื่อความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและสุขภาพของสัตว์น้ำ ยกตัวอย่างเช่น คุณภาพน้ำที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ดังแสดงใน

ตารางที่ 1 แต่ถ้าคุณภาพน้ำในบ่อเพาะเลี้ยงไม่ดีก็จะส่งผลต่อแหล่งน้ำตามธรรมชาติที่มีการปล่อยน้ำทิ้งจากบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำซึ่งคุณภาพน้ำทิ้งจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้มีการกำหนดมาตรฐานไว้ดัง**ตารางที่ 2**

ตารางที่ 1 คุณภาพน้ำที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (สุบัญญัติ และคณะ, 2547)

ลักษณะ	สภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ	สภาวะที่ทำให้กุ้งเจริญเติบโตได้ดีที่สุด
ความเค็ม	10-15 พีพีที	3-10 พีพีที
ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำ	7.5-8.5	8.0-8.5
ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ	> 4 มก.ต่อลิตร	-
แอมโมเนีย	< 0.4 มก.ต่อลิตร	-
ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์	< 0.033 มก.ต่อลิตร	-
อุณหภูมิ	25-30 °C	-
สารแขวนลอยและสารอินทรีย์	มีน้อย	-

ตารางที่ 2 มาตรฐานน้ำทิ้งจากบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (พุทธ และคณะ, 2545)

พารามิเตอร์	หน่วย	เกณฑ์มาตรฐาน
ค่าความเป็นกรด-ด่าง	-	6.5 – 9.0
บีโอดี	มก./ล.	20
สารแขวนลอย	มก./ล.	70
แอมโมเนีย (NH ₃ -N)	มก.ไนโตรเจน/ล.	1.1
ฟอสฟอรัสรวม	มก.ฟอสฟอรัส/ล.	0.4
ไฮโดรเจนซัลไฟด์	มก./ล.	0.01
ไนโตรเจนรวม	มก.ไนโตรเจน/ล.	4.0

คุณภาพน้ำที่เสื่อมโทรมในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำร้อยละ 50 เกิดจากเศษอาหารที่เหลือในบ่อและของเสียภายหลังจากสัตว์กินอาหารและขับถ่ายออก ดังนั้นเพื่อจะทำการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเป็นไปอย่างยั่งยืนควรมีการควบคุมคุณภาพน้ำทั้งทางกายภาพ เคมีและทางชีวภาพ

5.2 คุณภาพน้ำทางกายภาพและเคมี

1. ความขุ่น (Turbidity)

ความขุ่น หมายถึง สมบัติทางแสงของสารแขวนลอยซึ่งทำให้แสงกระจายและถูกดูดกลืนมากกว่าที่จะยอมให้แสงผ่านเป็นเส้นตรง ความขุ่นของน้ำเป็นค่าที่แสดงให้เห็นว่าน้ำมีสารแขวนลอย (Suspended and colloidal matter) อยู่มากน้อยเพียงใด ซึ่งสิ่งที่ทำให้เกิดความขุ่น ได้แก่ สารอินทรีย์ สารอนินทรีย์ สิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่มีขนาดระหว่าง 1–10 ไมครอน เช่น แพลงก์ตอน แบคทีเรีย หรือในลักษณะของสารแขวนลอย เช่น อนุภาคของดินทราย ตลอดจนแร่ธาตุต่างๆ เป็นต้น (ไมตรี และจารุวรรณ, 2528) ความขุ่นจะมีผลต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำ คือ ทำให้แสงสว่างส่องลงไปใต้น้ำได้น้อยจนทำให้การสังเคราะห์แสงของแพลงก์ตอนพืชลดลง ซึ่งเป็นผู้ผลิตขั้นต้น (Primary productivity) ส่งผลให้ปริมาณอาหารตามธรรมชาติของสัตว์น้ำลดลง เกิดตะกอนซากแพลงก์ตอนและเลนที่พื้นบ่อมากขึ้นเรื่อยๆ ทำให้เกิดกิจกรรมการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์มากขึ้น จึงมีการปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์ในปริมาณมากทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างลดลง ความขุ่นยังทำให้อุณหภูมิของน้ำเปลี่ยนแปลง โดยเฉพาะผิวน้ำจะดูดซับความร้อนทำให้น้ำมีอุณหภูมิสูงกว่าปกติและน้ำที่มีสารแขวนลอยอยู่มากจะรับออกซิเจนได้น้อยกว่าน้ำที่ใส (O'Neill, 1993) นอกจากนี้สารแขวนลอยที่ทำให้เกิดความขุ่นจะทำอันตรายต่อสัตว์น้ำโดยตรงเพราะจะเข้าไปอุดตันในช่องเหงือกทำให้การหายใจติดขัดรับออกซิเจนได้น้อยลง การเจริญเติบโตช้าลงกว่าปกติ การฟักเป็นตัวของไข่และการเจริญเติบโตของตัวอ่อนหยุดชะงักหรือช้าลงและลดความต้านทานต่อโรคต่างๆ (World Health Organization, 1986)

2. อุณหภูมิ (Temperature)

อุณหภูมิ คือ ความร้อน-เย็นของน้ำ อุณหภูมิของน้ำจะสูงกว่าอุณหภูมิในบรรยากาศ และเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของสัตว์ พืชน้ำ และมีผลต่อการละลายของออกซิเจนในน้ำ ตามปกติแล้วออกซิเจนจะละลายน้ำได้ 7.54–9.08 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิบรรยากาศ จากรายงานวิจัยของวิภูษิต และคณะ (2534) กล่าวว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำในบ่อเพาะเลี้ยงคือ 25 – 33 องศาเซลเซียส แต่ถ้าอุณหภูมิของน้ำสูงเกินไปกุ้งจะมีการอดตัว เนื่องจากการเกร็งตัวของกล้ามเนื้อและเมื่ออุณหภูมิต่ำกว่า 18 องศาเซลเซียส กุ้งจะไม่ว่ายน้ำและหยุดการกินอาหาร และที่อุณหภูมิต่ำกว่า 14 องศาเซลเซียส จะทำให้กุ้งตาย นอกจากนี้จากรายงานของสไบทิพย์ และคณะ (2543) กล่าวว่าอุณหภูมิที่สูงขึ้นจะส่งผลให้แอมโมเนียอิสระ (Un-ionized ammonia : NH_3) อยู่ในรูปที่มีความเป็นพิษสูงขึ้น นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในแต่ละฤดูกาลนั้นมีความแตกต่างของกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีการใช้ประโยชน์จากไนโตรเจน (Ogilvie *et al.*, 1997)

3. ความเค็ม (Salinity)

ความเค็มเป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งต่อสัตว์น้ำจำพวกกุ้ง เนื่องจากเป็นปัจจัยที่กำหนดปริมาณของสัตว์น้ำหรือจุลินทรีย์ในแหล่งน้ำนั้นๆ (Day *et al.*, 1982) โดยไมตรีและจารุวรรณ (2528) ได้แบ่งระดับความเค็มออกเป็น 3 ระดับ คือ 1) น้ำจืด (Freshwater) มีความเค็มอยู่ในช่วง 0–0.5 ส่วนในพันส่วน 2) น้ำกร่อย (Brackishwater) มีความเค็มอยู่ในช่วง 0.5–30.0 ส่วนในพันส่วน และ 3) น้ำเค็ม (Seawater) มีความเค็มมากกว่า 30.0 ส่วนในพันส่วน ส่วนสมเจตน์และคณะ (2529) ได้จัดแบ่งระดับความเค็มไว้ 3 ระดับเช่นเดียวกัน คือ 1) ความเค็มระดับต่ำ มีค่าความเค็มอยู่ในช่วง 2-4 ส่วนในพันส่วน 2) ความเค็มระดับปานกลางมีค่าความเค็มอยู่ในช่วง 5-8 ส่วนในพันส่วน และ 3) ความเค็มระดับสูงมีค่าความเค็มมากกว่า 9 ส่วนในพันส่วน ความเค็มนี้มีผลต่อความสามารถในการละลายน้ำของออกซิเจน เมื่อความเค็มเพิ่มขึ้นออกซิเจนจะละลายน้ำได้ลดลง โดยน้ำเค็มจะมีปริมาณออกซิเจนในน้ำน้อยกว่าน้ำจืด เพราะระดับการอิ่มตัวยิ่งยวดในน้ำเค็มสูงกว่าในน้ำจืด (สไบทิพย์ และคณะ, 2543) และพบว่ากุ้งที่เจริญเติบโตในน้ำที่มีความเค็มเหมาะสม เช่น *P. setiferus* และ *P. schmitti* เจริญเติบโตในน้ำที่มีความเค็มเท่ากับร้อยละ 15 และ 25 ตามลำดับ จะทำให้ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของกุ้งทั้ง 2 ชนิด ลดลง

กุ้งกุลาดำซึ่งเป็นกุ้งเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยจัดเป็นกุ้งที่สามารถดำรงชีวิตอยู่ในน้ำทะเลที่มีช่วงความเค็มกว้าง (Euryhaline) มีความเค็มอยู่ระหว่าง 0 – 70 ส่วนในพันส่วน แต่จะเจริญเติบโตได้ดีในช่วงความเค็ม 15 – 30 ส่วนในพันส่วน กุ้งกุลาดำสามารถทนต่อการเปลี่ยนแปลงของความเค็มอย่างช้าๆ โดยสามารถปรับตัวอยู่ในน้ำที่มีความเค็มเกือบเท่ากับศูนย์หรือน้ำที่เพิ่มความเค็มจนถึง 45 ส่วนในพันส่วน ได้เป็นระยะเวลานานแต่จะไม่ทนต่อการเปลี่ยนแปลงความเค็มอย่างกะทันหัน

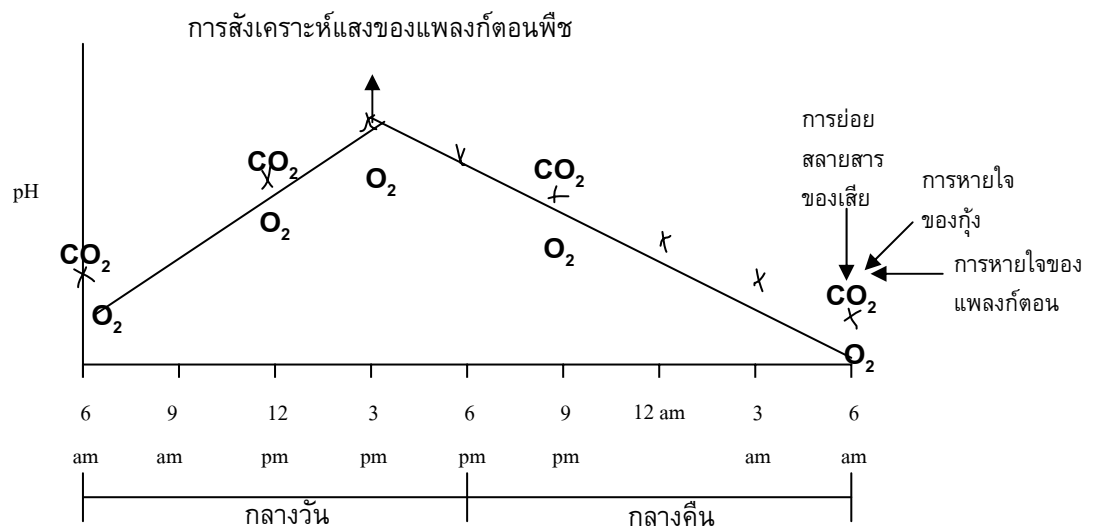
ดังนั้นในการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำจึงควรรักษาความเค็มของบ่อให้คงที่หรือถ้ามีการเปลี่ยนแปลงความเค็มก็ควรให้มีการเปลี่ยนแปลงอย่างช้าๆ ช่วงความเค็มที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำอยู่ระหว่าง 10-15 ส่วนในพันส่วน แต่อย่างไรก็ตามพบว่าความเค็มอยู่ในช่วง 3-10 ส่วนในพันส่วน จะทำให้เกิดโรคของกุ้งลดลง โดยเฉพาะปัญหาจากโรคแบคทีเรียเรืองแสง เป็นต้น นอกจากความเค็มจะมีผลต่อการเจริญเติบโตของกุ้งแล้วยังมีผลทำลายอาหารตามธรรมชาติของกุ้งด้วย ถ้ามีความเค็มสูงจะไปทำลายสิ่งมีชีวิตกลุ่มแพลงก์ตอน ส่วนในน้ำที่มีความเค็มต่ำจะทำให้การเจริญของแบคทีเรียและโพรโตซัวเพิ่มขึ้นจึงอาจทำให้กุ้งเกิดโรคได้ (วิภูษิต และคณะ, 2534)

4. ออกซิเจนที่ละลายน้ำ (Dissolved Oxygen; DO)

ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำเป็นปัจจัยสำคัญต่อการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำโดยความสามารถในการละลายน้ำของออกซิเจนขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ และความเค็มของน้ำ น้ำที่มีความเค็มและอุณหภูมิเพิ่มขึ้นจะทำให้ ออกซิเจนละลายน้ำได้ลดลง สัตว์น้ำกลุ่มครัสเตเชียน

เช่น กุ้ง กุ้ง ปู จะมีความไวต่อปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ (Rosas *et al.*, 1999) เนื่องจากการขาดก๊าซออกซิเจนอย่างฉับพลันจะทำให้การหายใจแบบใช้ออกซิเจนปกติทำให้เกิดอนุมูลอิสระของออกซิเจน (Singlet oxygen) ที่เป็นพิษต่อเซลล์ (Ranby and Rabek, 1978) อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นนี้จะทำให้ไขมัน โปรตีน คาร์โบไฮเดรตและนิวคลีโอไทด์ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ เอนไซม์ และดีเอ็นเอผิดปกติ (Yu, 1994)

สำหรับก๊าซออกซิเจนจะมีผลต่อการเจริญเติบโต การกินอาหารและสุขภาพของกุ้งกุลาดำ ถ้าปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำไม่เหมาะสม อาจทำให้กุ้งแสดงอาการเพียงเล็กน้อยจนถึงขั้นรุนแรงและอาจทำให้กุ้งตายได้ ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำจะมีการเปลี่ยนแปลงคล้ายกับการเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรด-ด่าง คือ มีค่าต่ำสุดในตอนเช้ามืดเนื่องจากช่วงกลางคืนจุลินทรีย์และแพลงก์ตอนพืชจะใช้ก๊าซออกซิเจนเพื่อการหายใจ รวมทั้งจุลินทรีย์จะทำการย่อยสลายของเสียและสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นแพลงก์ตอนพืชจะเริ่มมีการสังเคราะห์แสงตั้งแต่วันที่เริ่มมีแสงสว่างทำให้ปริมาณออกซิเจนเพิ่มขึ้นและสูงสุดในตอนบ่ายดังแสดงใน **ภาพที่ 5**



ภาพที่ 5 แผนภาพแสดงการเปลี่ยนแปลงของปริมาณก๊าซออกซิเจน และก๊าซ

คาร์บอนไดออกไซด์และค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่ช่วงเวลาต่างๆ

หมายเหตุ O₂ และ CO₂ แสดงเป็นตัวใหญ่ หมายถึงก๊าซมีปริมาณสูง และแสดงเป็นตัวเล็ก หมายถึงมีก๊าซปริมาณต่ำ

5. ความเป็นกรด - ด่าง (Power of hydronium ion; pH)

ความเป็นกรด-ด่างของน้ำ คือ ปริมาณความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออนที่มีอยู่ในน้ำ ซึ่งเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมากเพราะความเป็นกรด-ด่างของน้ำนั้นมีผลต่อคุณภาพทางเคมีของน้ำ เช่น มีผลต่อความเป็นพิษของก๊าซแอมโมเนียและก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ โดยช่วงความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงกุ้งกุลาดำควรมีค่าอยู่

ในช่วง 8 – 8.5 (วิภูษิต และคณะ, 2534) ถ้าค่าความเป็นกรด-ด่างค่อนข้างต่ำจะส่งผลต่อแบคทีเรียกลุ่มไนโตรแบคเตอร์ (Nitrobacter bacteria) ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายไนไตรต์ เพราะในสภาวะที่ค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำไนไตรต์จะเปลี่ยนเป็นกรดไนตริกซึ่งมีความเป็นพิษต่อแบคทีเรียกลุ่มไนโตรแบคเตอร์ ทำให้ปฏิกิริยาไนตริฟิเคชัน (Nitrification) หยุดไปด้วย (Hargreaves, 1998) การที่ค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงจะเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดการผลิตหรือการสะสมของกรดอินทรีย์ เช่น กรดอะซิติก (Acetic acid) ที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึม (Metabolism) ของสารอินทรีย์ที่ไม่สมบูรณ์ของแบคทีเรียกลุ่มดีไนทริไฟเออร์ (Denitrifier bacteria; Menasveta *et al.*, 2001)

สำหรับค่าความเป็นกรด-ด่างที่ค่อนข้างสูง (pH 8.4-9) จะทำให้แอมโมเนียมีไอออนแตกตัวเป็นแอมโมเนีย (NH_3) มากขึ้น ซึ่งแอมโมเนียมีความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำโดยตรง (สไบทิพย์ และคณะ, 2543) นอกจากนี้ยังส่งผลต่อสภาพการละลายได้ของธาตุบางชนิด เช่น ทำให้แคลเซียมและแมกนีเซียมละลายน้ำได้ลดลง เมื่อปริมาณแร่ธาตุในน้ำน้อยทำให้การลอกคราบของกุ้งชะงัก เกิดปัญหาการลอกคราบไม่ออก และถ้าค่าความเป็นกรด-ด่างค่อนข้างต่ำหรืออยู่ในสภาวะเป็นกรดจะทำให้กุ้งกุลาดำมีความไวต่อการขาดออกซิเจนเพิ่มมากขึ้น (Allan and Maguire, 1991) โดยไมตรี และจรรุวรรณ (2528) ได้แสดงค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำดัง **ตารางที่ 3**

ตารางที่ 3 ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (ไมตรี และ จรรุวรรณ, 2528)

ค่าความเป็นกรด-ด่าง	ผลกระทบต่อสัตว์น้ำ
4.0 หรือต่ำกว่า	เป็นอันตรายทำให้สัตว์น้ำตายได้
4.0 – 6.0	อาจจะไม่ตาย แต่จะทำให้ได้ผลผลิตต่ำ เนื่องจากการเจริญเติบโตช้า และทำให้การสืบพันธุ์หยุดชะงัก
6.5 – 9.0	เป็นระดับที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ
9.0 – 11.0	ไม่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของสัตว์น้ำ ถ้าต้องอาศัยอยู่เป็นเวลานาน จะทำให้ผลผลิตต่ำลง
11.0 หรือมากกว่า	เป็นพิษต่อสัตว์น้ำ

6. สารประกอบไนโตรเจน

สารประกอบไนโตรเจนที่มีผลต่อสัตว์น้ำโดยตรง คือ ไนไตรต์และแอมโมเนีย วิภูษิต และคณะ (2534) รายงานว่าปริมาณไนไตรต์และแอมโมเนียที่เหมาะสมต่อการอนุบาลกุ้งไม่ควรเกิน 0.3599 มก. $\text{NO}_2\text{-N/L}$ และ 0.0396 มก. $\text{NH}_3\text{/L}$ ตามลำดับ โดยแอมโมเนียที่พบในน้ำมี 2 รูป คือ ก๊าซแอมโมเนีย (NH_3) ที่จะพบมากเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างสูงกว่า 9 และ

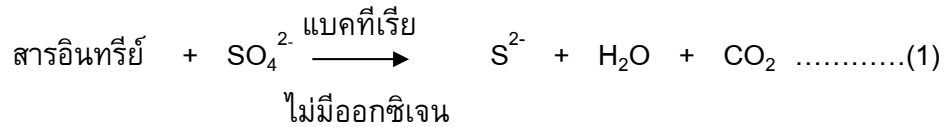
แอมโมเนียมไอออน (NH_4^+) ซึ่งไม่เป็นพิษต่อสัตว์น้ำโดยจะพบมากเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำกว่า 8.5 ในบ่อเลี้ยงกุ้งควรมีแอมโมเนียไม่เกิน 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยไนโตรเจนเกือบทั้งหมดร้อยละ 97 ที่เข้าสู่บ่อเลี้ยงกุ้งมาจากอาหารที่ใช้เลี้ยงกุ้ง ซึ่งกุ้งจะสะสมไนโตรเจนไว้ในเนื้อกุ้งได้ประมาณร้อยละ 21.8 ไนโตรเจนที่เหลือเกือบร้อยละ 80 จะตกค้างอยู่ในบ่อเพาะเลี้ยงโดยอยู่ในรูปของเศษอาหารและขี้กุ้งที่พื้นบ่อประมาณร้อยละ 70 และในรูปของสิ่งขับถ่ายที่ละลายน้ำได้ เช่น อินทรีย์ไนโตรเจน แอมโมเนีย ไนไตรต์และไนเตรตประมาณร้อยละ 9 (พุทธร และ สำรอง, 2546) การเลี้ยงกุ้งที่มีการให้อาหารมากเกินไปจะทำให้มีปริมาณสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งการวิเคราะห์ปริมาณสารอินทรีย์โดยตรงทำได้ยากวิธีที่นิยมใช้หาปริมาณสารอินทรีย์ คือ การหาค่าบีโอดี (Biochemical Oxygen Demand; BOD) โดยเป็นการวัดปริมาณออกซิเจนที่ใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์โดยแบคทีเรียกลุ่มที่ใช้ออกซิเจนในการเจริญ ซึ่งปริมาณออกซิเจนจะแปรผันตรงกับปริมาณสารอินทรีย์ที่ตกค้างในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

7. สารประกอบฟอสฟอรัส

ฟอสฟอรัสเป็นธาตุที่มีความสำคัญมากสำหรับแหล่งน้ำ วงจรการเปลี่ยนแปลงค่อนข้างจะซับซ้อน ฟอสฟอรัสพบได้ทั้งในรูปสารละลายน้ำและอนุภาคแขวนลอย ซึ่งที่ละลายน้ำได้จะมีทั้งสารอินทรีย์หรือสารอนินทรีย์ สารอินทรีย์ฟอสฟอรัสที่ละลายน้ำจะเกิดจากการย่อยสลายของของพืชหรือสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ส่วนสารอนินทรีย์ที่ละลายน้ำมักจะเป็นออร์โธฟอสเฟตและอนุภาคแขวนลอยที่มีฟอสฟอรัส ได้แก่ แพลงก์ตอนต่าง ๆ แบคทีเรีย โดยที่แบคทีเรียและแพลงก์ตอนพืชจะสามารถดูดซับออร์โธฟอสเฟตได้รวดเร็วมากเกินกว่าความต้องการที่ใช้ในการเจริญ (Luxury uptake) ส่วนฟอสเฟตที่เหลือจะถูกดินตะกอนดูดซับไว้อย่างรวดเร็วเช่นกัน จึงทำให้พบฟอสเฟตในน้ำปริมาณต่ำมาก (Scottish Executive Central Research Unit, 2002) ทำให้น้ำมีปริมาณฟอสเฟตลดลงและเสียมสมดุล ดินตะกอนจึงมีการปล่อยฟอสเฟตให้กับน้ำสำหรับฟอสเฟตในดินตะกอนมักอยู่ในรูปของสารประกอบเหล็กฟอสเฟต อลูมิเนียมฟอสเฟตและแคลเซียมฟอสเฟต โดยที่ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน (Aerobic) สารประกอบฟอสเฟตจะละลายน้ำได้น้อย แต่ถ้าเกิดสภาวะไร้ออกซิเจนฟอสเฟตจะถูกปล่อยให้กับน้ำ ซึ่งพืชน้ำสามารถดูดซึมไปใช้ประโยชน์ได้และรากของพืชบางชนิดสามารถดูดซึมฟอสเฟตจากดินตะกอนได้โดยตรง (Jones et al., 2001)

8. ไฮโดรเจนซัลไฟด์ (Hydrogen sulfide; H_2S)

การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจะมีการให้อาหารประเภทโปรตีนสูง ของเสียที่ถูกขับถ่าย เศษอาหารที่เหลือจะเกิดการย่อยสลายโดยแบคทีเรียที่อยู่ในน้ำและเมื่อออกซิเจนในน้ำหมดไปจะเกิดกระบวนการย่อยสลายในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (Anaerobic condition) ซึ่งจะมีสารประกอบซัลเฟต (SO_4^{2-}) มาทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนแทนออกซิเจน ดังสมการที่ 1



น้ำที่มีก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์จะมีสีดำและมีกลิ่นเหม็น ไฮโดรเจนซัลไฟด์มี 2 รูปแบบ คือ 1) ไฮโดรเจนซัลไฟด์อิสระ (Un-ionized form) เช่น H_2S และ 2) ไฮโดรเจนซัลไฟด์แตกตัว (Ionized form) เช่น HS^- หรือ S^{2-} การแตกตัวของไฮโดรเจนซัลไฟด์จะขึ้นอยู่กับค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำ ถ้าค่าความเป็นกรด-ด่างสูงกว่า 8 จะปรากฏในรูปของไฮโดรเจนซัลไฟด์แตกตัว แต่ถ้าค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำต่ำกว่า 8 จะปรากฏในรูปของไฮโดรเจนซัลไฟด์อิสระเป็นส่วนใหญ่ นอกจากนี้แบคทีเรียยังสามารถออกซิไดส์ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ให้กลายเป็นกรดกำมะถันทำให้น้ำมีสถานะเป็นกรด (เบญจามินทร์, 2543) ดังนั้นเพื่อป้องกันอันตรายจากก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจึงไม่ควรให้มีไฮโดรเจนซัลไฟด์อิสระเกินกว่า 0.002 มิลลิกรัมต่อลิตร

5.3 คุณภาพน้ำทางชีวภาพ

น้ำเป็นปัจจัยสำคัญยิ่งต่อสัตว์น้ำเนื่องจากกิจกรรมต่าง ๆ ของสัตว์น้ำย่อมเกี่ยวข้องกับน้ำทั้งสิ้น เพราะสัตว์น้ำใช้น้ำเป็นที่อยู่อาศัย ดำรงชีพ กินอาหารและสืบพันธุ์ เป็นต้น คุณภาพน้ำประกอบด้วยคุณภาพทั้งทางกายภาพ เคมีและชีวภาพ และคุณภาพทางชีวภาพมีความสำคัญต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำเช่นเดียวกับคุณภาพน้ำทางกายภาพและเคมี โดยคุณภาพน้ำทางชีวภาพ หมายถึง ดัชนีคุณภาพน้ำที่ผันแปรเนื่องจากสิ่งมีชีวิตในน้ำซึ่งมีผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำทั้งทางตรงและทางอ้อม เช่น แพลงก์ตอนพืช และแพลงก์ตอนสัตว์ แบคทีเรีย พืชน้ำ เชื้อก่อโรค สาหร่าย (ชนินทร์, 2549)

6. ดินพื้นบ่อและการสะสมชีเลนในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

6.1 ดินพื้นบ่อ

บ่อดินเกิดจากการขุดบ่อขึ้นมาทำให้ดินบริเวณพื้นบ่อถูกเรียกว่า ดินพื้นบ่อ (Pond bottom soil; Avnimelech and Ritvo, 2003) ดินพื้นบ่อในประเทศไทยส่วนใหญ่ประกอบด้วยดินเหนียว (Clay; Smith, 1996; Islam *et al.*, 2004) คุณสมบัติของดินพื้นบ่อมีความสำคัญและมีผลต่อการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำ โดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อการเลี้ยงกุ้งเนื่องจากตามธรรมชาติแล้วกุ้งมีนิสัยหาอาหารและดำรงชีวิตอยู่บริเวณผิวดิน กุ้งใช้เวลาส่วนใหญ่อยู่ที่บริเวณนี้ ไม่ว่าจะเป็นการขุดโพรงเพื่ออำพรางตัวและการกินดินตะกอนบริเวณพื้นบ่อ (Boyd, 1989; Avnimelech and Ritvo, 2003) จากการศึกษาพบว่า การแพร่กระจายของกุ้งในธรรมชาติจะเกี่ยวข้องกับลักษณะของดินตะกอน (Williams, 1958; Hughes 1968; Rulifson, 1981) และการขุดโพรงเพื่ออำพรางตัวของกุ้งนั้นมีความแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ เช่น กุ้งขาวอินเดียจะหลีกเลี่ยงขุดโพรงในบริเวณที่มีซัลไฟด์ (Gopakuma and Kuttyamma, 1996)

6.2 การสะสมชีเลนในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

ชีเลน คือ สารอินทรีย์ที่เกิดจากการสะสมของเสียในรูปแบบต่าง ๆ โดยของเสียเหล่านี้มีคุณสมบัติเป็นตัวรีดิวซ์สูงและมีปริมาณของสารประกอบไนโตรเจนและฟอสฟอรัสสูง รวมทั้งเป็นสารขนาดเล็กที่เกาะกันอย่างหลวม ๆ (Hopkins *et al.*, 1994) การสะสมของชีเลนจะนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของดินพื้นบ่อ (Avnimelech and Ritvo, 2003) ซึ่งในการเพาะเลี้ยงแบบพัฒนามีกระบวนการเกิดชีเลน โดยเริ่มต้นจากการสะสมของสารอินทรีย์จากสิ่งขับถ่ายของสัตว์น้ำและอาหารที่เหลือนบนดินพื้นบ่อจนเกิดการย่อยสลายของสารอินทรีย์ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและเกิดการสะสมของสารอินทรีย์ที่เหลือรวมตัวกับสารตัวกลาง ได้แก่ กรดอินทรีย์ คีโตน อัลดีไฮด์ เอมีนและเมอร์แคปแทน (Boyd, 1992; Fast and Boyd, 1992; Hopkins *et al.*, 1994) เมื่อเกิดการสะสมของสารอินทรีย์จากของเสียของสัตว์น้ำและอาหารที่เหลือเพิ่มขึ้นผสมกับสารตัวกลางจะทำให้จุลินทรีย์กลุ่มที่ใช้ออกซิเจนในการเจริญใช้ออกซิเจนมากเกินไปจนทำให้บ่อเพาะเลี้ยงเกิดสภาวะไม่มีออกซิเจน ส่งผลให้เกิดการย่อยสลายสารอินทรีย์ด้วยจุลินทรีย์กลุ่มที่ไม่ใช้ออกซิเจนและเกิดสารพิษ คือ ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์และก๊าซแอมโมเนีย ซึ่งสารที่เกิดจากกระบวนการสะสมชีเลนเหล่านี้ล้วนมีความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำและแบคทีเรียบางกลุ่มที่เป็นประโยชน์ต่อบ่อเพาะเลี้ยง อีกทั้งก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ยังทำให้ชีเลนมีสีดำและมีกลิ่นเหม็นอีกด้วย (Solbe, 1979)

การแพร่กระจายของชีเลนในบ่อเพาะเลี้ยงนั้นเป็นไปอย่างไม่มีแบบแผนซึ่งเป็นผลมาจากปัจจัยทางกายภาพและชีวภาพ เช่น การแขวนลอยของตะกอน ทิศทางการหมุนเวียนของอากาศจากเครื่องเติมอากาศ เป็นต้น โดย Ritvo และคณะ (1997) รายงานว่าความขุ่นที่เกิดขึ้นในบ่อเลี้ยงกุ้งมีความสัมพันธ์กับขนาดของกุ้งรวมทั้งการหมุนเวียนของอากาศจากเครื่องเติมอากาศ โดยพบว่าถ้าหมุนเวียนอากาศเป็นวงกลมจะทำให้ชีเลนมากกว่าร้อยละ 30-50 สะสมอยู่บริเวณกลางบ่อ ซึ่งบริเวณนี้มักมีแอมโมเนียความเข้มข้น 4,220-8,950 ไมโครโมลาร์ ขณะที่บริเวณริมบ่อมีแอมโมเนียความเข้มข้น 560-1,010 ไมโครโมลาร์ บริเวณที่มีการสะสมของชีเลนมากจะมีผลต่อการเจริญเติบโต กิจกรรมและสุขภาพของกุ้ง โดยบ่อเพาะเลี้ยงที่มีการสะสมของชีเลนมากจะทำให้อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อของกุ้งต่ำ รวมทั้งทำให้กุ้งเกิดความเครียด มีอัตราการตายเพิ่มขึ้นและความต้านทานโรคลดลง

ของเสียที่ทำให้เกิดชีเลนมีดังนี้

1. เศษอาหารกุ้ง

อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้งนั้นจะมีทั้งอาหารสดและอาหารแห้งหรืออาหารเม็ด โดยมีส่วนประกอบของสารอินทรีย์ร้อยละ 90 โดยประกอบด้วยไนโตรเจนและฟอสฟอรัสอยู่ในปริมาณสูงร้อยละ 77.5 และ 86 ตามลำดับ (Bratvold and Browdy, 2001) จากการศึกษพบว่ากุ้งสามารถนำไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในอาหารไปใช้ในการเจริญเติบโตเพียงร้อยละ 21.08 ± 2.635 และ 5.81 ± 0.76 ตามลำดับ ถ้ามีการให้อาหารมากเกินไป อาหารส่วนที่เหลือจะตกค้างอยู่ในบ่อเลี้ยงกุ้งทำให้น้ำเกิดการเน่าเสียขึ้น เนื่องจากอาหารเลี้ยงกุ้งที่ละลาย

น้ำได้ เช่น อาหารสดจะส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรีย ส่วนอาหารเม็ดที่มีน้ำหนักมากส่วนหนึ่งจมลงสู่พื้นบ่อและจมอยู่ในดินตะกอนทำให้เกิดการตกค้างของอาหารส่งผลให้แพลงก์ตอนพืชและแบคทีเรียเจริญอย่างมาก ซึ่งจะทำให้ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำลดลงแล้วเกิดสภาวะน้ำเน่าเสียในที่สุด

2. ดินตะกอน

การสะสมของสารอินทรีย์และเศษตะกอนก่อนที่จะแปรสภาพเป็นซีเลนในบ่อเลี้ยงกุ้งในประเทศไทยเกิดได้หลายประการ คือ

2.1 ตะกอนที่เกิดจากการกักตรอนของขบบ่อเลี้ยงกุ้ง (Boyd *et al.*, 1994) โดยพบว่าร้อยละ 70-80 ของดินตะกอนจะมีส่วนประกอบเป็นสารกลุ่มควอตซ์ (Quartz), Kaolinite และ Mica-illite ขณะที่ร้อยละ 5-10 จะมี Amorphous iron, Aluminum และ Silicon oxide ผสมอยู่

2.2 ดินตะกอนในบ่อเลี้ยงกุ้งที่เกิดจากการทับถมกันของสิ่งขับถ่ายกุ้ง ซากแพลงก์ตอนพืชแบคทีเรียและเศษอาหารที่เหลือทำให้บ่อเลี้ยงกุ้งเกิดการตื้นเขินเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดซีแดด ซึ่งซีแดด คือ สาหร่ายที่เกิดขึ้นบริเวณกลางบ่อที่ตื้นเขินซึ่งแดดสามารถส่องลงไปถึงพื้นบ่อทำให้สาหร่ายมีการเจริญอย่างรวดเร็วและมีขนาดใหญ่ขึ้นเรื่อยๆ จนเป็นแผ่นหนาในช่วงเวลากลางวันแสงแดดส่องถึงทำให้มีการผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งจะมีบางส่วนที่ละลายน้ำได้แล้วออกไปในอากาศทันที และบางส่วนที่จะรวมตัวกันเป็นฟองอากาศซึ่งจะช่วยยกแผ่นสาหร่ายให้หลุดลอยขึ้นสู่ผิวน้ำ เมื่อถูกคลื่นซัดเข้ากระทบกับชายฝั่งสาหร่ายจะแตกออกเป็นชิ้นเล็กๆ และจมลงสู่ก้นบ่อในบริเวณที่ลึกแสงแดดส่องไม่ถึงทำให้เกิดการย่อยสลายภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจนและเกิดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ แอมโมเนีย ไนโตรดและไนไตรต์ปริมาณมาก (ดีพร้อม, 2531)

3. สาหร่าย

การที่มีสาหร่ายเจริญมากเกินไปในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจะทำให้เกิดการสังเคราะห์แสงมากในตอนกลางวัน ทำให้น้ำในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีค่าความเป็นกรด-ด่างสูงขึ้น ส่งผลให้เกิดแอมโมเนียอิสระที่เป็นพิษต่อกุ้งเพิ่มมากขึ้น (พุทธ และ สำรอง, 2546) แต่ในตอนกลางคืนสาหร่ายจะแย่งเอาออกซิเจนที่ละลายน้ำไปใช้ในกระบวนการหายใจ ส่งผลให้ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำลดลงต่ำในช่วงเช้ามืด และเมื่อสาหร่ายตายลงจะจมลงไปที่ก้นบ่ออยู่บริเวณดินตะกอนพื้นบ่อ ทำให้เกิดสภาวะไม่มีออกซิเจนจนเป็นสาเหตุให้เกิดการเน่าเสียของน้ำและเกิดเป็นซีเลนได้

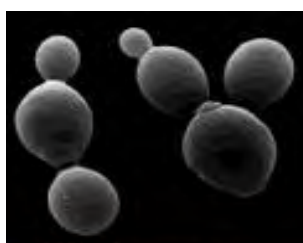
4. สิ่งขับถ่ายจากก้าง

สิ่งขับถ่ายจากสัตว์น้ำส่วนใหญ่เป็นสารประกอบไนโตรเจน คาร์โบไฮเดรตและไขมัน เมื่อระบบเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีการสะสมสิ่งขับถ่ายเพิ่มมากขึ้นและสิ่งขับถ่ายเหล่านี้ถูกย่อยสลายด้วยกิจกรรมของจุลินทรีย์กลุ่มที่ใช้ออกซิเจนจะส่งผลให้เกิดการใช้ออกซิเจนเพิ่มมากขึ้น ซึ่งทำให้ปริมาณออกซิเจนไม่เพียงพอต่อความต้องการของสัตว์น้ำ รวมทั้งอาจทำให้สภาพพื้นบ่อหรือสิ่งแวดล้อมในระบบเพาะเลี้ยงอยู่ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน เมื่อระบบเพาะเลี้ยงอยู่ในสภาวะดังกล่าวจุลินทรีย์กลุ่มที่ไม่ใช้ออกซิเจนจะย่อยสลายสารอินทรีย์ ซึ่งในการย่อยสลายของจุลินทรีย์กลุ่มที่ไม่ใช้ออกซิเจนจะก่อให้เกิดสารพิษต่างๆ ยกตัวอย่างเช่น การศึกษาของ Kongkeo (1989) พบว่าดินพื้นบ่อเลี้ยงกุ้งแบบพัฒนาในประเทศไทยเป็นแหล่งสะสมก๊าซพิษ เช่น แอมโมเนีย ไฮโดรเจนซัลไฟด์และมีเทน และยังเป็นแหล่งสะสมของแบคทีเรียก่อโรค เช่น แบคทีเรียกลุ่ม vibrio (สุนิสา และคณะ, 2549) และไวรัส เป็นต้น

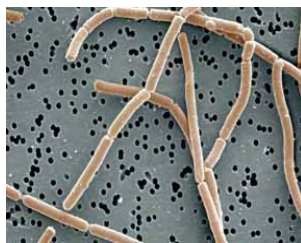
7. โพรไบโอติก

7.1 ประวัติโพรไบโอติกและการใช้โพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

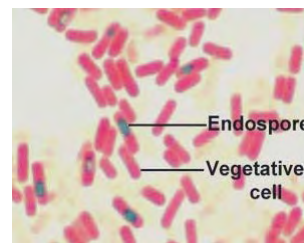
Metchnikoff (1908) เป็นบุคคลแรกที่สนใจและศึกษาวิจัยเกี่ยวกับโพรไบโอติกโดยมีจุดมุ่งหมายเพื่อเพิ่มปริมาณแบคทีเรียแลคติกในลำไส้และยับยั้งกิจกรรมของแบคทีเรียก่อโรคในลำไส้ของมนุษย์ รวมทั้งได้ให้คำจำกัดความของโพรไบโอติกว่า จุลินทรีย์ที่กินเข้าสู่ร่างกายโดยมีจุดประสงค์เพื่อส่งเสริมสุขภาพ ต่อมา Parker (1974) ได้ให้คำจำกัดความว่า สิ่งมีชีวิตและสารเคมีที่มีผลต่อสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ ส่วนความหมายของโพรไบโอติกในเชิงการเลี้ยงสัตว์น้ำหมายถึง จุลินทรีย์ โดยเฉพาะแบคทีเรียหรือผลผลิตจากแบคทีเรียที่เติมเข้าไปในระบบการเลี้ยงสัตว์น้ำแล้วไปมีผลช่วยให้สัตว์ดังกล่าวมีสุขภาพดีขึ้น (Lilley & Stillwell, 1965; FAO/WHO, 2001) โดยจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก ยกตัวอย่างเช่น *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *E. coli*, *Clostridium botyricum*, *Enterococcus*, *Streptococcus* และยีสต์ ดังภาพที่ 6 (ภาวัต สังขะวิฒนะ, 2544; Gatesoupe, 1999)



A



B



C

ภาพที่ 6 จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก

(A) ยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) (B) *Lactobacillus bulgaricus* (C) *Bacillus subtilis*

ชนิดของโพรไบโอติกที่นำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจะมีคุณสมบัติแตกต่างกันออกไป ซึ่งใน **ตารางที่ 4** จะแสดงถึงชนิดของโพรไบโอติกและการใช้โพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชนิดต่างๆ

ตารางที่ 4 ชนิดของโพรไบโอติกและการใช้โพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชนิดต่างๆ
(ดัดแปลงจาก Balcazar *et al.*, 2006)

ชนิดโพรไบโอติก	ชนิดสัตว์น้ำ	วิธีการใช้โพรไบโอติก	เอกสารอ้างอิง
<i>Streptococcus lactis</i> และ <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	ตัวอ่อนปลา Turbot (<i>Scophthalmus maximus</i>)	เติมลงในโรติเฟออร์และไดอะตอม	Garcia de la Banda <i>et al.</i> (1992)
<i>Lactobacillus</i> spp. และ <i>Carnobacterium</i> spp.	ตัวอ่อนปลา Turbot	เติมในโรติเฟออร์	Gatesoupe (1994)
<i>V. alginolyticus</i>	ปลาแอตแลนติกแซลมอน (<i>Salmo salar</i> L.)	แช่ใน cell suspension	Austin <i>et al.</i> (1995)
<i>Carnobacterium divergens</i>	ปลาคอดแอตแลนติก	เติมในอาหาร	Gildberg and Mikkelsen (1998)
G-probiotic	ปลานิลลูกผสม	เติมในอาหาร	Naik <i>et al.</i> (1999)
<i>Carnobacterium</i> spp.	ปลาแอตแลนติกแซลมอน	เติมในอาหาร	Robertson <i>et al.</i> (2000)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 53103	ปลาแตรดำสายรุ้ง	เติมในอาหาร	Nikoskelainen <i>et al.</i> (2001)
<i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>V. fluvialis</i> , <i>Carnobacterium</i> spp. และ <i>Micrococcus luteus</i>	ปลาแตรดำสายรุ้ง	เติมในอาหาร	Irianto and Austin (2002)
<i>Enterococcus faecium</i> SF68	ปลาไหล (<i>Anguilla Anguilla</i>)	เติมในอาหาร	Chang and Liu (2002)
<i>L. rhamnosus</i> JCM 1136	ปลาแตรดำสายรุ้ง	เติมในอาหาร	Panigrahi <i>et al.</i> (2004)
<i>Bacillus circulans</i>	ปลาอีสกเทศ (<i>Labeo rohita</i>)	เติมในอาหาร	Ghosh <i>et al.</i> (2004)
<i>Bacillus</i> spp. S11	กุ้งกุลาดำ	เติมในอาหาร	Rengpipat <i>et al.</i> (1998)
<i>Lactobacillus</i> spp.	กุ้งกุลาดำ	เติมในอาหาร	Phianphak <i>et al.</i> (1999)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Phaffia rhodozyma</i> และ <i>S. exiguus</i>	กุ้งขาว	เติมในอาหาร	Scholz <i>et al.</i> (1999)
<i>V. hepatarius</i> , <i>Vibrio</i> spp. และ <i>Bacillus</i> spp.	กุ้งขาว	เติมในอาหาร	Balcazar (2003)

7.2 ประโยชน์ของโพรไบโอติก

7.2.1 โพรไบโอติกที่เติมในอาหารสัตว์น้ำ

โพรไบโอติกกลุ่มที่นำมาเติมในอาหารสัตว์น้ำนั้นจะมีหน้าที่ในการช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตและช่วยสร้างภูมิคุ้มกันให้แก่สัตว์น้ำเศรษฐกิจด้วยกระบวนการดังต่อไปนี้ คือ

7.1.1 เพื่อให้เกิดสมดุลในระบบทางเดินอาหาร

โดยปกติจุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้ของสัตว์น้ำประกอบด้วยจุลินทรีย์กลุ่มที่ประโยชน์และกลุ่มที่ก่อให้เกิดโทษ เมื่อมีการเสียสมดุลและมีปริมาณจุลินทรีย์ที่ไม่ดีจำนวนมากจะทำให้เกิดโรค (Gatesoupe, 1999) จึงมีการนำโพรไบโอติกซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่มที่มีประโยชน์มาใช้ในการเลี้ยงสัตว์น้ำ เพื่อให้มีปริมาณของจุลินทรีย์กลุ่มที่มีประโยชน์อยู่เสมอ ซึ่งจะส่งผลให้สัตว์น้ำมีอัตราการเจริญเติบโตสูงขึ้น (สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, 2551; สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และคณะ, 2551; Balcazar *et al.*, 2006) ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของโพรไบโอติกในท่อทางเดินอาหาร ได้แก่ อุณหภูมิ ค่า Redox potential เอนไซม์ และระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำ รวมทั้งสารพิษหรือสารเคมีที่จุลินทรีย์ในท่อทางเดินอาหารสร้างขึ้น เช่น เอนไซม์โปรติเอส แบคทีเรียโอซินไลโซไซม์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แอมโมเนีย ไดอะซิติล กรดอินทรีย์ (สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2552; Gullian *et al.*, 2004)

7.1.2 เพื่อยับยั้งเชื้อก่อโรคและกระตุ้นภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำ

โพรไบโอติกมีกลไกในการยับยั้งเชื้อก่อโรคและลดระยะเวลาการเกิดโรคด้วยกลไกต่าง ๆ ขึ้นอยู่กับชนิดของโพรไบโอติก (Balcazar *et al.*, 2006) ยกตัวอย่างเช่น แบคทีเรียโพรไบโอติกกลุ่ม *Bacillus* สามารถลดปริมาณแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอในทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำได้ (ไตรมาศ บุญไทย และคณะ, 2550) และโพรไบโอติกกลุ่ม *Lactobacillus* ที่ผสมในอาหารกุ้งก้ามกรามสามารถลดปริมาณแบคทีเรียแกรมลบในทางเดินอาหารกุ้งก้ามกรามได้เช่นเดียวกัน (Venkat *et al.*, 2004) นอกจากนี้ Chythanya และคณะ (2002) พบว่าแบคทีเรียทางทะเลสายพันธุ์ *Pseudomonas* I-2 สามารถผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคลกลุ่มวิบริโอในกุ้งได้ การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของโพรไบโอติกเป็นผลมาจากกลไกการทำลายแบคทีเรียก่อโรค โดยการแข่งขันแย่งสารอาหารและหลั่งเอนไซม์ที่สามารถย่อยเมือกที่ล้อมรอบเซลล์แบคทีเรียแกรมลบก่อโรค ทำให้สารปฏิชีวนะที่โพรไบโอติกสร้างขึ้นเข้าทำลายองค์ประกอบของเซลล์ ส่งผลให้แบคทีเรียก่อโรคหยุดการเจริญและถูกทำลายในที่สุด (Moriarty, 1998) จากการศึกษาพบว่าแบคทีเรียโพรไบโอติกบางชนิดยังมีคุณสมบัติในการต่อต้านไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคในสัตว์น้ำ เช่น Hematopoietic necrosis virus (IHNV), Hematopoietic necrosis virus และ Oncorhynchus masou virus (OMV) เป็นต้น (Kamei *et al.*, 1988, Direkbusarakom *et al.*, 1998)

7.1.3 เพื่อช่วยย่อยสลายอาหารขนาดใหญ่ให้เป็นสารอาหารขนาดเล็ก

โพรไบโอติกสามารถช่วยให้สัตว์น้ำดูดซึมอาหารได้ดียิ่งขึ้น โดยโพรไบโอติกจะหลั่งเอนไซม์ออกมาจากเซลล์ เช่น อะไมเลส โปรติเอสและไลเปส ที่ช่วยย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต โปรตีนและไขมัน ตามลำดับ ซึ่งโครงสร้างที่ซับซ้อนให้ได้หน่วยที่เล็กลง เช่น กรดอินทรีย์ กรดไขมัน แอลกอฮอล์ เอสเทอร์ คาร์บอนไดออกไซด์ มีเทนและไฮโดรเจนซัลไฟด์ (Gatesoupe, 1999, Balcazar *et al.*, 2006)

7.2 โพรไบโอติกเพื่อการปรับปรุงคุณภาพน้ำ

การใช้โพรไบโอติกในการปรับปรุงคุณภาพน้ำจะช่วยให้การย่อยสลายสารอินทรีย์ สารอนินทรีย์ เศษอาหารและขี้ก้างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น (Balcazar *et al.*, 2006) อีกทั้งยังช่วยย่อยสลายแอมโมเนียและไนไตรต์ซึ่งเป็นสารประกอบไนโตรเจนที่เป็นพิษต่อสัตว์น้ำ (Boyd, 1979) ส่งผลให้คุณภาพน้ำมีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำและสัตว์น้ำมีสุขภาพแข็งแรงและมีอัตราการรอดชีวิตสูงขึ้น (สุภัททิ ต นิมรัตน์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2552) โพรไบโอติกที่ใช้ควบคุมคุณภาพน้ำเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแสดงดัง **ตารางที่ 5**

ตารางที่ 5 ชนิดของโพรไบโอติกเพื่อควบคุมคุณภาพน้ำในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชนิดต่างๆ

(ดัดแปลงมาจาก Balcazar *et al.*, 2006)

ชนิดโพรไบโอติก	ชนิดสัตว์น้ำ	เอกสารอ้างอิง
<i>B. megaterium</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. polymyxa</i> และ <i>B. licheniformis</i>	ปลาดุกอเมริกัน	Queiroz and Boyd (1998)
<i>V. pelagius</i>	ปลา Turbot	Ringø and Vadstein (1998)
<i>P. fluorescens</i>	ปลาเทราต์สายรุ้ง	Gram <i>et al.</i> (1999)
<i>Roseobacter</i> spp. สายพันธุ์ 27-4	ตัวอ่อนปลา Turbot	Hjelm <i>et al.</i> (2004)
<i>Bacillus</i> sp.	กุ้งกุลาดำ	Moriarty (1998)
<i>Vibrio</i> P62, <i>Vibrio</i> P63 และ <i>Bacillus</i> P64	กุ้งขาว	Gullian <i>et al.</i> (2004)
<i>Pseudomonas</i> sp. และ <i>V. fluvialis</i>	กุ้งกุลาดำ	Alavandi <i>et al.</i> (2004)
<i>Aeromonas media</i> สายพันธุ์ A199	หอยนางรม (<i>Crassostrea gigas</i>)	Gibson <i>et al.</i> (1998)
<i>Roseobacter</i> BS107	หอยเชลล์ (<i>Pecten maximus</i>)	Ruiz-Ponte <i>et al.</i> (1999)
<i>Alteromonas haloplanktis</i>	หอยเชลล์ซีลี (<i>Argopecten purpuratus</i>)	Riquelme <i>et al.</i> (2000)

7.3 โพรไบโอติกเพื่อการบำบัดขี้เลนในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

โพรไบโอติกนอกจากจะใช้เพื่อบำบัดคุณภาพน้ำแล้วยังสามารถนำมาใช้ในการบำบัดขี้เลนในบ่อเพาะเลี้ยงได้ จากการศึกษาเปรียบเทียบการบำบัดขี้เลนจากบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำด้วยการเติมแบคทีเรียโพรไบโอติกกับวิธีการตากแดด ไรบุนขาวและพลิกเลน พบว่าการเติมแบคทีเรียโพรไบโอติกร่วมกับการตากแดดและพลิกเลนสามารถสามารถกำจัด *V. parahaemolyticus* และ *P. aeruginosa* ได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการ

อื่น รวมทั้งยังสามารถปรับค่าพีเอชและปริมาณสารอินทรีย์ให้เหมาะสมกับการเพาะเลี้ยงกุ้งได้อีกด้วย (สุนิสา สุขสวัสดิ์ และคณะ, 2549, 2550, 2551; สุปัทิต นิมรัตน์ และคณะ, 2551; Nimrat et al., 2008)

8. รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สนธิ แดงสกุล และลิลา เรืองแป้น (2541) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของ *Bacillus* จำนวน 6 สายพันธุ์ที่แยกได้จากผิวดินพื้นบ่อเลี้ยงกุ้ง ได้ศึกษาโดยการเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิต น้ำหนักและความยาวที่เพิ่มขึ้น และอัตราการเจริญเติบโตของลูกกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มที่ได้รับโปรไบโอติก เป็นเวลา 15, 25, 35, 45 และ 55 วัน ติดต่อกัน ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่าโปรไบโอติกที่เตรียมจาก *Bacillus* PO27 เป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในด้านการให้อัตราการรอดชีวิตได้สูงอย่างสม่ำเสมอในทุกชุดการทดลอง คือ ร้อยละ 95.32, 92.00, 82.00, 76.66 และ 75.33 เมื่อได้รับโปรไบโอติกเป็นเวลา 15, 25, 35, 45 และ 55 วัน ตามลำดับ โดยมีอัตราการรอดชีวิตสัมพัทธ์ตั้งแต่ร้อยละ 25.00-53.26 ในขณะที่ *Bacillus* PO26 และ PO 25 ให้อัตราการรอดชีวิตรองลงมาตามลำดับ สำหรับประสิทธิภาพในการเพิ่มน้ำหนักและอัตราการเจริญเติบโตนั้นพบว่า *Bacillus* PO26 และ PO27 จะให้ผลสูงกว่ากลุ่มอื่น ส่วน *Bacillus* สายพันธุ์อื่นมีประสิทธิภาพต่ำกว่าชุดควบคุม การวิจัยครั้งนี้แสดงถึงความเป็นไปได้ในการใช้ประโยชน์ของ *Bacillus* ที่แยกได้จากดินในบ่อเลี้ยงกุ้งในแง่เป็นแบคทีเรียโปรไบโอติก อย่างไรก็ตามก่อนที่จะมีการเผยแพร่ให้นำไปใช้จะต้องวิจัยเพิ่มเติมในด้านอันตรายที่อาจเกิดขึ้นจากการใช้ไม่ถูกวิธีหรือใช้ในปริมาณที่ไม่เหมาะสม นอกจากนี้จะต้องศึกษาถึงวิธีการผลิตและเพิ่ม

จำนวนต่อไป

มณจันท์ เมฆธน และกมลพร มาแสวง (2543) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรีย 8 ชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis* AM-01, *B. licheniformis* AM-04, *Bacillus* sp. AM-14, *Bacillus* sp. AM-3065, *Nitrosomonas* sp. AM-11, *Nitrobacter* sp. AM-12, *Thiobacillus* sp. FW-01 และ *Thiobacillus* sp. SW-01 ในการยับยั้ง *Vibrio harveyi* หลังจากทดสอบเป็นเวลา 72 ชั่วโมงในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่า มีแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการยับยั้ง *V. harveyi* ได้แก่ *B. subtilis* AM-01, *B. licheniformis* AM-04 และ *Nitrosomonas* sp. AM-11 พบว่า *B. subtilis* AM-01 มีความสามารถในการควบคุมการเจริญของ *V. harveyi* แบบเข้าครอบครองบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar ช้ากว่า *B. licheniformis* AM-04 และ *Nitrosomonas* sp. AM-11 แต่เมื่อนำ *V. harveyi* ที่ทดสอบด้วย *B. subtilis* AM-01 ไปศึกษาดูความผิดปกติของเซลล์ด้วยกล้อง Transmission electron microscope พบว่า *V. harveyi* มีรูปร่างเปลี่ยนแปลงไปและมีขนาดเล็กกว่าปกติมาก ความผิดปกตินี้เป็นลักษณะแบบถาวร ไม่มีแนวโน้มกลับสู่สภาพปกติ ส่วน *B. licheniformis* AM-04 และ *Nitrosomonas* sp. AM-11 มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของขนาดและรูปร่างของ *V. harveyi* น้อยกว่า *B. subtilis* AM-01

ประดิษฐ์ ชมชื่นชอบ และวารสารณ์ หนูดี (2544) ตรวจสอบติดตามการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบพัฒนา จำนวน 6 ฟาร์ม ในจังหวัดสุราษฎร์ธานี ระหว่างเดือนพฤษภาคมถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2539 พบว่าทุกฟาร์มมีการเลี้ยงกุ้งในระบบกึ่งปิดหรือระบบถายน้ำน้อย มีคุณภาพน้ำอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานคุณภาพน้ำทะเลเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง มีค่าความโปร่งใสอยู่ระหว่าง 35 – 70 เซนติเมตร อุณหภูมิของน้ำอยู่ระหว่าง 29 – 30 องศาเซลเซียส ความเค็มอยู่ระหว่าง 8 – 29 ส่วนในพันส่วน ความเป็นกรด - ด่างอยู่ระหว่าง 7.8 – 8.4 ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำมีค่า 5.4 – 6.9 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าบีโอดีอยู่ระหว่าง 3.2 – 6.8 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าไนเตรต-ไนโตรเจนอยู่ระหว่าง 0.005 – 0.065 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณไนไตรต์-ไนโตรเจนอยู่ระหว่าง 0.001 – 0.050 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณแอมโมเนีย-ไนโตรเจนอยู่ระหว่าง 0.004 – 0.082 มิลลิกรัมต่อลิตร และปริมาณฟอสเฟต-ฟอสฟอรัสอยู่ระหว่าง 0.019 – 0.030 มิลลิกรัมต่อลิตร

สรวิศ เผ่าทองสุข (2546) ได้พัฒนาระบบบำบัดไนเตรตแบบท่อยาว (Tubular denitrification reactor) เพื่อใช้ในเลี้ยงกุ้งระบบปิดในน้ำทะเล โดนอาศัยการทำงานของแบคทีเรียที่เติบโตยึดติดอยู่กับตัวกลางที่บรรจุอยู่ในท่อพลาสติกความยาว 50 เมตร และมีการเติมเมธานอลเป็นแหล่งคาร์บอน โดยแบคทีเรียที่อาศัยอยู่บริเวณตอนต้นของท่อจะหายใจทำให้ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำลดลง และแบคทีเรียในส่วนปลายท่อซึ่งเป็นบริเวณที่มีออกซิเจนต่ำจะรีดิวซ์ไนเตรตโดยขบวนการดีไนตริฟิเคชัน (Denitrification) ได้ผลผลิตสุดท้ายเป็นแก๊สไนโตรเจนซึ่งจะถูกจำกัดออกจากระบบ ทั้งนี้ระบบมีประสิทธิภาพการบำบัดระหว่าง 70 – 90 เปอร์เซ็นต์โดยที่ไม่พบปัญหาการรีดิวซ์ซัลเฟตแล้วเกิดเป็นแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์ และตลอดการทดลอง 7 เดือน ระบบบำบัดสามารถควบคุมความเข้มข้นของไนเตรตในบ่อเลี้ยงกุ้งไว้ได้ต่ำกว่า 20 มิลลิกรัมไนเตรต – ไนโตรเจนต่อลิตร ในขณะที่ชุดควบคุมที่ไม่ได้ติดตั้งระบบบำบัดมีความเข้มข้นไนเตรตสูงกว่า 80 มิลลิกรัมไนเตรต – ไนโตรเจนต่อลิตร

Sakai และคณะ (1996) ศึกษาความสามารถในการเปลี่ยนแปลงไนไตรต์ของแบคทีเรียในกลุ่มเฮเทอโรโทรปจากปริมาณไนไตรต์ที่ถูกใช้ไปและการสะสมไนเตรตที่เกิดขึ้น พบว่า *Bacillusadius* I - 73 มีการเจริญควบคู่กับการสะสมของไนเตรต อันเป็นผลมาจากความเข้มข้นของไนไตรต์ แต่จะถูกยับยั้งการเจริญได้เล็กน้อยถ้าความเข้มข้นของไฮโดรเจนไนไตรต์เป็น 20 มิลลิโมลาร์ โดยปริมาณไนเตรตที่สะสมจะเป็นสัดส่วนกับปริมาณไนไตรต์ที่ถูกใช้ไป ซึ่ง *Bacillusadius* I - 73 จึงจัดเป็นกลุ่มที่สามารถเกิดปฏิกิริยาไนไตรต์ออกซิเดชันได้ แต่ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาดีนิตริฟิเคชัน

Ogilvie และคณะ (1997) ได้รายงานการศึกษาไว้ว่าการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมินั้นจะมีผลต่อความแตกต่างของกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีการใช้ประโยชน์จากไนเตรต โดยที่อุณหภูมิต่ำ (5 องศาเซลเซียส) พบจุลินทรีย์ในกลุ่มดีไนทรีไฟเออร์เป็นส่วนใหญ่ แต่จะพบจุลินทรีย์ในกลุ่ม Fermentative Nitrate – Ammonifiers เช่น *Enterobacter* spp. ที่มีความสามารถในการใช้ไนเตรตได้ดีที่อุณหภูมิค่อนข้างสูง (5 – 20 องศาเซลเซียส) ส่วนที่อุณหภูมิมากกว่า 20 องศา

เซลล์ชีส จะพบกลุ่มจุลินทรีย์กลุ่ม Obligately Fermentative Metabolism ได้แก่ *Klebsiella oxytoca* เป็นสำคัญ

Bhaskar และคณะ (1998) พบว่าแบคทีเรียก่อโรคที่พบในการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) จากการตรวจสอบในน้ำ ดินตะกอน และในตัวกุ้ง ได้แก่ *Salmonella*, *Vibrio cholerae* 01 และ *Listeria monocytogenes* ซึ่งแหล่งสำคัญของเชื้อก่อโรคเหล่านี้มาจากดินตะกอน น้ำและแหล่งอาหารตามธรรมชาติ เช่นสาหร่าย แพลงก์ตอน และสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง อาทิเช่น แพลงก์ตอนสัตว์

Moriarty (1998) ได้ศึกษา *Bacillus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ใช้ในบ่อเลี้ยงกุ้งเพื่อควบคุม *Vibrio* โดยทำการเปรียบเทียบฟาร์มในประเทศอินโดนีเซียที่การเลี้ยงกุ้งมีปัญหาเรื่อง *Vibrio* เรืองแสง ซึ่งในบางฟาร์มการใช้ *Bacillus* เป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกไม่ประสบผลสำเร็จ กุ้งกุลาดำยังคงมีอัตราการตายสูง เนื่องจากฟาร์มไม่มีประสบการณ์ในการใช้แบคทีเรียโพรไบโอติกและการทดลองมีการใช้แบคทีเรียโพรไบโอติกเพียง 80 วันเท่านั้น ในทางตรงกันข้ามฟาร์มที่ใช้แบคทีเรียโพรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งมากกว่า 160 วันจะไม่ประสบกับปัญหาและยังคงช่วยลดปัญหาเกี่ยวกับ *Vibrio* เรืองแสงได้อีกด้วย ในการเติมโพรไบโอติกจะเติมลงในบ่อเลี้ยงในปริมาณ 10^4 - 10^5 CFU/ml นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณของ *Vibrio* ในบ่อมีปริมาณลดลง ในขณะที่ปริมาณ *Bacillus* ในบ่อเลี้ยงก็มีปริมาณเพิ่มมากขึ้น ส่วนปริมาณของ *Vibrio* ในดินตะกอนนั้น มีปริมาณลดลงเช่นเดียวกับบ่อเลี้ยงกุ้งและไม่พบ *Vibrio* เรืองแสงในบ่อเลี้ยงกุ้งที่เติม *Bacillus*

Rengpipat และคณะ (1998) ศึกษาผลของ *Bacillus* สายพันธุ์ S11 ที่มีสมบัติเป็นโพรไบโอติกต่ออัตราการเจริญเติบโตและอัตราการรอดชีวิตของกุ้งกุลาดำ โดยเลี้ยงกุ้งกุลาดำในบ่อคอนกรีตขนาด $80 \times 74 \times 87$ เซนติเมตร ที่มีระบบหมุนเวียนน้ำแบบปิดเป็นเวลา 100 วัน แบ่งการให้อาหารที่เติมโพรไบโอติกออกเป็น 3 รูปแบบ คือ เซลล์มีชีวิต (fresh cells) เซลล์มีชีวิตในสารละลาย normal saline (fresh cells in normal saline solution) และเซลล์แช่แข็ง (lyophilized cells) จากการทดลองกลุ่มที่เติมโพรไบโอติกมีอัตราการรอดชีวิตและน้ำหนักสูงกว่ากลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้รับโพรไบโอติก แต่ไม่มีความแตกต่างกันในกลุ่มที่ให้อาหารที่เติมโพรไบโอติกต่างรูปแบบกัน หลังการเลี้ยง 100 วัน ได้ทำการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคโดยการเติม *V. harveyi* สายพันธุ์ D331 ความเข้มข้น 10^5 CFU/ml เป็นเวลา 10 วัน พบว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับโพรไบโอติกมีอัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่กลุ่มที่ไม่ได้รับโพรไบโอติกมีอัตราการรอดชีวิตเพียงร้อยละ 26 เท่านั้น ซึ่งกุ้งที่รอดชีวิตของกลุ่มที่ได้รับโพรไบโอติกมีลักษณะสมบูรณ์ สุขภาพดี ส่วนกุ้งที่รอดชีวิตของกลุ่มที่ไม่ได้รับโพรไบโอติกนั้นมีสุขภาพไม่ค่อยดี ลักษณะภายนอกและลักษณะของตับและลำไส้ผิดปกติ

Gatesoupe (1999) ศึกษาการใช้โพรไบโอติก (probiotic) กับสัตว์ในระบบเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เพื่อเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ (Biocontrol) ต่อต้านกับเชื้อก่อโรคและเพื่อช่วยฟื้นฟูคุณภาพน้ำ โดยสายพันธุ์ของโพรไบโอติกที่คัดแยกได้นี้ได้แก่แบคทีเรียกลุ่มไนทรีไฟเออร์ และแบคทีเรียในกลุ่ม Vibrionaceae, Pseudomonads, Lactic Acid Bacteria, *Bacillus* spp. และ

ยีสต์ พบว่า *Bacillus subtilis* นั้นสามารถช่วยลดจำนวนเชื้อก่อโรคพวก *Vibrio* spp. ในดิน ตะกอน และ *Bacillus* sp. ที่พบในแหล่งน้ำสามารถต้านทานต่อ *Vibrio vulnificus* ซึ่งอาจจะเกิดจากการขับเอนไซม์ออกมานอกเซลล์ของแบคทีเรียและการแข่งขันในการใช้สารอาหารเพราะ โปรไบโอติกที่ใช้นั้นมีความสามารถในการเจริญได้ดีกว่า

Rengpipat et al. (2000) ได้ศึกษาผลของ *Bacillus* S11 ที่มีสมบัติเป็นโปรไบโอติกต่อการเสริมภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์ (Cellular defenses) ได้แก่ กระบวนการกลืนทำลาย (Phagocytosis) และฟีนอลออกซิเดส (Phenoloxidase) และภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยสารน้ำ (Humoral defenses) ได้แก่ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (Antibacterial activity) ในกุ้งกุลาดำ โดยเลี้ยงกุ้งกุลาดำในถังพลาสติกกลมที่มีระบบหมุนเวียนน้ำแบบปิดเป็นเวลา 90 วัน พบว่ากลุ่มที่ได้รับโปรไบโอติกมีอัตราการรอดชีวิตและน้ำหนักสูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับโปรไบโอติก อีกทั้งมีปริมาณเม็ดเลือดรวม การกลืนทำลายและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียสูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับโปรไบโอติก เมื่อครบ 90 วันของการทดลองได้เหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 ที่มีความรุนแรงกว่าสายพันธุ์ D331 เป็นเวลา 10 วัน ซึ่งกุ้งกุลาดำที่ได้รับโปรไบโอติกมีอัตราการรอดชีวิตร้อยละ 54.3 สูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับโปรไบโอติกคือมีค่าเท่ากับร้อยละ 35.5 ซึ่งเป็นผลมาจาก *Bacillus* S11 กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยสารน้ำและระบบภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์ รวมทั้งการแข่งขันแย่งชิงอาหารในท่อทางเดินอาหารทำให้เชื้อก่อโรคไม่สามารถเจริญได้

Menasveta และคณะ (2001) รายงานผลการศึกษาของการเลือกใช้สับเตรทสำหรับแบคทีเรีย แหล่งคาร์บอน และการเลือกใช้หัวเชื้อแบคทีเรียที่แตกต่างกันจะมีผลต่อการลดปริมาณไนเตรตในบ่อเพาะเลี้ยง โดยการใช้แบคทีเรียกลุ่มดีไนทรีไฟอิงร่วมกับแหล่งสับเตรทที่เป็นเปลือกหอยนางรม และมีเอทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนนั้นสามารถช่วยลดไนเตรตได้ในระดับหนึ่ง แต่ถ้าเปลี่ยนให้เป็นสภาวะที่ไร้ออกซิเจน (Anaerobic) โดยใช้เมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนและเพิ่มระยะเวลาที่น้ำจะสัมผัสกับแบคทีเรียกลุ่มดีไนทรีไฟเออร์บนสับเตรท (Hydraulic Retention Time, HRT) จะสามารถลดปริมาณไนเตรตได้อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) จากมากกว่า 160 มิลลิกรัมต่อลิตร ลดลงเหลือน้อยกว่า 25 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยจะต้องปรับค่า C/N Ratio ให้เหมาะสม เพื่อให้ปฏิกิริยาดีไนทรีฟิเคชันเกิดได้คงที่ เนื่องจากการมีสารอินทรีย์มากเกินไปจะทำให้ค่าพีเอชลดลงหรือในแหล่งน้ำทะเลที่ไม่มีไนเตรต หรือไนไตรต์เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายในกระบวนการเมแทบอลิซึม แบคทีเรียชอบที่จะเลือกใช้ซัลเฟตแทนเป็นผลให้เกิดซัลไฟด์หรือ ไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่มีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำอย่างสูง

Chythanya and Karunasagar (2002) จากรายงานวิจัยกล่าวว่า *Pseudomonads* นั้นเป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อม แหล่งน้ำในบ่อเพาะเลี้ยง ซึ่งจะมีความสัมพันธ์กับเหงือก ผิวหนัง และระบบลำไส้ของปลา จากการทดลอง พบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับ *Pseudomonas* 1 - 2 เพื่อที่จะสามารถผลิตสารต้านไวรัส จากการหลั่งออกมานอกเซลล์

(Extracellular) ได้สูงสุดที่พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 30 – 37 องศาเซลเซียส และความเข้มข้นของ โซเดียมคลอไรด์ที่ 1 เปอร์เซ็นต์ โดยสามารถยับยั้งไวรัสที่เป็นเชื้อก่อโรค Vibriosis ที่สำคัญในการเลี้ยงกุ้งได้ถึง 5 ชนิด คือ *Vibrio harveyi*, *V. fluvialis*, *V. parahaemolyticus*, *V. damsela* และ *V. vulnificus*

Devaraja et al. (2002) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงกลุ่มแบคทีเรียในบ่อเลี้ยงกุ้งที่บำบัดด้วยกลุ่มจุลินทรีย์ทางการค้า คือผลิตภัณฑ์ 1 ประกอบด้วย *Bacillus* sp. และ *Saccharomyces* sp. และ ผลิตภัณฑ์ 2 ประกอบด้วย *Bacillus* sp., *Nitrosomonas* sp. และ *Nitrobacter* sp. พบว่าจากตัวอย่างน้ำและดินตะกอนในทุกบ่อจะมีแบคทีเรียที่โดดเด่น คือ *Bacillus* sp. โดยบ่อที่บำบัดด้วยผลิตภัณฑ์ 1 จะมีแบคทีเรียในกลุ่มเฮเทอโรโทรป (Total Plate Count) และ Presumptive Sulphur Oxidizers สูงสุดเท่ากับ $1.24 \times 10^6 \pm 0.27 \times 10^6$ cfu g⁻¹ และ $1.01 \times 10^2 \pm 0.19 \times 10^2$ cfu g⁻¹ ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) จากบ่อทดลองอื่น สำหรับจำนวนของแบคทีเรียพวกเฮเทอโรโทรป ในทุกบ่อการทดลองจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเลี้ยง และผลิตภัณฑ์ทั้ง 2 นี้ยังมีผลไปยับยั้งปริมาณแบคทีเรียก่อโรคพวก Presumptive vibrios ให้มีจำนวนต่ำกว่าบ่อที่ไม่มีการเติมผลิตภัณฑ์ลงไป เมื่อปริมาณออกซิเจนในดินตะกอนหมดไป แบคทีเรียกลุ่มที่ก่อให้เกิดขบวนการหมักจะทำงานแล้วปลดปล่อยสารประกอบรูปรีดิวซ์พวกกรด แอลกอฮอล์ คาร์บอนไดออกไซด์และไฮโดรเจน ซึ่งจะถูกใช้ไปโดยแบคทีเรียที่สามารถรีดิวซ์ซัลเฟอร์

Thompson et al. (2002) ศึกษาการใช้กลุ่มจุลินทรีย์ที่มี Extracellular Polymeric Substance เพื่อจับกับผิวหน้าวัสดุที่จมอยู่ในน้ำได้เพื่อผลิตไบโอฟิล์ม (Biofilm) ซึ่งพบจุลินทรีย์ต่าง ๆ ประกอบด้วย Pennate diatoms (*Amphora*, *Compylopyxis*, *Navicula*, *Sinedra*, *Hantzschia* และ *Cylindrotheca*), Filamentous Cyanobacteria (*Oscillatoria* และ *Spirulina*), Flagellates, Ciliates และ แบคทีเรียพวกไนโตรไฟเอร์ ผลการทดลองทำให้ฟอสฟอรัสลดลง ช่วยลดปัญหายูโทรฟิเคชัน (Eutrofication) ในสิ่งแวดล้อมได้ ในขณะที่ไนเตรต และไนไตรต์จะเพิ่มขึ้น เมื่อความเข้มข้นของแอมโมเนียลดลง นอกจากนี้จุลินทรีย์ต่าง ๆ ในระบบอาจจะมีการผลิตแร่ธาตุที่จำเป็น (Essential Elements) ซึ่งจะช่วยสนับสนุนการเจริญของกุ้ง เช่นกรดไขมันไม่อิ่มตัว สเตอรอยด์ กรดอะมิโน วิตามิน และแคโรทีนอยด์ ทั้งนี้การใช้ ไบโอฟิล์มก็อาจจะมีข้อเสีย คือ เป็นแหล่งสะสมของแบคทีเรียก่อโรค เช่น *Vibrio harveyi* ที่จะต้องใช้ยาปฏิชีวนะปริมาณมากในการกำจัด แต่สำหรับพวก Microalgae หลายชนิดในระบบสามารถผลิตยาปฏิชีวนะที่จะช่วยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคและการกำจัดด้วยการจับกินโดยโปรโตซัว

Burford et al. (2003) ศึกษาการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) โดยพัฒนาการเลี้ยงกุ้งแบบหนาแน่นให้เป็นระบบปิดแทนวิธีการเลี้ยงแบบดั้งเดิม (Conventional) ที่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำที่ Belize Aquacultural Ltd. (BAL) ในประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่าอาหารที่ใช้เลี้ยงกุ้งจะเกิดการย่อยสลายเปลี่ยนแปลงไปเป็นสารอินทรีย์ และสารอนินทรีย์ไนโตรเจนที่

ละลายน้ำในความเข้มข้นสูง (2.29 – 5.56 และ 0.17 – 10.66 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ) ซึ่งจะไปส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรีย แพลงก์ตอนพืช และโพรโตซัว มีการใช้ออกซิเจนไปมากกว่า 22 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันที่วัดได้จากการลดลงของ Total Ammonical Nitrogen (TAN) แต่มีความเข้มข้นของไนไตรต์ และไนเตรต นอกจากนี้การเลี้ยงในรูปแบบนี้จะมีอนุภาคแขวนลอย (Flocculated Matter) ในปริมาณสูงซึ่งจะเป็นแหล่งสับสเตรทที่ดีสำหรับแบคทีเรียกลุ่มไนโตรไฟเอร์ทำให้ปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันเกิดได้มากกว่าการเลี้ยงแบบดั้งเดิม

Gross et al. (2003) ศึกษาการใช้ตัวกรองชีวภาพ (Biofilter) โดยการใช้จุลินทรีย์จากดินบริเวณที่มีการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เพื่อเป็นการลดระยะเวลาในการผลิตหัวเชื้อเริ่มต้น และเพิ่มประสิทธิภาพของปฏิกิริยาไนตริฟิเคชัน จะต้องไม่เป็นเชื้อก่อโรคและมีช่วง Lag Phase ที่สั้น ทำให้ความเข้มข้นของแอมโมเนียในชุดทดลองลดลงเหลือ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ขณะที่ในชุดควบคุมความเข้มข้นเพิ่มขึ้นถึง 18 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ทั้งนี้การเปลี่ยนแปลงแอมโมเนียไปเป็นไนไตรต์โดยแบคทีเรียที่ทำหน้าที่ออกซิไดส์แอมโมเนีย (Ammonia Oxidizing Bacteria; AOB) และการเปลี่ยนแปลงไนไตรต์ไปเป็นไนเตรตโดยแบคทีเรียที่ทำหน้าที่ออกซิไดส์ไนไตรต์ (Nitrite Oxidizing Bacteria; NOB) แบคทีเรียทั้งสองกลุ่มจัดเป็น Obligate Autotrophs ที่มีการเจริญเติบโตช้าและไวต่อการเปลี่ยนแปลงทางสิ่งแวดล้อม เช่น ความเค็ม แสงและพีเอช อันจะส่งผลต่อความไม่สมดุลในการเกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชัน เกิดการสะสมสารพิษอย่างแอมโมเนีย และไนไตรต์ สำหรับการศึกษาพบจุลินทรีย์ในกลุ่มที่ทำหน้าที่ออกซิไดส์แอมโมเนียโดดเด่นและสามารถทนเค็มได้ 12 – 24 กรัมต่อลิตร คือ *Nitrosospira* sp.

Thakur and Lin (2003) ได้ศึกษาความเป็นไป (Fate) ของสารประกอบไนโตรเจนและฟอสฟอรัสจากปอเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ในระบบปิดซึ่งไม่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำจึงเป็นการรักษาคุณภาพน้ำและลดการปลดปล่อยสารอาหารออกสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ พบว่า อาหารที่ให้กุ้งจะมีสารประกอบไนโตรเจน 76 – 92 เปอร์เซ็นต์ และฟอสฟอรัส 70 – 91 เปอร์เซ็นต์ แต่มีสารอาหารไนโตรเจน และฟอสฟอรัสที่กุ้งสามารถดูดซึมไปใช้ประโยชน์ได้เพียง 23 – 31 เปอร์เซ็นต์ และ 10 – 13 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนไนโตรเจน และฟอสฟอรัสอาหารที่เหลือจะมีการสะสมอยู่บริเวณดินตะกอน 14 – 53 เปอร์เซ็นต์ และ 12 – 29 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งฟอสฟอรัสจะดูดซับกับโคลนในบ่อเพราะมีความสามารถในการจับ (Affinity) ที่แข็งแรง ส่วนไนโตรเจนจะมีการสูญเสียออกจากระบบเพาะเลี้ยงด้วยการระเหยของแอมโมเนียจากการเพิ่มออกซิเจน และค่าพีเอชที่สูงหรือจากการเกิดปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชันบริเวณดินตะกอน

Vaseeharan and Ramasamy (2003) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของ *Bacillus* ในการต่อต้านเชื้อ *Vibrio* โดยทำการศึกษาทั้งในระดับสัตว์ทดลองและระดับห้องปฏิบัติการ โดยในระดับห้องปฏิบัติการได้ใช้สารสกัดจากเซลล์ *B. subtilis* สายพันธุ์ BT23 ในการต้านการเจริญของ *V. harveyi* ที่แยกได้จากกุ้งกุลาดำ เพื่อดูประสิทธิภาพของ *Bacillus* ที่มีคุณสมบัติเป็น

แบคทีเรียโพรไบโอติก ขณะที่การศึกษาในระดับสัตว์ทดลองได้นำ *B. subtilis* BT23 ที่ความเข้มข้น 10^6 - 10^8 CFU/ml เลี้ยงกุ้งกุลาดำเป็นเวลา 6 วัน ก่อนที่จะกระตุ้นให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* ที่ความเข้มข้น 10^3 - 10^4 CFU/ml เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่ากุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วย *B. subtilis* BT23 สามารถลดอัตราการตายสะสมได้ร้อยละ 90 และพบว่า *B. subtilis* BT23 สามารถควบคุมการเจริญของ *Vibriosis* ได้ทั้งในระดับห้องปฏิบัติการและระดับสัตว์ทดลอง

Gullian et al. (2004) ศึกษาการกระตุ้นของแบคทีเรียโพรไบโอติกทั้งในระดับห้องปฏิบัติการและสัตว์ทดลอง ซึ่งได้ทำการคัดเลือกแบคทีเรีย 80 สายพันธุ์ที่แยกได้จากตับกุ้งที่มีสุขภาพดีจากฟาร์มในประเทศเอกวาดอร์ โดยใช้วิธี Agar diffusion technique และ Monoclonal antibody พบว่า *Vibrio* P62, *Vibrio* P63 และ *Bacillus* P64 สามารถยับยั้ง *V. harveyi* (S2) ได้เป็นอย่างดี โดยสามารถยับยั้งได้ร้อยละ 54 19 และ 34 ตามลำดับ จากนั้นนำแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์นี้ไปทดลองในระดับสัตว์ทดลองกับกุ้งขาว (*Penaeus vannamei*) โดยทำการทดสอบความเป็นเชื้อก่อโรคและการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อเซลล์ผู้ให้อาศัย ซึ่งใช้ *V. alginolyticus* (Ili) เป็นชุดควบคุมผลบวก และกุ้งที่ไม่ได้รับโพรไบโอติกเป็นกลุ่มควบคุมผลลบ จากการทดลองพบว่า *Bacillus* P64 สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดีใกล้เคียงกับ *V. alginolyticus* ขณะที่ *Vibrio* P62 กระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ในระดับต่ำ นอกจากนี้น้ำหนักของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยโพรไบโอติกทั้ง 3 สายพันธุ์มีค่ามากกว่ากุ้งขาวที่ไม่ได้รับโพรไบโอติก การทดลองในครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่า *Bacillus* P64 มีสมบัติเป็นทั้งโพรไบโอติกและตัวกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้อย่างดี ส่วน *Vibrio* P62 มีสมบัติเป็นโพรไบโอติกเพียงอย่างเดียวเท่านั้น

Yanbo and Zirong (2005) ได้ศึกษาผลของโพรไบโอติกต่อปลาคาร์พ (*Cyprinus carpio*) โดยทำการแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสง (Photosynthetic bacteria) และ *Bacillus* sp. จากบ่อเลี้ยงปลาคาร์พ จากนั้นนำมาเติมในอาหารเลี้ยงปลา ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ แบคทีเรียสังเคราะห์แสงแช่แข็ง (Lyophilized photosynthetic bacteria) *Bacillus* แช่แข็ง (Lyophilized *Bacillus* sp.) และเชื้อผสม (Mixed culture) หลังจากเลี้ยงปลาคาร์พด้วยโพรไบโอติกเป็นเวลา 60 วัน พบว่าปลาคาร์พที่เลี้ยงด้วยโพรไบโอติกมีอัตราการเจริญเติบโตและอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อดีกว่าชุดควบคุมซึ่งไม่ได้รับโพรไบโอติก รวมทั้งกิจกรรมของเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหาร (ไลเปส อะไมเลสและโปรติเอส) มีค่ามากกว่ากลุ่มควบคุมอีกด้วย และกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสของปลาคาร์พในกลุ่มที่ได้รับโพรไบโอติกแบบเชื้อผสมและ *Bacillus* sp. ยังมีค่ามากกว่ากลุ่มที่ได้รับโพรไบโอติกแบบแบคทีเรียสังเคราะห์แสง และกลุ่มควบคุม สำหรับกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสและไลเปสจะมีค่าสูงในกลุ่มที่ได้รับโพรไบโอติกแบบเชื้อผสม ซึ่งจากการทดลองการเลี้ยงปลาคาร์พด้วยโพรไบโอติกจะช่วยเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตและกิจกรรมของเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหาร และยังช่วยลดอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อได้อีกด้วย ซึ่งการใช้โพรไบโอติกควรใช้ในรูปแบบเชื้อผสมเพื่อให้เกิดประสิทธิภาพในการเลี้ยงมากที่สุด

Ziaei-Nejad et al. (2006) ได้ทำการศึกษาผลของ *Bacillus* ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ อัตราการรอดชีวิตและอัตราการเจริญเติบโตของกุ้งแชบ๊วย (*Fenneropenaeus indicus*) ใน 3 ระยะ ได้แก่ ระยะนอร์เพล็สถึงชูเอีย ซึ่งให้โปรไบโอติกด้วยการเติมลงในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยง ระยะไมซิสถึงโพสลาวา₁₄ ให้โปรไบโอติกด้วยการเติมลงในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงและอาหาร (อาร์ทีเมีย) และระยะสุดท้าย คือ ระยะโพสลาวา₃₀₋₁₂₀ ให้โปรไบโอติกด้วยการเติมลงในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงเช่นเดียวกัน จากการทดลองได้ทำการนับจำนวน *Bacillus* ในท่อทางเดินอาหาร เมื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ปริมาณ *Bacillus* ในท่อทางเดินอาหารที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียที่เติมโปรไบโอติกมีมากกว่าการเติมโปรไบโอติกลงในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยง รวมทั้งกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอสและไลเปสของกุ้งแชบ๊วยที่เติมโปรไบโอติกมีระดับที่สูงกว่ากลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้รับโปรไบโอติกอย่างชัดเจน นอกจากนี้อัตราการเจริญเติบโต อัตราการรอดชีวิตและอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อของกุ้งที่ได้รับโปรไบโอติกยังมีค่าที่ดีกว่ากุ้งที่ไม่ได้รับโปรไบโอติกอีกด้วย ดังนั้นการเลี้ยงกุ้งด้วยโปรไบโอติกตั้งแต่ยังเพาะเลี้ยงอยู่ในโรงเพาะเลี้ยงจนถึงเพาะเลี้ยงอยู่ในฟาร์มจะช่วยพัฒนาการเจริญเติบโตของกุ้งแชบ๊วยได้เป็นอย่างดี

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์

1. วัสดุอุปกรณ์

- 1.1 จานเพาะเชื้อ
- 1.2 ปีกเกอร์
- 1.3 ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 250 และ 500 มิลลิลิตร
- 1.4 หลอดทดลอง
- 1.5 กระบอกตวง
- 1.6 หลอดปั่นเหวี่ยง
- 1.7 แท่งแก้วกระจายเชื้อ
- 1.8 กระบอกจืดยาขนาด 5 10 และ 25 มิลลิลิตร
- 1.9 ออโตปิเปต
- 1.10 บ่อเลี้ยงกุ้งจำลองขนาด 0.8×1.2×0.6 เมตร
- 1.11 API Kit
- 1.12 ขวดซีรัม
- 1.13 จุกยางสำหรับปิดขวดซีรัม
- 1.14 ขวดรูปชมพู่วัดปริมาตร
- 1.15 หัวกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร
- 1.16 กระดาษกรอง

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 2.1 Plate Count Agar (PCA)
- 2.2 Trypticase Soy Broth (TSB)
- 2.3 Trypticase Soy Agar (TSA)
- 2.4 Thiosulphate Citrate Bile Salt Sucrose (TCBS) Agar
- 2.5 Pseudomonas Isolation Agar (PIA)
- 2.6 de Man, Rogosaa and Sharpe (MRS) agar
- 2.7 Skim milk agar
- 2.8 Starch agar
- 2.9 Tributyrin agar
- 2.10 0.85% Sodium Chloride

2.11 Phosphate Buffer Solution (PBS)

3. สารเคมี

3.1 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์การหาปริมาณไนเตรต

- 3.1.1 โพแทสเซียมไนเตรต (KNO_3)
- 3.1.2 บรูซีนซัลเฟต (Brucine Sulfate)
- 3.1.3 กรดซัลฟานิลิก (Sulfanilic Acid)
- 3.1.4 กรดไฮโดรคลอริก (HCl)
- 3.1.5 กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4)
- 3.1.6 โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

3.2 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์การหาปริมาณไนไตรต์

- 3.2.1 โซเดียมไนไตรต์ (NaNO_2)
- 3.2.2 ซัลฟานิลาไมด์ (Sulfanilamide)
- 3.2.3 กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4)
- 3.2.4 N-(1-naphthyl) Ethylenediamine Dihydrochloride (NNED)

3.3 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์การหาปริมาณแอมโมเนีย

- 3.3.1 แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl)
- 3.3.2 โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (5.5% Available Chlorine)
- 3.3.3 โซเดียมซิเตรท (Sodium Citrate)
- 3.3.4 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
- 3.3.5 โซเดียมไนโตรพรัสไซด์ (Sodium Nitroprusside)
- 3.3.6 ฟีนอล (Phenol)
- 3.3.7 95% เอทานอล ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)

3.4. สารเคมีสำหรับวิเคราะห์การหาปริมาณฟอสเฟต

- 3.4.1 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)
- 3.4.2 แอมโมเนียมพาราโมลิบเดต (Ammonium Paramolybdate)
- 3.4.3 แอนติโมนีโพแทสเซียมทาร์เตรต (Antimony Potassium Tartrate)
- 3.4.4 กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4)
- 3.4.5 วิตามินซี (L – Ascorbic Acid)

3.5 สารเคมีและเอนไซม์สำหรับการตรวจสอบยีน *spa* S ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

- 3.5.1 ชุดการสกัดดีเอ็นเอ QIAamp[®] DNA Mini Kit (QIAGEN[®], Germany)
- 3.5.2 10x true start taq buffer
- 3.5.3 2.5 mM dNTP

3.5.4 Primer fP1

3.5.5 Primer rP1

3.5.6 TrueStart™ *taq* DNA Polymerase (Fermentas Life Sciences, USA)

3.5.7 25 mM MgCl₂

3.5.8 10x Loading Dye

3.5.9 Agarose Gel

3.5.10 ชุด TOPO TA Cloning® Kit (Invitrogen™)

4. เครื่องมือ

4.1 เครื่องปั่นเหวี่ยง

4.2 ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator)

4.3 หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)

4.4 เครื่องชั่งแบบทศนิยม 2 ตำแหน่ง

4.5 เครื่องชั่งแบบทศนิยม 4 ตำแหน่ง

4.6 เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer)

4.7 เครื่องแช่เยือกแข็ง (Freeze drier)

4.8 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV- Visible Spectrophotomete)

4.9 ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar Flow)

4.10 เครื่องเขย่า (Rotary Shaker)

4.11 ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven)

4.12 เครื่องมือวัดคุณภาพน้ำ

4.13 เครื่อง Eppendorf Mastercycler Personal Thermal Cycler (USA)

4.14 Electrophoresis Apparatus

วิธีการดำเนินงานวิจัย

วิธีการดำเนินงานวิจัยของการศึกษาในครั้งนี้แบ่งออกเป็น 6 ตอน ดังนี้

1. การคัดแยกและศึกษาคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกที่ผลิตในประเทศและนำเข้าจากต่างประเทศ
2. การศึกษาความสามารถของแบคทีเรียผสมที่แยกได้จากดินในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำและลำไส้กุ้งกุลาดำในการควบคุมคุณภาพน้ำ
3. การศึกษาความสามารถของแบคทีเรียผสมที่แยกได้จากดินในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำและลำไส้กุ้งกุลาดำในการบำบัดซีเลนเปรียบเทียบกับวิธีการบำบัดของเสียวิธีอื่นในบ่อเลี้ยงกุ้งจำลอง

4. การศึกษาการนำแบคทีเรียผสมที่แยกได้จากดินในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำและลำไส้กุ้งกุลาดำมาผสมกับอาหารเม็ดเพื่อช่วยให้กุ้งย่อยอาหารได้ง่ายขึ้นและลดของเสียในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำจำลอง
5. การศึกษายีนของแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติพิเศษในการผลิตสาร Antimicrobial Peptide (AMP) ของแบคทีเรียที่แยกได้จากดินในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำและลำไส้กุ้งกุลาดำ
6. การศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ไลเปสและอะไมเลสของกลุ่มแบคทีเรียที่แยกได้จากดินในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำและลำไส้กุ้งกุลาดำ

ตอนที่ 1 การคัดแยกและศึกษาคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกที่ผลิตในประเทศและนำเข้าจากต่างประเทศ

1.1 การตรวจนับปริมาณแบคทีเรียจากผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก

นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกที่ผลิตในประเทศและนำเข้าจากต่างประเทศจำนวน 12 ผลิตภัณฑ์ ซึ่งกำหนดรหัสเป็น Probiotic 1-12 มาปริมาณ 1 กรัม ใส่ลงใน 0.85% โซเดียมคลอไรด์ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจาง 10 เท่า (Ten-fold dilution) ตูตสารละลายแต่ละความเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar (PCA) และ de Man, Rogosaa and Sharpe (MRS) agar เพื่อตรวจนับปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดและแบคทีเรียแลคติก ตามลำดับ (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) ทำการกระจายเชื้อด้วยเทคนิค Spread plate จากนั้นนำจานเพาะเชื้อ PCA ไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง และนำจานเพาะเชื้อ MRS agar ใส่กล่องพลาสติกที่ปราศจากออกซิเจน (Anaerobic chamber) เพื่อเพาะเชื้อในสภาวะไม่มีออกซิเจน แล้วนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อคำนวณปริมาณโคโลนีต่อกรัม (CFU/g) จากนั้นทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียตามวิธีการของ Bergey's Manual Systematic Bacteriology ร่วมกับชุดการทดสอบ API test kit

1.2 การศึกษากิจกรรมในการย่อยสลายสารอาหารของผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก

นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกที่ทราบปริมาณแบคทีเรียจากข้อ 2.1 มาปรับให้มีปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้นเท่ากันด้วย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ จากนั้นปิเปตตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Skim milk agar, Starch agar และ Tributyrin agar เพื่อทดสอบความสามารถในการย่อยสลายโปรตีน คาร์โบไฮเดรตและไขมัน ตามลำดับ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C โดยอาหารเลี้ยงเชื้อ Skim milk agar และ Tributyrin agar บ่มนาน 48-72 ชั่วโมง และอาหารเลี้ยงเชื้อ Starch agar บ่มนาน 72 ชั่วโมง จากนั้นตรวจวัดขนาดวงใสรอบโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Skim milk agar และ Tributyrin agar ส่วน

อาหารเลี้ยงเชื้อ Starch agar ให้รอดด้วยสารละลายไอโอดีนแล้ววัดขนาดวงใสรอบโคโลนี คำนวณประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอาหาร โดยคำนวณจากอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสรอบโคโลนีต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี เปรียบเทียบอัตราส่วนที่ได้ หากเชื้อใดมีอัตราส่วนมากแสดงว่ามีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอาหารได้ดี

ตอนที่ 2 การศึกษาความสามารถของแบคทีเรียผสมที่แยกได้จากดินในบ่อเลี้ยงกุ้ง กุลาดำและลำไส้กุ้งกุลาดำในการควบคุมคุณภาพน้ำ

2.1 การเตรียม Cell suspension ของแบคทีเรียผสม (Nimrat et al., 2008)

นำแบคทีเรียผสมแต่ละชนิดมาเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ของแบคทีเรีย จากนั้นดูด Cell suspension ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เติมลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหาร TSB ปริมาตร 200 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำ Cell suspension ไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นเติม Phosphate Buffer Saline (PBS) ลงในหลอด Centrifuge นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง ทำเช่นนั้นจนครบ 3 ครั้ง เพื่อเป็นการล้างเซลล์ นำเซลล์ที่ได้วัดค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 580 นาโนเมตร ให้ได้ 1.5 A.U. เพื่อใช้เป็น Cell suspension ที่มีปริมาณเซลล์เท่ากับ 10^{10} CFU/mL

2.2 การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายแอมโมเนีย ไนเตรต ไนไตรต์ และฟอสเฟตของแบคทีเรียผสม ในน้ำและดินตะกอนจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำในเขตซีรุ่ม

การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายสารดังกล่าวภายในขวดซีรุ่มขนาด 100 โดยจะมีการแบ่งการทดลองออกเป็น 3 ชุด ดังนี้ ชุดที่ 1 คือ ชุดทดลองที่เติมแบคทีเรียผสม (Active bottles) นำขวดซีรุ่ม จำนวน 3 ใบ มาเติมน้ำและดินตะกอนจากบ่อเลี้ยงกุ้งปริมาตร 41.2 มิลลิลิตร และ 5 กรัม ตามลำดับ หลังจากนั้นเติม Cell suspension ของแบคทีเรียผสมลงไปปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเติมสารประกอบที่ต้องการศึกษาการย่อยสลายที่ความเข้มข้นต่างๆ คือแอมโมเนียที่ความเข้มข้นเท่ากับ 2.30 มิลลิกรัมต่อลิตร ไนเตรตความเข้มข้น 3.80 มิลลิกรัมต่อลิตร ไนไตรต์ความเข้มข้น 1.20 มิลลิกรัมต่อลิตร และฟอสเฟตความเข้มข้น 0.20 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยความเข้มข้นที่เลือกใช้เนื่องจากเป็นปริมาณที่พบในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำในประเทศไทย ชุดที่ 2 คือ ชุดควบคุมแบบฆ่าเชื้อ (Sterile bottles) ซึ่งจะใช้ขวดซีรุ่มจำนวน 2 ใบ นำมาเติมน้ำและดินตะกอนจากบ่อเลี้ยงกุ้งในปริมาตร 41.2 มิลลิลิตร และ 5 กรัม ตามลำดับ จากนั้นเติม Cell suspension ของแบคทีเรียผสมลงไป 1 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที และเติมสารประกอบที่ต้องการศึกษาการย่อยสลายที่ความเข้มข้นเดียวกับชุดที่ 1 ชุดที่ 3 คือ ชุดควบคุมแบบที่ไม่ใส่เชื้อ

(Background bottles) นำขวดซีรัมจำนวน 2 ใบ มาเติมน้ำและดินตะกอนจากบ่อเลี้ยงกุ้งในปริมาตร 42.2 มิลลิลิตร และ 5 กรัม ตามลำดับ หลังจากนั้นเติมสารประกอบที่ต้องการศึกษาการย่อยสลายที่ความเข้มข้นเดียวกับชุดที่ 1 แต่จะไม่เติมแบคทีเรียผสมลงไป ทำให้ความดันภายในขวดซีรัมของทุกชุดการทดลองเป็นศูนย์โดยการใส่เข็มฉีดยาปลอดเชื้อเสียบลงไปที่จุกยางของขวดซีรัมแล้วปล่อยให้แรงดันภายในขวดออกมาแล้ว นำทั้ง 3 ชุดการทดลองไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C จากนั้นใช้เข็มฉีดยาปลอดเชื้อดูดตัวอย่างน้ำภายในขวดซีรัมของทุกชุดการทดลองไปวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนเตรต ไนไตรต์ แอมโมเนียและฟอสเฟตโดยเริ่มตั้งแต่วันแรกของการทดลอง

วิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนีย ไนเตรต ไนไตรต์และฟอสเฟตในน้ำตัวอย่างที่ทำการศึกษาด้วยการเก็บน้ำตัวอย่างจากการทดลองทั้ง 3 ชุด ในปริมาตรขวดละ 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำส่วนใสมาทำการวิเคราะห์หาปริมาณแอมโมเนียและฟอสเฟตตามวิธีการของ American Water Works Association and Water Pollution Control Federation (1980) ไนเตรตตามวิธีการของ AOAC (2002) และไนไตรต์ตามวิธีของ Stickland and Parson (1972)

การวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมีขั้นตอนดังนี้ คือ เจือจางตัวอย่าง 10 เท่า โดยการดูดน้ำตัวอย่างที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง แล้วเติมน้ำกลั่น 1,800 ไมโครลิตร เพื่อให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 2,000 ไมโครลิตร จากนั้นเติมฟีนอลรีเอเจนต์และโซเดียมไนโตรพรัสไซด์ชนิดละ 80 ไมโครลิตร แล้วเติม Alkaline Stock Solution ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ปิดปลายหลอดทดลองเพื่อป้องกันแอมโมเนียจากบรรยากาศลงไปที่เจือปนตั้งหลอดทดลองทิ้งไว้ให้สารละลายทำปฏิกิริยาโดยสมบูรณ์ประมาณ 60 นาที จะได้สารประกอบสีน้ำเงิน วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร

การวิเคราะห์ไนเตรตมีขั้นตอนดังนี้ คือ เจือจางตัวอย่าง 40 เท่า โดยดูดน้ำตัวอย่างที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง แล้วเติมน้ำกลั่น 1,950 ไมโครลิตร เพื่อให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 2,000 ไมโครลิตร เติมโซเดียมคลอไรด์ปริมาตร 400 ไมโครลิตร และสารละลายซัลฟิวริก 2 มิลลิลิตร นำหลอดทดลองไปแช่ในน้ำแข็งให้สารละลายเย็นลง เติมสารละลายบรูซัน – ซัลฟานิลิกปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปอังไอน้ำอุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำหลอดทดลองไปแช่ในน้ำแข็งให้สารละลายเย็นลง วัดค่าเปอร์เซ็นต์ Transmittance (%T) ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร

การวิเคราะห์ไนไตรต์มีขั้นตอนดังนี้ คือ เจือจางตัวอย่าง 10 เท่า โดยการดูดน้ำตัวอย่างที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองแล้วเติมน้ำกลั่น 1,800 ไมโครลิตร เพื่อให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 2,000 ไมโครลิตร เติมสารละลาย Sulfanilamide และ NNED ชนิดละ 40 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์เป็นเวลา 5 นาที แต่ไม่เกิน

2 ชั่วโมง จะเกิดเป็นสารประกอบสีบานเย็น นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 543 นาโนเมตร

การวิเคราะห์ฟอสเฟตมีขั้นตอนดังนี้ คือ เจือจางตัวอย่าง 2 เท่า โดยการดูดน้ำตัวอย่างที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง แล้วเติมน้ำกลั่นลงไป 1,000 ไมโครลิตร เพื่อให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 2,000 ไมโครลิตร แล้วเติมสารละลาย Mixed Molybdate ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์เป็นเวลา 5 นาที แต่ไม่เกิน 2 ชั่วโมง จะเกิดเป็นสารประกอบสีน้ำเงิน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 885 นาโนเมตร

2.3 การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายแอมโมเนีย ในเทรต ไนไตรต์ และฟอสเฟตในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำจำลอง

สร้างบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำจำลองด้วยการใช้บ่อไฟเบอร์ซีเมนต์พื้นผ้าขนาด 0.8 x 1.2 x 0.6 เมตร จำนวน 6 บ่อ แบ่งออกเป็น 2 ชุดการทดลอง คือ ชุดทดลองที่เติมแบคทีเรียผสมและชุดควบคุม (ไม่เติมแบคทีเรียผสม) อย่างละ 3 บ่อ โดยแต่ละบ่อจะมีการเติมดินจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่บริเวณพื้นบ่อจำลองให้มีความหนา 7 เซนติเมตร และฉาบด้วยซีเมนต์จากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำบริเวณผิวหน้าดินพื้นบ่อจำลองให้มีความหนา 1 เซนติเมตร จากนั้นเติมน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำลงไปให้มีความสูงต่ำกว่าปากบ่อจำลอง 10 เซนติเมตร เปิดเครื่องตีน้ำเพื่อเพิ่มออกซิเจนในน้ำและติดตั้งระบบการหมุนเวียนน้ำภายในชุดการทดลองเดียวกันเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ก่อนปล่อยกุ้งกุลาดำที่ผ่านการเลี้ยงปรับสภาพเป็นเวลา 1 สัปดาห์ จำนวน 20 ตัวต่อบ่อเลี้ยงลงในบ่อเลี้ยงกุ้งจำลอง ซึ่งในชุดทดลองจะมีการเติมแบคทีเรียผสมลงไปเป็นปริมาณ 10, 20 และ 30 มิลลิกรัม ในวันแรก วันที่ 7 และวันที่ 21 ของการทดลองตามลำดับ สำหรับกลุ่มของแบคทีเรียที่จะเติมลงไปนั้นจะต้องมีจำนวนเซลล์อยู่ในช่วง 10^{10} CFU/ml ส่วนในชุดควบคุมจะไม่มีการเติมแบคทีเรียตลอดการทดลอง

เติมแอมโมเนีย ไนไตรต์ และฟอสเฟตที่ระดับความเข้มข้นเดียวกับการทดลองข้อ 2.2 ในวันแรกของการทดลอง จากนั้นเพิ่มความเข้มข้นเป็น 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 และ 21 ของการทดลอง ตามลำดับ ทำการตรวจวัดประสิทธิภาพในการย่อยสลายแอมโมเนีย ไนไตรต์ และฟอสเฟตเช่นเดียวกับการทดลองข้อ 2.2 และตรวจวัดคุณภาพน้ำทางกายภาพ ได้แก่ อุณหภูมิ ความเค็ม ความเป็นกรดต่าง ค่าออกซิเจนละลายน้ำโดยเครื่อง Multiprobe (Horiba W - 20XD Series) และคำนวณเปอร์เซ็นต์การลดลงของแอมโมเนีย ไนไตรต์ และฟอสเฟตจากสูตรต่อไปนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การลดลง} = \frac{\text{ความเข้มข้นเริ่มต้น} - \text{ความเข้มข้นสุดท้าย}}{\text{ความเข้มข้นเริ่มต้น}} \times 100$$

ตอนที่ 3 การศึกษาความสามารถของแบคทีเรียผสมที่แยกได้จากดินในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำและลำไส้กุ้งกุลาดำในการบำบัดชีเลนเปรียบเทียบกับวิธีการบำบัดของเสียวิธีอื่นในบ่อเลี้ยงกุ้งจําลอง

นำแบคทีเรียผสมที่มีความสามารถในการควบคุมคุณภาพน้ำทั้งทางด้านเคมีและทางชีวภาพและการย่อยสลายของเสียที่พื้นบ่อ นำมาศึกษาต่อเนื่องถึงความสามารถของแบคทีเรียผสมในการบำบัดชีเลนเปรียบเทียบกับวิธีการบำบัดของเสียวิธีอื่นในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำจําลอง เพื่อที่จะบ่งบอกถึงความสามารถตามคุณสมบัติที่ 3 ของแบคทีเรียผสมดังกล่าวโดยเริ่มจากการทดลองดังนี้

3.1 การเตรียมบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำจําลอง (Nimrat et al., 2003)

การบำบัดชีเลนและของเสียที่สะสมในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่เตรียมขึ้นมารวมกับวิธีบำบัดชนิดต่างๆ คือ บ่อที่ 1 (Control) ทำการบำบัดชีเลนจากนาุ้งด้วยวิธีการตากแดดธรรมดาเป็นเวลา 15 วัน บ่อที่ 2 ทำการบำบัดชีเลนจากนาุ้งด้วยวิธีการตากแดดธรรมดาผสมกับการพลิกเลน โดยทำการพลิกเลนด้วยข้อปลูกให้ทั่วทั้งบ่อทุก 7 วัน เป็นเวลา 15 วัน (จำนวน 2 ครั้ง) บ่อที่ 3 ทำการบำบัดชีเลนจากนาุ้งด้วยวิธีการตากแดดธรรมดาผสมกับการโรยปูนขาวประมาณ 60 กรัมและการพลิกเลน โดยทำการพลิกเลนด้วยข้อปลูกให้ทั่วทั้งบ่อทุก 7 วัน เป็นเวลา 15 วัน (จำนวน 2 ครั้ง) บ่อที่ 4 ทำการบำบัดชีเลนจากนาุ้งด้วยวิธีการตากแดดธรรมดาผสมกับการโรยปูนขาวประมาณ 60 กรัม เป็นเวลา 15 วัน บ่อที่ 5 ทำการบำบัดชีเลนจากนาุ้งด้วยวิธีการตากแดดธรรมดาผสมกับการใส่แบคทีเรียผสมประมาณ 50 มิลลิลิตร โดยฉีดพ่นให้ทั่วบริเวณผิวหน้าของชีเลน เป็นเวลา 15 วัน และบ่อที่ 6 ทำการบำบัดชีเลนจากนาุ้งด้วยวิธีการตากแดดธรรมดาผสมกับการใส่แบคทีเรียผสมและการพลิกเลน โดยทำการใส่แบคทีเรียผสมประมาณ 50 มิลลิลิตร โดยฉีดพ่นให้ทั่วบริเวณผิวหน้าของชีเลนและพลิกเลนด้วยข้อปลูกให้ทั่วทั้งบ่อทุก 7 วัน เป็นเวลา 15 วัน (จำนวน 2 ครั้ง)

3.2 การวัดคุณภาพตะกอนดินทางกายภาพและเคมีจากชีเลนและปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrios* และ *Pseudomonads* ในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำจําลอง

เก็บตัวอย่างชีเลนทุกๆ 3 วันจนกระทั่งครบวันที่ 15 ของการทดลอง นำมาตรวจคุณภาพทางกายภาพและเคมี คือ ปริมาณอินทรีย์วัตถุและค่าความเป็นกรด-ด่าง ตามวิธีของ ทัศนีย์ อัดตะนันท์ และจรงค์ จันทรเจริญสุข (2542) และแบคทีเรียก่อโรคลกลุ่ม *Vibrios* และ *Pseudomonads* โดยนำตัวอย่างชีเลนปริมาณ 1 กรัม มาเติมใน 0.85% โซเดียมคลอไรด์ปริมาตร 9 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจาง 10 เท่า (Ten-fold dilution) ตูตสารละลายตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulphate Citrate Bile Salt Sucrose (TCBS) Agar และ *Pseudomonas* Isolation Agar (PIA) ตามลำดับ ทำการกระจายเชื้อด้วยเทคนิค Spread plate นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเพื่อจัดจำแนกชนิดของ

แบคทีเรียกลุ่ม *Vibrios* และ *Pseudomonads* ตามวิธีการของ Bergey's Manual Systematic Bacteriology ร่วมกับชุดการทดสอบ API test kit

ตอนที่ 4 การศึกษาการนำแบคทีเรียผสมที่แยกได้จากดินในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำและลำไส้กุ้งกุลาดำมาผสมกับอาหารเม็ดเพื่อช่วยให้กุ้งย่อยอาหารได้ง่ายขึ้นและลดของเสียในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำจำลอง

นำแบคทีเรียผสมที่มีความสามารถในการควบคุมคุณภาพน้ำทั้งทางด้านเคมีและทางชีวภาพ มาศึกษาต่อเนื่องถึงความสามารถของแบคทีเรียผสมเมื่อนำมาผสมกับอาหารเม็ดเพื่อช่วยให้กุ้งย่อยอาหารได้ง่ายขึ้นและลดของเสียในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำจากอาหารที่เหลือในบ่อเลี้ยงกุ้งจำลองจำลอง เพื่อป้องกันถึงประสิทธิภาพของแบคทีเรียผสมดังกล่าว โดยมีวิธีการทดลองดังนี้

4.1 การเตรียมอาหารกุ้งกุลาดำ

นำอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำสำเร็จรูปทางการค้าแบ่งออกเป็น 3 ส่วน ได้แก่ ส่วนที่ 1 เติมแบคทีเรียผสมรูปแบบเซลล์มีชีวิต (Live-sprayed cell) ส่วนที่ 2 เติมแบคทีเรียผสมรูปแบบเซลล์แช่แข็ง (Freeze-dried cell) และส่วนที่ 3 ไม่เติมแบคทีเรียผสม (ควบคุม) โดยนำ Cell suspension ของแบคทีเรียผสมจากการทดลองข้อ 2.1 มา spray กับอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำสำเร็จรูปทางการค้าส่วนที่ 1 ผสมให้เข้ากันอย่างช้า ๆ ผึ่งให้แห้ง และนำ Cell suspension ของแบคทีเรียผสมจากการทดลองข้อ 2.1 มาผลิตเป็นเซลล์แช่แข็งแล้วผสมกับอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำสำเร็จรูปทางการค้าส่วนที่ 2 ผสมให้เข้ากันอย่างช้า ๆ ผึ่งให้แห้ง จากนั้นเก็บรักษาอาหารกุ้งกุลาดำทั้ง 3 ส่วน ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อเตรียมสำหรับนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

4.2 การเตรียมบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำจำลอง (Nimrat et al., 2003)

สร้างบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำจำลองด้วยการใช้บ่อไฟเบอร์ซีเมนต์สี่เหลี่ยมผืนผ้าขนาด 0.8 x 1.2 x 0.6 เมตร จำนวน 9 บ่อ แบ่งออกเป็น 3 ชุดการทดลอง คือ 1) ชุดทดลองที่เติมแบคทีเรียผสมที่อยู่ในรูปแบบเซลล์มีชีวิต 2) ชุดทดลองที่เติมแบคทีเรียผสมที่อยู่ในรูปแบบเซลล์แช่แข็ง และ 3) ชุดควบคุม (ไม่เติมแบคทีเรียผสม) อย่างละ 3 บ่อ โดยแต่ละบ่อจะมีการเติมดินจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่บริเวณพื้นบ่อจำลองให้มีความหนา 7 เซนติเมตร จากนั้นเติมน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำลงไปให้มีความสูงต่ำกว่าปากบ่อจำลอง 10 เซนติเมตร เปิดเครื่องตีน้ำเพื่อเพิ่มออกซิเจนในน้ำ และติดตั้งระบบการหมุนเวียนน้ำภายในชุดการทดลองเดียวกันเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ก่อนปล่อยกุ้งกุลาดำอายุ 1 เดือนที่ผ่านการเลี้ยงปรับสภาพเป็นเวลา 2 สัปดาห์ จำนวน 30 ตัวต่อบ่อเลี้ยงลงในบ่อเลี้ยงกุ้งจำลอง ให้อาหารกุ้งกุลาดำที่ความหนาแน่น 10% ของน้ำหนักตัวทั้งหมดของกุ้งกุลาดำในช่วงเวลา 6.00, 12.00, 18.00 และ 24.00 น. โดยวัดความยาว ชั่งน้ำหนัก วิเคราะห์อัตราการเจริญเติบโต อัตราการรอดชีวิตของกุ้งกุลาดำและปริมาณแบคทีเรียทุก 15 วัน เป็นเวลา 90 วัน

4.3 การตรวจนับปริมาณแบคทีเรียจากกึ่งกลาดำและน้ำที่ใช้เลี้ยงกึ่งกลาดำ

สุ่มจับกึ่งกลาดำจากแต่ละชุดการทดลอง ๆ ละ 3 ตัวและเก็บตัวอย่างน้ำที่ใช้เลี้ยง ปริมาตร 50 มิลลิลิตรด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ แช่กึ่งกลาดำในสารละลายฟอร์มาลินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำ Hepatopancreas และลำไส้ของกึ่งกลาดำปริมาณ 0.2 กรัม และน้ำปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมน้ำใน 0.85% โซเดียมคลอไรด์ จากนั้นเจือจาง 10 เท่า (Ten-fold dilution) ดูดสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar เพื่อตรวจนับปริมาณแบคทีเรีย กลุ่มเฮทโทโรโทรปทั้งหมดและ *Bacillus* และอาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulphate Citrate Bile Salt Sucrose (TCBS) Agar เพื่อตรวจนับปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrios* ทำการกระจายเชื้อด้วย เทคนิค Spread plate นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีบนผิวหน้าอาหาร จากนั้นทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเพื่อจัดจำแนกชนิดของ แบคทีเรียกลุ่ม *Vibrios* ตามวิธีการของ Bergey's Manual Systematic Bacteriology ร่วมกับ ชุดการทดสอบ API kit

ตอนที่ 5 การศึกษายีนของแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติพิเศษในการผลิตสาร Antimicrobial Peptide (AMP) ของแบคทีเรียที่แยกได้จากดินในบ่อเลี้ยงกึ่งกลาดำและลำไส้กึ่งกลาดำ

จากการศึกษาคุณสมบัติของกลุ่มแบคทีเรียว่ามีคุณสมบัติครบทั้ง 4 ประการ ใน ขั้นตอนต่อไปจะทำการศึกษาค้นหาคุณสมบัติพิเศษของแบคทีเรียแต่ละชนิด จากการศึกษา งานวิจัยที่เกี่ยวข้องพบว่าแบคทีเรียโดยเฉพาะ *Bacillus subtilis* มีความสามารถในการผลิตยาปฏิชีวนะ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการผลิตสาร Antimicrobial Peptide (AMP) ด้วยการใช้ยีนกลุ่ม Subtilin หรือแบคทีเรียชนิดอื่นที่ผลิตยีนในกลุ่ม Nisin เป็นต้น เพื่อให้ทราบถึง Sequence และการทำงานของยีนดังกล่าว ซึ่งจะทำให้สามารถพัฒนาศักยภาพของยีนดังกล่าวและนำมา ซึ่งการเพิ่มประสิทธิภาพของกลุ่มแบคทีเรียดังกล่าวได้ในด้านการต้านทานต่อแบคทีเรียก่อโรคต่อไป ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้มีขั้นตอนดังนี้

5.1 การสกัด Genomic DNA ของยีน *spa S* ที่สร้าง AMP กลุ่ม Subtilin โดยใช้ QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN®, Germany)

เพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็วรอบ 7,500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติมน้ำ Enzyme solution ปริมาตร 180 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 30 นาที เติมน้ำ Proteinase K และ Buffer AL ปริมาตร 20 และ 200 ไมโครลิตร ตามลำดับ ผสมด้วยเครื่องปั่นผสม (Vortex) บ่มที่อุณหภูมิ 56 °C นาน 30 นาที แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 °C นาน 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงอย่างรวดเร็ว จากนั้นเติมเอทานอล (96-100%) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมด้วยเครื่องปั่นผสม นาน 15 วินาที นำไปปั่นเหวี่ยงอย่างรวดเร็ว แล้วดูดตัวอย่างมาใส่ลงใน QIAamp Mini Spin column

นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที จากนั้นดูดตัวอย่างใส่ลงใน QIAamp Mini Spin column อันใหม่ เติม Buffer AW1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที แล้วเปลี่ยนไปใส่ QIAamp Mini Spin column อันใหม่ เติม Buffer AW2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที จากนั้นเปลี่ยนไปใส่ QIAamp Mini Spin column อันใหม่อีกครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที จากนั้นนำ QIAamp Mini Spin column ไปใส่ในหลอด Microcentrifuge ขนาด 0.5 มิลลิลิตร แล้วเติม Buffer AE นำไปปั่นที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เก็บหลอด Microcentrifuge ที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

5.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยขั้นตอน Polymerase Chain Reaction (PCR)

นำ Genomic DNA ที่สกัดได้จากข้อ 5.1 มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มปริมาณยีน *spa S* ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้อัตราส่วนดังต่อไปนี้

ตารางที่ 6 องค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR

ชนิดของสาร	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
Template	3.00
10x true start taq buffer	2.50
2.5 mM dNTP	2.00
Primer fP1	1.00
Primer rP1	1.00
25 mM MgCl ₂	2.00
TrueStart TM taq DNA Polymerase (Fermentas Life Sciences, USA)	0.25
Sterile distilled water	13.25
Final volume	25.00

ผสมสารต่าง ๆ ให้เข้ากันและรวบรวมสารไว้กันหลอดโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ประมาณ 3 วินาที นำหลอด Microcentrifuge ขนาด 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในเครื่อง Eppendorf Mastercycler Personal Thermal Cycler, USA โดยตั้งโปรแกรมดังต่อไปนี้

ตารางที่ 7 ขั้นตอนของปฏิกิริยา PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลาที่ใช้ต่อรอบ
Initial denaturation	95	3 นาที
Denaturation	95	30 วินาที
Annealing	45	30 วินาที
Extension	72	30 วินาที
Final extension	72	7 นาที

เมื่อปฏิกิริยา PCR สิ้นสุดแล้วเติม 10x Loading Dye ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมกับ PCR Product จำนวน 10 ไมโครลิตร นำไปตรวจสอบขนาดของ ยีน *spa S* โดยวิธี Agarose Gel Electrophoresis ต่อมาจะทำการ Ligation โดยการใช้ TOPO TA Cloning[®] Kit (Invitrogen[™]) และทำการตรวจสอบการ Transformation ถ้าเกิดโคลนีที่มีการ Transformation จะนำมาศึกษาถึง Sequence ของยีนดังกล่าวเพื่อนำมาสู่การพัฒนาประสิทธิภาพของการเป็นโพรไบโอติกที่ดีในการต้านทานเชื้อก่อโรคหรือนำไปสู่การผลิตสาร AMP ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

ตอนที่ 6 การศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ไลเปสและอะไมเลสของกลุ่มแบคทีเรียที่แยกได้จากดินในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำและลำไส้กุ้งกุลาดำ

นอกจากการศึกษาคูณสมบัติของกลุ่มแบคทีเรียว่ามีคุณสมบัติครบทั้ง 4 ประการในขั้นตอนต่อไปจะทำการศึกษาถึงคุณสมบัติพิเศษในแต่ละชนิดของแบคทีเรียอีกประการหนึ่งคือ การผลิตเอนไซม์ 3 ชนิด ได้แก่ เอนไซม์โปรติเอส ไลเปสและอะไมเลส เพราะถ้ากลุ่มแบคทีเรียดังกล่าวมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดจะทำให้มีการเพิ่มการย่อยสลายอาหารช่วยให้ประหยัดอาหาร ลดปริมาณอาหารที่เหลือและการสะสมของอาหารในบ่อเลี้ยงกุ้ง ซึ่งจะต่อเนื่องถึงทำให้คุณภาพน้ำเสื่อมลงและเพิ่มปริมาณของเสียที่สะสมในบ่อ ดังนั้นการศึกษาถึงสถานะที่ช่วยกระตุ้นให้สร้างเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดจะทำให้เกิดการพัฒนากการผลิตผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพในด้านนี้ต่อไป ซึ่งกระบวนการศึกษาคือ การศึกษาถึงสถานะแวดล้อมต่างๆ เช่น การเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ และความเค็มต่อปริมาณการผลิตเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด โดยมีขั้นตอนการศึกษาดังนี้ คือ เพาะแบคทีเรียบริสุทธิ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 24 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 580 นาโนเมตร ให้ได้ค่าเท่ากับ 1.0 A.U. นำ Cell suspension ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ซึ่งปรับให้มีความเค็มตั้งแต่ 0, 2, 4, 6, 8 และ 10% โซเดียมคลอไรด์ และค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งแต่ 2, 4, 6, 7, 8 และ 10 แล้วทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสด้วยวิธี DNS method ตามวิธีการของ

Bernfeld (1955) เอนไซม์ไลเปสด้วยวิธี Titrimetric assay ตามวิธีการของ Gilbert et al. (1991) และการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสด้วยวิธี Caseinase assay method ตามวิธีการของ Walter (1984)

บทที่ 4

ผลการวิจัย

จากการศึกษาคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกที่ผลิตในประเทศและนำเข้าจากต่างประเทศ และศึกษาความสามารถของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่แยกได้จากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำและลำไส้กุ้งกุลาดำ ในการบำบัดชีเลนและการส่งเสริมการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียในกุ้งกุลาดำ อีกทั้งการศึกษายีนของแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติพิเศษในการผลิตสาร Antimicrobial Peptide ได้ผลการทดลองดังนี้

1. คุณสมบัติของผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกที่ผลิตในประเทศและนำเข้าจากต่างประเทศ

การศึกษาปริมาณและชนิดของแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกที่ผลิตในประเทศและนำเข้าจากต่างประเทศได้จำแนกมาตรฐานของผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกออกเป็น 2 ระดับ คือ 1) ผลิตภัณฑ์ที่ไม่ระบุปริมาณหรือชนิดของแบคทีเรีย และ 2) ผลิตภัณฑ์ที่ระบุปริมาณหรือชนิดของแบคทีเรีย ซึ่งจากการศึกษาพบว่าผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกบางผลิตภัณฑ์ (Probiotic 7, 8, 10 และ 12) ไม่ระบุปริมาณแบคทีเรียบนฉลาก นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก 2 และ 5 เป็นผลิตภัณฑ์ที่ระบุเฉพาะปริมาณแบคทีเรียแต่ไม่ระบุชนิดของแบคทีเรีย ในการศึกษาครั้งนี้ถือว่าผลิตภัณฑ์เหล่านี้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพต่ำ ซึ่งผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกที่มีคุณภาพต่ำที่สุดในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้คือ Probiotic 8 ที่ไม่ระบุทั้งปริมาณและชนิดของแบคทีเรีย

สำหรับผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกอีกกลุ่มหนึ่งคือ ผลิตภัณฑ์ที่ระบุปริมาณหรือชนิดของแบคทีเรีย ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย ได้แก่ กลุ่มที่ปริมาณแบคทีเรียบนฉลากไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณแบคทีเรียที่ตรวจนับได้ กล่าวคือผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกกลุ่มนี้ระบุปริมาณแบคทีเรียบนฉลากเท่ากับ 10^9 CFU/g เมื่อนำมาผลิตภัณฑ์เหล่านี้มาตรวจนับปริมาณแบคทีเรียพบว่า ปริมาณแบคทีเรียของผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกส่วนใหญ่มีค่าอยู่ระหว่าง 6.13×10^2 ถึง 1.26×10^8 CFU/g ซึ่งน้อยกว่าปริมาณที่ระบุบนฉลากข้างขวด ยกเว้นผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก Probiotic 11 ที่ผลิตจากประเทศสหรัฐอเมริกาที่มีปริมาณแบคทีเรียเท่ากับ 1.30×10^9 CFU/g ซึ่งใกล้เคียงกับปริมาณที่ระบุบนฉลากข้างขวดที่มีค่าเท่ากับ 10^9 CFU/g ซึ่งเรียกผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกกลุ่มนี้ว่าผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกที่ปริมาณแบคทีเรียที่ระบุบนฉลากมีความสัมพันธ์กับปริมาณแบคทีเรียที่ตรวจนับได้ ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ปริมาณแบคทีเรียของผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกที่ผลิตในประเทศและนำเข้าจากต่างประเทศ

ผลิตภัณฑ์ โพรไบโอติก	ประเทศผู้ผลิต	ปริมาณแบคทีเรียที่ตรวจนับได้ (CFU/g)	ปริมาณแบคทีเรียที่ระบุข้างฉลาก (CFU/g)	มาตรฐานของผลิตภัณฑ์ตามปริมาณ แบคทีเรียที่ระบุบนฉลาก
Probiotic 1	ไทย	8.57×10^4	10^9	x
Probiotic 2	ไทย	2.07×10^4	10^9	x
Probiotic 3	จีน	1.26×10^4	10^9	x
Probiotic 4	ไทย	8.23×10^3	10^9	x
Probiotic 5	จีน	4.43×10^3	10^9	x
Probiotic 6	ไทย	6.13×10^2	10^9	x
Probiotic 7	ไทย	2.50×10^5	ไม่ปรากฏข้อมูล	-
Probiotic 8	ไทย	1.26×10^8	ไม่ปรากฏข้อมูล	-
Probiotic 9	ไทย	7.55×10^7	10^9	x
Probiotic 10	ไทย	1.70×10^7	ไม่ปรากฏข้อมูล	-
Probiotic 11	สหรัฐอเมริกา	1.30×10^9	10^9	✓
Probiotic 12	ไทย	1.10×10^6	ไม่ปรากฏข้อมูล	-

หมายเหตุ : X ปริมาณแบคทีเรียไม่ตรงตามที่ระบุบนฉลาก
 ✓ ปริมาณแบคทีเรียไม่ตรงตามที่ระบุบนฉลาก
 - ไม่มีปริมาณแบคทีเรียระบุบนฉลาก

เมื่อศึกษาชนิดของแบคทีเรียของผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกพบว่า ผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกหมายเลข 9 เป็นผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกที่ประกอบด้วยชนิดของแบคทีเรียที่แตกต่างจากชนิดที่ระบุบนฉลากมากที่สุด กล่าวคือบนฉลากระบุว่าประกอบด้วยแบคทีเรียมากกว่า 10 ชนิด แต่เมื่อจัดจำแนกชนิดแบคทีเรียพบว่า ประกอบด้วย *Bacillus* เพียงชนิดเดียว สำหรับตัวอย่างหมายเลข 10 และ 12 ไม่พบ *Micrococcus* และ *Clostridium butyricum* ที่ระบุบนฉลาก ตามลำดับ แต่ตรวจพบแบคทีเรียสกุล *Staphylococcus* ในผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกทั้ง 2 ผลิตภัณฑ์ ส่วนผลิตภัณฑ์หมายเลข 1, 3, 4, 6 และ 11 เป็นผลิตภัณฑ์ที่ชนิดของแบคทีเรียที่ระบุบนฉลากมีความสัมพันธ์กับชนิดของแบคทีเรียที่ตรวจพบในผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้การทดลองครั้งนี้ยังแสดงให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกส่วนใหญ่ประกอบด้วยแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ที่ตรวจพบทั้งหมด 40 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 68.10 ของปริมาณไอโซเลททั้งหมดที่คัดแยกได้จากผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกทั้ง 12 ผลิตภัณฑ์ ดังแสดงในตารางที่

ตารางที่ 9 ชนิดของแบคทีเรียของผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกที่ผลิตในประเทศและนำเข้าจากต่างประเทศ

ผลิตภัณฑ์ โพรไบโอติก	ชนิดของแบคทีเรียที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก					จำนวนไอโซเลท ที่แยกได้	ชนิดของแบคทีเรียที่ระบุบนฉลาก	ความสัมพันธ์ของชนิด ที่แยกได้กับชนิดที่ระบุ บนฉลาก
	<i>Bacillus</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Corynebacterium</i>			
Probiotic 1	6	-	-	1	-	7	<i>Bacillus</i> และ <i>Micrococcus</i>	✓
Probiotic 2	4	1	-	2	-	7	-	-
Probiotic 3	3	-	-	-	-	3	<i>Bacillus</i>	✓
Probiotic 4	6	1	-	1	-	8	<i>Bacillus</i> , <i>Micrococcus</i> และ <i>Staphylococcus</i>	✓
Probiotic 5	3	-	-	2	1	6	-	-
Probiotic 6	4	-	-	-	-	4	<i>Bacillus</i>	✓
Probiotic 7	2	-	-	-	-	2	<i>Bacillus</i>	✓
Probiotic 8	2	2	-	-	-	4	-	-
Probiotic 9	1	-	-	-	-	1	ประกอบด้วยจุลินทรีย์มากกว่า 10 ชนิด	✗
Probiotic 10	3	1	-	-	-	4	<i>Bacillus</i> และ <i>Micrococcus</i>	✗
Probiotic 11	3	-	-	-	-	3	<i>Bacillus licheniformis</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. megaterium</i> และ <i>B. polymyxa</i>	✓
Probiotic 12	3	1	1 (<i>Enterococcus</i>)	-	-	5	<i>Streptococcus faecalis</i> , <i>B. mesentericus</i> และ <i>Clostridium butyricum</i>	✗

หมายเหตุ ✓ มีความสัมพันธ์กับชนิดของแบคทีเรียที่ระบุบนฉลาก ✗ ไม่มีความสัมพันธ์กับชนิดของแบคทีเรียที่ระบุบนฉลาก

จากการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอาหารของผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกทั้ง 12 ผลิตภัณฑ์ พบว่าผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก 10 ชนิด ยกเว้นผลิตภัณฑ์หมายเลข 7 และ 9 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอาหารประเภทโปรตีน และผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก 11 ชนิด ยกเว้นหมายเลข 9 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรต ขณะที่เพียง 6 ผลิตภัณฑ์เท่านั้น (ร้อยละ 50 ของผลิตภัณฑ์ทั้งหมด) มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมัน โดยผลิตภัณฑ์หมายเลข 5 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันสูงที่สุด (+7) นอกจากนี้ยังพบว่าผลิตภัณฑ์หมายเลข 7 เป็นผลิตภัณฑ์ที่ไม่สามารถย่อยสลายสารอาหารทั้ง 3 ชนิดได้ ดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอาหารของผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก

ผลิตภัณฑ์ โพรไบโอติก	ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอาหาร					
	โปรตีน		คาร์โบไฮเดรต		ไขมัน	
Probioitc 1	1.72 ± 0.28	4+	1.42 ± 0.32	4+	2.22 ± 0.00	5+
Probioitc 2	1.69 ± 0.00	4+	1.01 ± 0.53	4+	1.60 ± 0.00	4+
Probioitc 3	1.63 ± 0.08	4+	1.16 ± 0.49	4+	1.88 ± 0.12	4+
Probioitc 4	1.59 ± 1.32	4+	1.08 ± 0.11	4+	1.62 ± 1.41	4+
Probioitc 5	1.52 ± 0.12	4+	1.14 ± 0.01	4+	4.52 ± 0.18	7+
Probioitc 6	1.33 ± 0.00	4+	1.19 ± 0.13	4+	1.60 ± 0.00	4+
Probioitc 7	-	-	-	-	-	-
Probioitc 8	1.13 ± 0.13	4+	1.12 ± 0.21	4+	-	-
Probioitc 9	-	-	1.09 ± 0.04	4+	-	-
Probioitc 10	1.07 ± 0.05	4+	1.08 ± 0.11	4+	-	-
Probioitc 11	1.22 ± 0.32	4+	1.00 ± 0.07	3+	-	-
Probioitc 12	1.36 ± 0.15	4+	1.19 ± 0.03	4+	-	-

หมายเหตุ : ประสิทธิภาพการย่อยสลาย: - (0), 1+ (0.01-0.5), 2+ (0.51-0.7), 3+ (0.71-1),
4+ (1.01-2), 5+ (2.01-3), 6+ (3.01-4), 7+ (4.01-5), 8+ (5.01-6), 9+ (6.01-7),
10+ (7.01-8)

2. ประสิทธิภาพในการย่อยสลายแอมโมเนีย ไนเตรต ไนไตรต์และฟอสเฟตของแบคทีเรียผสมที่แยกได้จากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำและลำไส้กุ้งกุลาดำ

2.1 ประสิทธิภาพในการย่อยสลายแอมโมเนีย ไนเตรต ไนไตรต์และฟอสเฟตของแบคทีเรียผสมทั้ง 6 ชนิด ในน้ำและดินตะกอนจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำในเขตซีรัม

จากการศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายแอมโมเนีย ไนเตรต ไนไตรต์และฟอสเฟตของแบคทีเรียผสมทั้ง 6 ชนิด ในน้ำและดินตะกอนจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำในเขตซีรัมพบว่า ชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียผสม (T1) มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายแอมโมเนีย ไนเตรต ไนไตรต์และฟอสเฟตได้ดีที่สุด ซึ่งสารดังกล่าวมีปริมาณลดลงเหลือ 0.077 ± 0.00 , 0.971 ± 0.02 , 0 และ 0.003 ± 0.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในวันที่ 7 ของการทดลอง ขณะที่ชุดควบคุมแบบฆ่าเชื้อและไม่เติมแบคทีเรียผสม (T2) มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายแอมโมเนียได้ดีเท่ากับชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียผสม โดยมีปริมาณแอมโมเนียลดลงเหลือ 0.077 ± 0.00 ในวันที่ 7 ของการทดลอง และชุดควบคุมแบบไม่ฆ่าเชื้อและไม่เติมแบคทีเรียผสม (T3) ไม่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารดังกล่าว ดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ประสิทธิภาพในการย่อยสลายแอมโมเนีย ไนเตรต ไนไตรต์และฟอสเฟต โดยแบคทีเรียผสม 6 ชนิดภายในขวดซีรัม

พารามิเตอร์	ชุดการทดลอง	ระยะเวลา (วัน)								
		0	0.7	1	2	3	4	5	6	7
แอมโมเนีย	T1	2.300 ± 0.00	1.386 ± 0.04	1.493 ± 0.10	1.783 ± 0.23	1.681 ± 0.25	1.783 ± 0.21	1.251 ± 0.19	0.077 ± 0.00	0.077 ± 0.00
	T2	2.300 ± 0.00	1.368 ± 0.12	1.670 ± 0.04	1.628 ± 0.23	1.960 ± 0.01	1.872 ± 0.25	1.044 ± 0.15	0.077 ± 0.00	0.077 ± 0.00
	T3	2.300 ± 0.00	1.846 ± 0.41	1.773 ± 0.34	2.048 ± 0.13	2.358 ± 0.05	3.389 ± 0.15	2.430 ± 0.02	2.900 ± 0.20	2.636 ± 0.11
ไนเตรต	T1	3.800 ± 0.00	2.368 ± 0.55	1.383 ± 0.13	2.163 ± 0.14	2.320 ± 0.45	4.394 ± 0.28	0.921 ± 0.04	0.651 ± 0.04	0.971 ± 0.02
	T2	3.800 ± 0.00	2.244 ± 0.19	1.095 ± 0.04	2.309 ± 0.05	4.749 ± 0.15	4.424 ± 0.02	5.240 ± 0.45	5.887 ± 0.24	5.159 ± 0.11
	T3	3.800 ± 0.00	3.125 ± 0.78	2.457 ± 0.46	2.970 ± 0.85	3.595 ± 0.06	2.867 ± 0.03	2.347 ± 0.02	2.127 ± 0.12	4.725 ± 0.03
ไนไตรต์	T1	1.200 ± 0.00	0.672 ± 0.12	0.538 ± 0.00	0.192 ± 0.07	0.184 ± 0.05	0.215 ± 0.15	0.230 ± 0.03	0.110 ± 0.03	0
	T2	1.200 ± 0.00	0.466 ± 0.04	0.395 ± 0.02	0.225 ± 0.04	0.204 ± 0.10	0.152 ± 0.02	0.261 ± 0.01	0.196 ± 0.03	0.103 ± 0.01
	T3	1.200 ± 0.00	0.386 ± 0.02	0.415 ± 0.06	0.955 ± 0.18	1.341 ± 0.02	1.289 ± 0.05	0.759 ± 0.02	0.779 ± 0.10	0.771 ± 0.03
ฟอสเฟต	T1	0.200 ± 0.00	0.272 ± 0.00	0.260 ± 0.01	0.180 ± 0.01	0.352 ± 0.00	0.073 ± 0.01	0.040 ± 0.01	0.009 ± 0.00	0.003 ± 0.00
	T2	0.200 ± 0.00	0.243 ± 0.02	0.270 ± 0.00	0.228 ± 0.01	0.203 ± 0.00	0.181 ± 0.01	0.116 ± 0.01	0.070 ± 0.01	0.022 ± 0.02
	T3	0.200 ± 0.00	0.270 ± 0.00	0.273 ± 0.01	0.245 ± 0.02	0.256 ± 0.00	0.211 ± 0.01	0.241 ± 0.01	0.251 ± 0.01	0.231 ± 0.01

หมายเหตุ: จำนวนตัวอย่างเท่ากับ 3; ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

เมื่อนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การลดลงของแอมโมเนีย ในเทรต ไนไตรต์ และฟอสเฟตโดยแบคทีเรียผสมในขวดซีรัมที่มีการใช้น้ำและดินตะกอนจากบ่อกึ่งกลาดำ แสดงผลการทดลองดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 เปอร์เซ็นต์การลดลงของแอมโมเนีย ในเทรต ไนไตรต์และฟอสเฟต โดยการย่อยสลายของแบคทีเรียผสม 6 ชนิดภายในขวดซีรัม

พารามิเตอร์	T1		T2		T3	
	% การลดลง	ประสิทธิภาพ	% การลดลง	ประสิทธิภาพ	% การลดลง	ประสิทธิภาพ
แอมโมเนีย	96.65	4+	- 14.61	-	96.65	4+
ไนเทรต	74.44	4+	- 35.76	-	- 24.34	-
ไนไตรต์	99.83	4+	35.75	2+	91.42	4+
ฟอสเฟต	98.5	4+	- 15.5	-	89.00	4+

หมายเหตุ : - = 0% (ไม่มีประสิทธิภาพ)
 1+ = 1-20% (ประสิทธิภาพต่ำ)
 2+ = 21-50% (ประสิทธิภาพพอใช้)
 3+ = 51-70% (ประสิทธิภาพดี)
 4+ = 71-100% (ประสิทธิภาพดีเยี่ยม)

จากตารางที่ 12 แสดงให้เห็นว่า ชุดการทดลองที่มีการเติมแบคทีเรียผสม (T1) มีความสามารถในการกำจัดสารทั้ง 4 ชนิด อย่างมีประสิทธิภาพสูง ส่วนชุดการทดลอง T3 ที่ไม่ฆ่าเชื้อและไม่เติมแบคทีเรียผสมสามารถกำจัดแอมโมเนีย ไนไตรต์และฟอสเฟตที่มีอยู่ในน้ำอย่างมีประสิทธิภาพดีมาก (4+; ประสิทธิภาพดีเยี่ยม) เช่นกัน แต่ไม่สามารถกำจัดไนเทรตได้ และชุดการทดลองที่มีการฆ่าเชื้อ (T2) นั้นไม่สามารถกำจัดแอมโมเนีย ไนเทรตและฟอสเฟตได้ และสามารถกำจัดไนไตรต์ได้แต่ประสิทธิภาพพอใช้ (2+; ประสิทธิภาพพอใช้) ดังนั้นสรุปได้ว่าแบคทีเรียผสมมีความสามารถในการกำจัดสารทั้ง 4 ชนิด ที่มีความเข้มข้นสูงเมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นที่พบในบ่อเลี้ยงกึ่งกลาดำโดยทั่วไป

2.2 ประสิทธิภาพในการย่อยสลายแอมโมเนีย ไนเตรต และฟอสเฟตของ แบคทีเรียผสมทั้ง 6 ชนิด ในน้ำและดินตะกอนจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

จากการศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายแอมโมเนีย ไนเตรต และฟอสเฟตโดยใช้แบคทีเรียผสมที่มีการใช้ดิน ตะกอนและน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่มีอายุการเลี้ยงกุ้งกุลาดำประมาณ 3 เดือน ณ จังหวัดฉะเชิงเทรา โดยวิเคราะห์น้ำทางกายภาพ ณ จุดเก็บตัวอย่างจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ พบว่าน้ำมีปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ อุณหภูมิ ความเค็มและพีเอชเท่ากับ 8.51 มิลลิกรัมต่อลิตร 29.74 °C 7 พีพีที และ 7.19 ตามลำดับ และคุณภาพทางเคมี ได้แก่ ปริมาณแอมโมเนีย ไนเตรต ไนไตรต์และฟอสเฟตเท่ากับ 0.703, 1.608, 0.215 และ 0.148 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 13 คุณภาพน้ำทางกายภาพและทางเคมีของตัวอย่างน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

พารามิเตอร์	คุณภาพน้ำ
ค่าออกซิเจนละลายน้ำ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	8.51
อุณหภูมิ (°C)	29.74
ความเค็ม (พีพีที)	7
พีเอช	7.19
แอมโมเนีย (มิลลิกรัมต่อลิตร)	0.703
ไนเตรต (มิลลิกรัมต่อลิตร)	1.608
ไนไตรต์ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	0.215
ฟอสเฟต (มิลลิกรัมต่อลิตร)	0.148

เมื่อนำแบคทีเรียผสมทั้ง 6 ชนิดที่แยกได้จากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำและลำไส้กุ้งกุลาดำมาศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายแอมโมเนีย ไนเตรต ไนไตรต์และฟอสเฟต ในน้ำและดินตะกอนจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำเป็นระยะเวลา 35 วัน แสดงผลการทดลองดังตารางที่ 14

ตารางที่ 14 ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบไนโตรเจนและฟอสฟอรัสของแบคทีเรียผสม

[illegible]

ตารางที่ 14 (ต่อ)

เวลา (วัน)	ไนเตรต		ไนไตรต์		แอมโมเนีย		ฟอสเฟต	
	ชุดควบคุม	ชุดทดลอง	ชุดควบคุม	ชุดทดลอง	ชุดควบคุม	ชุดทดลอง	ชุดควบคุม	ชุดทดลอง
21.5	23.105 $\pm$ 0.35	23.652 $\pm$ 0.13	20.025 $\pm$ 0.03	20.114 $\pm$ 0.04	23.859 $\pm$ 0.33	23.847 $\pm$ 0.06	21.275 $\pm$ 0.01	21.274 $\pm$ 0.05
22	17.367 $\pm$ 0.13	14.975 $\pm$ 0.23	19.332 $\pm$ 0.07	18.042 $\pm$ 0.42	23.523 $\pm$ 0.45	17.676 $\pm$ 0.05	18.835 $\pm$ 0.04	18.917 $\pm$ 0.02
24	13.882 $\pm$ 0.20	12.127 $\pm$ 0.32	16.417 $\pm$ 0.20	10.351 $\pm$ 0.06	26.576 $\pm$ 0.51	14.367 $\pm$ 0.35	18.810 $\pm$ 0.01	15.610 $\pm$ 0.07
26	11.882 $\pm$ 0.20	5.170 $\pm$ 0.24	15.002 $\pm$ 0.05	8.332 $\pm$ 0.41	25.363 $\pm$ 0.15	8.955 $\pm$ 0.39	12.357 $\pm$ 0.01	11.714 $\pm$ 0.01
28	12.006 $\pm$ 0.16	9.242 $\pm$ 0.24	11.123 $\pm$ 0.06	4.098 $\pm$ 0.05	16.005 $\pm$ 0.69	11.464 $\pm$ 0.08	5.435 $\pm$ 0.01	5.409 $\pm$ 0.02
30	9.192 $\pm$ 0.18	2.197 $\pm$ 0.19	10.611 $\pm$ 0.05	2.417 $\pm$ 0.05	13.807 $\pm$ 0.11	9.088 $\pm$ 0.53	1.706 $\pm$ 0.01	1.436 $\pm$ 0.01
32	13.733 $\pm$ 0.10	3.944 $\pm$ 0.19	15.860 $\pm$ 0.05	0.002 $\pm$ 0.08	10.781 $\pm$ 0.15	0.087 $\pm$ 0.02	1.790 $\pm$ 0.13	1.549 $\pm$ 0.01
35	15.326 $\pm$ 0.22	-0.377 $\pm$ 0.20	-	-	-	-	2.235 $\pm$ 0.08	1.631 $\pm$ 0.03

หมายเหตุ : (จำนวนตัวอย่างเท่ากับ 3; ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

เมื่อนำเปรียบเทียบประสิทธิภาพการลดลงของแอมโมเนีย ไนเตรต ไนไตรต์และฟอสเฟตในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำจำลองโดยแบคทีเรียผสมทั้ง 6 ชนิด โดยคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การลดลง ดังแสดงในตารางที่ 15

ตารางที่ 15 ประสิทธิภาพการลดลงของสารประกอบไนโตรเจนและฟอสเฟตในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำจำลอง

พารามิเตอร์	ความเข้มข้น (mg/L)	ชุดควบคุม		ชุดทดลอง	
		การลดลง (%)	ประสิทธิภาพ	การลดลง (%)	ประสิทธิภาพ
ไนเตรต	3.8	37.64	2+	99.84	4+
	10	37.77	2+	58.12	3+
	20	43.16	2+	99.98	4+
ไนไตรต์	1.2	28.30	2+	87.84	4+
	10	44.38	2+	90.54	4+
	20	39.10	2+	99.99	4+
แอมโมเนีย	2.3	64.61	3+	95.26	4+
	10	77.52	3+	97.43	4+
	20	51.94	3+	99.56	4+
ฟอสเฟต	0.2	54.05	3+	65.05	3+
	10	77.80	4+	74.58	4+
	20	89.97	4+	92.77	4+

หมายเหตุ : - = 0% (ไม่มีประสิทธิภาพ)
 1+ = 1-20% (ประสิทธิภาพต่ำ)
 2+ = 21-50% (ประสิทธิภาพพอใช้)
 3+ = 51-70% (ประสิทธิภาพดี)
 4+ = 71-100% (ประสิทธิภาพดีเยี่ยม)

จากตารางที่ 15 แสดงให้เห็นว่า ชุดการทดลองที่มีการเติมแบคทีเรียผสมมีความสามารถในการกำจัดสารประกอบไนโตรเจนสูงกว่าชุดควบคุม โดยมีประสิทธิภาพดีเยี่ยม (4+) ในขณะที่ชุดควบคุมมีประสิทธิภาพพอใช้ในการกำจัดสารดังกล่าว นอกจากนี้ยังพบว่าชุดการทดลองที่มีการเติมแบคทีเรียผสมมีความสามารถในการกำจัดฟอสเฟตได้ดีเท่ากับชุดควบคุม

3. ความสามารถของแบคทีเรียผสมในการบำบัดซีเลนเปรียบเทียบกับวิธีการบำบัดของเสียวิธีอื่นในบ่อเลี้ยงกุ้งจำลอง

3.1 พีเอชของซีเลนที่บำบัดด้วยวิธีการแตกต่างกัน

จากการวัดพีเอชในช่วงเริ่มต้นการทดลองของซีเลนในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำจำลองของชุดควบคุมและชุดการทดลองในการทดลองรอบที่ 1 มีค่าอยู่ระหว่าง 7.19 ± 0.17 ถึง 7.41 ± 0.14 ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ระหว่างกัน ซึ่งพีเอชของซีเลนในชุดควบคุมที่ทำการตากแดดของช่วงเริ่มต้นมีค่าเท่ากับ 7.19 ± 0.17 แล้วลดลงเหลือ 6.77 ± 0.14 ในวันที่ 3 ของการทดลอง ส่วนบ่อที่ 5 ที่ทำการตากแดดร่วมกับการเติมโพรไบโอติกและบ่อที่ 6 ที่ทำการตากแดดร่วมกับการเติมโพรไบโอติกและการพลิกเลนมีพีเอชลดลงเล็กน้อยในวันที่ 3 ของการทดลอง และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) กับช่วงเริ่มต้นการทดลอง สำหรับบ่อที่ 3 ที่ทำการตากแดดร่วมกับการเติมปูนขาวและการพลิกเลน และบ่อที่ 4 ที่ทำการตากแดดร่วมกับการโรยปูนขาวมีพีเอชลดลงเล็กน้อยในวันที่ 9 ของการทดลอง และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) กับช่วงเริ่มต้นการทดลอง ขณะที่บ่อที่ 2 ที่ทำการตากแดดร่วมกับการพลิกเลนมีพีเอชลดลงจาก 7.38 ± 0.06 เหลือ 6.62 ± 0.15 ในวันที่ 15 ของการทดลอง ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับช่วงเริ่มต้นการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 16

ตารางที่ 16 พีเอชของซีเมนต์ที่บำบัดด้วยวิธีการต่างกันในการทดลองรอบที่ 1

วันที่ทำการ ทดลอง	ตากแดด	ตากแดด+ พลิกเลน	ตากแดด+โรยปูน ขาว+พลิกเลน	ตากแดด+ โรยปูนขาว	ตากแดด+ โพรไบโอติก	ตากแดด+ โพรไบโอติก+พลิกเลน
0	7.19±0.17 ^{a,2}	7.38±0.06 ^{a,3}	7.41±0.14 ^{a,2}	7.39±0.11 ^{a,2}	7.34±0.06 ^{a,2}	7.28±0.13 ^{a,2}
3	6.77±0.14 ^{a,1}	7.19±0.07 ^{b,2}	7.55±0.11 ^{c,2}	7.44±0.08 ^{bc,2}	7.14±0.08 ^{b,1}	6.68±0.02 ^{a,1}
6	6.69±0.08 ^{a,1}	7.02±0.06 ^{b,2}	7.43±0.05 ^{cd,2}	7.53±0.10 ^{d,2}	7.13±0.11 ^{b,1}	6.62±0.13 ^{a,1}
9	6.74±0.17 ^{ab,1}	7.01±0.09 ^{bc,2}	7.22±0.11 ^{c,1}	7.16±0.08 ^{c,1}	6.92±0.02 ^{bc,1}	6.54±0.14 ^{a,1}
12	6.66±0.21 ^{a,1}	7.13±0.12 ^{b,2}	7.30±0.02 ^{b,1}	7.14±0.09 ^{b,1}	6.99±0.04 ^{b,1}	6.51±0.10 ^{a,1}
15	6.67±0.16 ^{ab,1}	6.62±0.15 ^{ab,1}	7.24±0.07 ^{c,1}	7.08±0.07 ^{c,1}	6.99±0.04 ^{bc,1}	6.46±0.13 ^{a,1}

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตัวเลขที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

สำหรับการทดลองรอบที่ 2 โดยการนำซีเมนต์ที่ผ่านการบำบัดจากชุดการทดลองรอบที่ 1 มาบำบัดด้วยวิธีการเดิมภายหลังจากมีการเติมน้ำจากนาุ้งและทิ้งไว้เป็นเวลาประมาณ 10 วัน แล้ววัดพีเอชพบว่าพีเอชในช่วงเริ่มต้นการทดลองของซีเมนต์ในชุดควบคุมและชุดการทดลองในการทดลองรอบที่ 2 มีค่าเพิ่มขึ้นจากการทดลองรอบที่ 1 โดยมีค่าอยู่ในช่วง 7.06 ± 0.10 ถึง 7.52 ± 0.20 ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) กับช่วงเริ่มต้นการทดลอง เมื่อสิ้นสุดการทดลอง (วันที่ 15) พีเอชของบ่อที่ 3 ที่ทำการตากแดดรวมกับการเติมปูนขาวและการพลิกเลน และบ่อที่ 4 ที่ทำการตากแดดตากแดดรวมกับการเติมปูนขาวมีพีเอชค่อนข้างเป็นกลาง ซึ่งมีค่าเท่ากับ 7.39 ± 0.16 และ 7.07 ± 0.05 ตามลำดับ ขณะที่ชุดการทดลองอื่นมีพีเอชเป็นกรดเล็กน้อย ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 6.46 ± 0.07 ถึง 6.71 ± 0.09 ดังแสดงในตารางที่ 17

ตารางที่ 17 พีเอชของซีเมนต์ที่บำบัดด้วยวิธีการต่างกันในการทดลองรอบที่ 2

วันที่ทำการ ทดลอง	ตากแดด	ตากแดด+ พลิกเลน	ตากแดด+ โรยปูนขาว+พลิกเลน	ตากแดด+ โรยปูนขาว	ตากแดด+ โรยไบโอติก	ตากแดด+ โรยไบโอติก+พลิกเลน
0	7.19±0.15 ^{a,2}	7.06±0.10 ^{a,3}	7.52±0.11 ^{ab,2}	7.52±0.20 ^{ab,2}	7.22±0.05 ^{a,2}	7.25±0.12 ^{a,2}
3	6.66±0.26 ^{a,1}	6.75±0.10 ^{a,2}	7.47±0.07 ^{b,12}	7.26±0.17 ^{b,12}	6.64±0.13 ^{a,12}	6.80±0.13 ^{a,1}
6	6.43±0.07 ^{a,1}	6.66±0.08 ^{b,2}	7.41±0.10 ^{c,12}	7.32±0.06 ^{c,12}	6.48±0.12 ^{a,12}	6.56±0.09 ^{ab,1}
9	6.43±0.08 ^{ab,1}	6.25±0.09 ^{a,1}	7.28±0.10 ^{d,1}	7.04±0.03 ^{c,1}	6.27±0.16 ^{a,1}	6.62±0.17 ^{b,1}
12	6.51±0.08 ^{a,1}	6.16±0.11 ^{a,1}	7.41±0.09 ^{b,12}	7.31±0.15 ^{b,12}	6.69±0.13 ^{a,2}	6.51±0.12 ^{a,1}
15	6.55±0.13 ^{a,1}	6.71±0.09 ^{ab,2}	7.39±0.16 ^{c,12}	7.07±0.05 ^{bc,1}	6.46±0.07 ^{a,1}	6.56±0.15 ^{a,1}

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตัวเลขที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

3.2 ปริมาณอินทรีย์วัตถุของซีเลนที่บำบัดด้วยวิธีการแตกต่างกัน

ปริมาณอินทรีย์วัตถุของชุดควบคุมและชุดทดลองในวันเริ่มต้นการทดลองมีค่าอยู่ระหว่าง $1.70 \pm 0.05\%$ ถึง $1.79 \pm 0.07\%$ ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ระหว่างกัน เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่าอินทรีย์วัตถุของชุดควบคุมและชุดทดลองมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจากช่วงเริ่มต้นการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 18

ตารางที่ 18 ปริมาณอินทรีย์วัตถุของซีเมนต์ที่บำบัดด้วยวิธีการแตกต่างกันในการทดลองรอบที่ 1

วันที่ทำการ ทดลอง	ตากแดด	ตากแดด+ พลิกเลน	ตากแดด+ โรยปูนขาว+พลิกเลน	ตากแดด+ โรยปูนขาว	ตากแดด+ โปรไบโอติก	ตากแดด+ โปรไบโอติก+พลิกเลน
0	1.79±0.07 ^{a,1}	1.77±0.04 ^{a,1}	1.74±0.11 ^{a,1}	1.76±0.02 ^{a,1}	1.70±0.05 ^{a,1}	1.79±0.06 ^{a,1}
3	2.89±0.03 ^{a,3}	3.03±0.08 ^{a,3}	2.93±0.09 ^{a,3}	3.04±0.10 ^{a,4}	2.99±0.13 ^{a,4}	3.38±0.13 ^{b,4}
6	2.15±0.06 ^{a,2}	2.59±0.02 ^{bc,2}	2.67±0.09 ^{c,2}	2.53±0.08 ^{b,3}	2.56±0.07 ^{bc,3}	2.68±0.03 ^{c,2}
9	2.15±0.06 ^{a,2}	2.58±0.02 ^{cd,2}	2.51±0.04 ^{c,2}	2.09±0.02 ^{a,2}	2.27±0.06 ^{b,2}	2.64±0.04 ^{d,2}
12	3.37±0.03 ^{b,4}	3.31±0.10 ^{ab,4}	3.16±0.11 ^{a,4}	3.17±0.12 ^{a,4}	3.39±0.16 ^{b,5}	3.12±0.06 ^{a,3}
15	4.13±0.06 ^{a,5}	4.36±0.03 ^{b,5}	4.56±0.07 ^{c,5}	4.32±0.08 ^{b,5}	4.26±0.03 ^{b,6}	4.33±0.08 ^{b,5}

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตัวเลขที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

สำหรับการทดลองรอบที่ 2 โดยการนำซีโคนที่ผ่านการบำบัดจากชุดการทดลองรอบที่ 1 มาบำบัดต่อด้วยวิธีการเดิมภายหลังจากมีการเติมน้ำจากนาุ้งและทิ้งไว้เป็นเวลาประมาณ 10 วัน แล้ววิเคราะห์ปริมาณอินทรีย์วัตถุพบว่า ปริมาณอินทรีย์วัตถุของชุดควบคุมและชุดทดลองในวันเริ่มต้นการทดลองมีค่าอยู่ระหว่าง $1.47 \pm 0.02\%$ ถึง $1.56 \pm 0.06\%$ และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจากช่วงเริ่มต้นการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองรอบที่ 1 ดังแสดงในตารางที่ 19

ตารางที่ 19 ปริมาณอินทรีย์วัตถุของซีเมนต์ที่บำบัดด้วยวิธีการแตกต่างกันในการทดลองรอบที่ 2

วันที่ทำการ ทดลอง	ตากแดด	ตากแดด+ พลิกเลน	ตากแดด+ โรยปูนขาว+พลิกเลน	ตากแดด+ โรยปูนขาว	ตากแดด+ โพรไบโอติก	ตากแดด+ โพรไบโอติก+พลิกเลน
0	1.51±0.04 ^{a,1}	1.47±0.02 ^{a,1}	1.49±0.11 ^{a,1}	1.49±0.02 ^{a,1}	1.56±0.06 ^{a,1}	1.52±0.06 ^{a,1}
3	2.35±0.03 ^{a,2}	2.56±0.01 ^{c,2}	2.48±0.05 ^{b,2}	2.46±0.03 ^{b,2}	2.46±0.01 ^{b,2}	2.64±0.02 ^{d,2}
6	2.78±0.09 ^{a,3}	3.05±0.07 ^{b,3}	2.83±0.12 ^{a,3}	2.94±0.12 ^{ab,4}	2.85±0.10 ^{ab,23}	2.91±0.12 ^{ab,3}
9	2.69±0.12 ^{ab,3}	2.71±0.02 ^{ab,4}	2.61±0.02 ^{a,2}	2.70±0.02 ^{ab,3}	2.87±0.05 ^{bc,23}	2.99±0.02 ^{c,3}
12	3.08±0.06 ^{ab,4}	3.48±0.11 ^{d,5}	3.19±0.14 ^{bc,4}	3.30±0.13 ^{cd,5}	3.16±0.13 ^{bc,3}	2.97±0.05 ^{a,3}
15	4.36±0.06 ^{a,5}	4.64±0.04 ^{a,6}	4.23±0.12 ^{a,5}	4.48±0.12 ^{a,6}	4.17±0.13 ^{a,4}	4.53±0.08 ^{a,4}

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตัวเลขที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

3.3 แบคทีเรียกลุ่ม *Vibrios* จากซีเลนในบ่อเลี้ยงกุ้งจำลองที่บำบัดด้วยวิธีการต่างกัน

จากการบำบัดซีเลนจากนากุ้งในบ่อเลี้ยงกุ้งจำลองด้วยวิธีการต่าง ๆ ในชุดการทดลองรอบที่ 1 พบว่าปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrios* จะลดลงในทุกบ่อที่ทำการบำบัด โดยพบปริมาณเชื้อกลุ่ม *Vibrios* ได้ในวันที่ 0 และ 3 ของการทดลอง ซึ่งในวันที่ 6, 9, 12 และ 15 ของการทดลองไม่สามารถตรวจพบการเจริญของแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrios* บนอาหาร TCBS agar ดังแสดงในตารางที่ 20 สำหรับการทดลองรอบที่ 2 ตรวจไม่พบการเจริญของแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrios*

ตารางที่ 20 ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม Vibrios (การทดลองรอบที่ 1)

วันที่ทำการ ทดลอง	ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม Vibrios ($\times 10^2$ CFU/g)					
	ตากแดด	ตากแดด+ พลิกเลน	ตากแดด+ โรยปูนขาว+พลิกเลน	ตากแดด+ โรยปูนขาว	ตากแดด+ โปรไบโอติก	ตากแดด+ โปรไบโอติก+พลิกเลน
0	$2.15 \pm 0.15^{a,3}$	$1.65 \pm 0.21^{a,2}$	$1.55 \pm 0.37^{a,3}$	$1.47 \pm 0.57^{a,2}$	$2.05 \pm 0.43^{a,3}$	$1.90 \pm 0.28^{a,3}$
3	$1.60 \pm 0.18^{d,2}$	$1.35 \pm 0.07^{c,2}$	$0.85 \pm 0.21^{b,2}$	$1.65 \pm 0.21^{d,2}$	$1.03 \pm 0.06^{b,2}$	$0.35 \pm 0.07^{a,2}$
6	$0 \pm 0^{a,1}$	$0 \pm 0^{a,1}$	$0 \pm 0^{a,1}$	$0 \pm 0^{a,1}$	$0 \pm 0^{a,1}$	$0 \pm 0^{a,1}$
9	$0 \pm 0^{a,1}$	$0 \pm 0^{a,1}$	$0 \pm 0^{a,1}$	$0 \pm 0^{a,1}$	$0 \pm 0^{a,1}$	$0 \pm 0^{a,1}$
12	$0 \pm 0^{a,1}$	$0 \pm 0^{a,1}$	$0 \pm 0^{a,1}$	$0 \pm 0^{a,1}$	$0 \pm 0^{a,1}$	$0 \pm 0^{a,1}$
15	$0 \pm 0^{a,1}$	$0 \pm 0^{a,1}$	$0 \pm 0^{a,1}$	$0 \pm 0^{a,1}$	$0 \pm 0^{a,1}$	$0 \pm 0^{a,1}$

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตัวเลขที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

เมื่อจัดจำแนกแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrios* พบว่าในวันที่ 0 และ 3 ของการทดลองในรอบที่ 1 สามารถจำแนกได้เป็น *V. parahaemolyticus* ในทุกตัวอย่างซีเลนที่นำมาทำการวิเคราะห์ โดยพบในปริมาณที่ลดลง สำหรับในวันที่ 3 ของการทดลองในรอบ 6 ที่ทำการบำบัดด้วยการตากแดดร่วมกับการเติมโพรไบโอติกและการพลิกเลนตรวจไม่พบ *V. parahaemolyticus* ดังแสดงในตารางที่ 21

ตารางที่ 21 ปริมาณ *V. parahaemolyticus* ในตัวอย่างซีเลนที่บำบัดด้วยวิธีการต่างกันในการทดลองรอบที่ 1

ชุดการทดลอง	พารามิเตอร์	วันที่ 0	วันที่ 3	วันที่ 6	วันที่ 9	วันที่ 12	วันที่ 15
0	ปริมาณแบคทีเรีย (CFU/g)	22.5	17	0	0	0	0
	<i>V. parahaemolyticus</i> (CFU/g)	3.0	3.5	0	0	0	0
	<i>V. parahaemolyticus</i> (%)	13.33	20.59	0	0	0	0
2	ปริมาณแบคทีเรีย (CFU/g)	13.5	13.5	0	0	0	0
	<i>V. parahaemolyticus</i> (CFU/g)	4.5	2.5	0	0	0	0
	<i>V. parahaemolyticus</i> (%)	33.33	18.52	0	0	0	0
3	ปริมาณแบคทีเรีย (CFU/g)	15.5	8.5	0	0	0	0
	<i>V. parahaemolyticus</i> (CFU/g)	5.5	1.5	0	0	0	0
	<i>V. parahaemolyticus</i> (%)	35.48	17.65	0	0	0	0
4	ปริมาณแบคทีเรีย (CFU/g)	13.67	16.5	0	0	0	0
	<i>V. parahaemolyticus</i> (CFU/g)	3.3	3.0	0	0	0	0
	<i>V. parahaemolyticus</i> (%)	24.14	18.18	0	0	0	0
5	ปริมาณแบคทีเรีย (CFU/g)	20.5	10.33	0	0	0	0
	<i>V. parahaemolyticus</i> (CFU/g)	5.0	1.0	0	0	0	0
	<i>V. parahaemolyticus</i> (%)	24.39	9.68	0	0	0	0
6	ปริมาณแบคทีเรีย (CFU/g)	5.0	3.5	0	0	0	0
	<i>V. parahaemolyticus</i> (CFU/g)	1.0	0	0	0	0	0
	<i>V. parahaemolyticus</i> (%)	20.00	0	0	0	0	0

3.4 แบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonads* จากซีเลนในบ่อเลี้ยงกุ้งจำลองที่บำบัดด้วยวิธีการต่างกัน

จากการบำบัดซีเลนจากนากุ้งในบ่อเลี้ยงกุ้งจำลองด้วยวิธีการต่าง ๆ ในชุดการทดลองรอบที่ 1 พบว่าปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonads* จะลดลงในทุกบ่อที่ทำการบำบัด โดยในบ่อ 3 ที่ทำการบำบัดด้วยการตากแดดรวมกับการโรยปูนขาวและการพลิกเลน และบ่อ 6 ที่ทำการบำบัดด้วยการตากแดดรวมกับการเติมโพโรไบโอติกและการพลิกเลนมีปริมาณของแบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonads* ลดลงมากกว่าการบำบัดด้วยวิธีการอื่น ๆ ดังแสดงในตารางที่ 22 และปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonads* ในตัวอย่างซีเลนที่ระยะเวลาต่าง ๆ ที่ทำการทดลองมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) สำหรับปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonads* ในตัวอย่างซีเลนที่ทำการบำบัดด้วยวิธีการทั้ง 6 วิธีที่เวลาเดียวกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$)

ตารางที่ 22 ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม Pseudomonads (การทดลองรอบที่ 1)

วันที่ทำการ ทดลอง	ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม Pseudomonads ($\times 10^3$ CFU/g)					
	ตากแดด	ตากแดด+ พลิกเลน	ตากแดด+ โรยปูนขาว+พลิกเลน	ตากแดด+ โรยปูนขาว	ตากแดด+ โพรไบโอติก	ตากแดด+ โพรไบโอติก+พลิกเลน
0	6.53 $\pm$ 0.78 ^{a,2}	7.25 $\pm$ 0.67 ^{a,2}	8.75 $\pm$ 1.63 ^{a,3}	9.15 $\pm$ 1.20 ^{a,4}	9.45 $\pm$ 2.05 ^{a,3}	8.77 $\pm$ 1.50 ^{a,4}
3	14.87 $\pm$ 0.38 ^{d,5}	16.33 $\pm$ 0.66 ^{e,3}	14.07 $\pm$ 0.67 ^{cd,4}	8.41 $\pm$ 0.71 ^{b,3}	9.36 $\pm$ 0.89 ^{c,3}	4.47 $\pm$ 1.04 ^{a,3}
6	11.24 $\pm$ 0.42 ^{c,4}	3.87 $\pm$ 1.88 ^{a,1}	6.75 $\pm$ 1.27 ^{b,2}	3.92 $\pm$ 2.12 ^{a,2}	3.67 $\pm$ 2.06 ^{a,12}	2.11 $\pm$ 0.85 ^{a,2}
9	4.85 $\pm$ 1.34 ^{e,1}	3.5 $\pm$ 0.66 ^{d,1}	0.75 $\pm$ 0.35 ^{a,1}	1.17 $\pm$ 0.25 ^{ab,1}	2.1 $\pm$ 0.44 ^{bc,1}	2.6 $\pm$ 1.63 ^{cd,2}
12	8.15 $\pm$ 0.35 ^{e,3}	6.67 $\pm$ 0.61 ^{d,2}	1.51 $\pm$ 0.42 ^{a,1}	1.21 $\pm$ 0.42 ^{a,1}	4.67 $\pm$ 0.74 ^{c,2}	2.65 $\pm$ 0.21 ^{b,2}
15	4.75 $\pm$ 1.20 ^{c,1}	2.95 $\pm$ 0.78 ^{b,1}	1.03 $\pm$ 0.28 ^{a,1}	3.03 $\pm$ 0.42 ^{b,2}	3.75 $\pm$ 0.07 ^{b,12}	0.60 $\pm$ 0.2 ^{a,1}

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันในแนวนอนแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)
ตัวเลขที่ต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

สำหรับการทดลองรอบที่ 2 โดยการนำซีเลนที่ผ่านการบำบัดจากชุดการทดลองรอบที่ 1 มาบำบัดต่อด้วยวิธีการเติมภายหลังจากการเติมน้ำจากนาุ้งและทิ้งไว้เป็นเวลาประมาณ 10 วัน พบว่าแบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonads* ในบ่อ 3 ที่ทำการบำบัดด้วยการตากแดดรวมกับการโรยปูนขาวและการพลิกเลนมีปริมาณลดลง และบ่อ 6 ที่ทำการบำบัดด้วยการตากแดดรวมกับการเติมโพรไบโอติกและการพลิกเลน พบว่าตั้งแต่วันที่ 9, 12 และ 15 ของการทดลอง ตรวจไม่พบแบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonads* ดังแสดงในตารางที่ 23 นอกจากนี้ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonads* ในตัวอย่างซีเลนที่ระยะเวลาต่างกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonads* ในตัวอย่างซีเลนที่ทำการบำบัดด้วยวิธีการต่างๆ ทั้ง 6 วิธีที่เวลาเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 23 ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม Pseudomonads (การทดลองรอบที่ 2)

วันที่ทำการ ทดลอง	ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม Pseudomonads ($\times 10^3$ CFU/g)					
	ตากแดด	ตากแดด+พลิก เลน	ตากแดด+โรยปูน ขาว+พลิกเลน	ตากแดด+โรยปูน ขาว	ตากแดด + โพรไบโอติก	ตากแดด+ โพรไบโอติก+พลิก เลน
0	6.80 $\pm$ 2.07 ^{a,23}	9.77 $\pm$ 1.06 ^{a,2}	8.70 $\pm$ 1.95 ^{a,3}	8.12 $\pm$ 1.65 ^{a,2}	11.03 $\pm$ 1.27 ^{a,2}	8.47 $\pm$ 0.25 ^{a,3}
3	5.63 $\pm$ 1.07 ^{ab,12}	13.11 $\pm$ 1.14 ^{c,3}	3.57 $\pm$ 0.95 ^{a,12}	4.51 $\pm$ 0.89 ^{a,1}	7.13 $\pm$ 1.50 ^{b,2}	7.43 $\pm$ 1.52 ^{b,3}
6	13.20 $\pm$ 0.95 ^{c,5}	4.33 $\pm$ 0.65 ^{a,1}	4.07 $\pm$ 0.61 ^{a,12}	7.33 $\pm$ 0.96 ^{b,2}	8.97 $\pm$ 2.72 ^{b,2}	2.17 $\pm$ 0.57 ^{a,2}
9	7.93 $\pm$ 0.67 ^{b,34}	6.32 $\pm$ 0.96 ^{b,1}	8.50 $\pm$ 0.31 ^{b,3}	10.5 $\pm$ 0.92 ^{c,2}	2.23 $\pm$ 0.61 ^{a,1}	0 $\pm$ 0 ^{a,1}
12	4.02 $\pm$ 0.62 ^{c,1}	7.31 $\pm$ 0.4 ^{d,1}	4.63 $\pm$ 0.71 ^{c,2}	9.17 $\pm$ 1.21 ^{e,2}	1.73 $\pm$ 0.12 ^{b,1}	0 $\pm$ 0 ^{a,1}
15	9.51 $\pm$ 0.72 ^{d,4}	6.37 $\pm$ 0.95 ^{c,1}	2.33 $\pm$ 0.41 ^{b,1}	3.3 $\pm$ 0.4 ^{b,1}	2.50 $\pm$ 0.28 ^{b,1}	0 $\pm$ 0 ^{a,1}

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตัวเลขที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

เมื่อจัดจำแนกแบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonads* พบว่าทุกบ่อที่ทำการบำบัดในการทดลองรอบที่ 1 สามารถจัดจำแนกเป็น *Pseudomonas aeruginosa* และแบคทีเรียชนิดนี้มีแนวโน้มลดลงตลอดระยะเวลาการทดลอง โดยวันที่ 15 ของการทดลองตรวจไม่พบ *Ps. aeruginosa* ในบ่อที่ 3 ที่ทำการบำบัดด้วยการตากแดดร่วมกับการโรยปูนขาวและการพลิกเลนมีปริมาณลดลง และบ่อ 6 ที่ทำการบำบัดด้วยการตากแดดร่วมกับการเติมโพโรไบโอติกและการพลิกเลน ดังแสดงในตารางที่ 24

ตารางที่ 24 ปริมาณ *Ps. aeruginosa* ในตัวอย่างซีเมนต์ที่บำบัดด้วยวิธีการต่างกันในการทดลองรอบที่ 1

ชุดการทดลอง	พารามิเตอร์	วันที่ 0	วันที่ 3	วันที่ 6	วันที่ 9	วันที่ 12	วันที่ 15
0	ปริมาณแบคทีเรีย ($\times 10^3$ CFU/g)	6.53	14.87	11.20	4.85	8.15	4.75
	<i>Ps. aeruginosa</i> ($\times 10^3$ CFU/g)	1.73	4.30	4.95	0.95	1.60	0.55
	<i>Ps. aeruginosa</i> (%)	26.49	28.92	44.20	19.59	19.63	11.58
2	ปริมาณแบคทีเรีย ($\times 10^3$ CFU/g)	7.25	16.30	3.87	3.50	6.67	2.95
	<i>Ps. aeruginosa</i> ($\times 10^3$ CFU/g)	3.55	5.60	0.73	0.70	1.00	0.20
	<i>Ps. aeruginosa</i> (%)	48.97	34.36	18.86	20.00	14.99	6.78
3	ปริมาณแบคทีเรีย ($\times 10^3$ CFU/g)	8.75	14.07	6.70	0.75	1.50	1.00
	<i>Ps. aeruginosa</i> ($\times 10^3$ CFU/g)	3.05	4.97	0.85	0.00	0.03	0.00
	<i>Ps. aeruginosa</i> (%)	34.86	35.33	12.69	0.00	2.00	0.00
4	ปริมาณแบคทีเรีย ($\times 10^3$ CFU/g)	17.25	8.40	3.90	1.17	1.20	3.03
	<i>Ps. aeruginosa</i> ($\times 10^3$ CFU/g)	6.80	3.33	0.50	0.27	0.10	0.20
	<i>Ps. aeruginosa</i> (%)	39.42	39.64	12.82	23.08	8.33	6.60
5	ปริมาณแบคทีเรีย ($\times 10^3$ CFU/g)	14.45	9.36	3.67	2.10	4.67	3.75
	<i>Ps. aeruginosa</i> ($\times 10^3$ CFU/g)	5.55	3.90	0.67	0.27	0.43	0.15
	<i>Ps. aeruginosa</i> (%)	38.41	24.89	18.26	12.86	9.21	4.00
6	ปริมาณแบคทีเรีย ($\times 10^3$ CFU/g)	15.77	4.47	2.10	2.60	2.65	0.60
	<i>Ps. aeruginosa</i> ($\times 10^3$ CFU/g)	4.10	1.13	0.30	0.25	0.05	0.00
	<i>Ps. aeruginosa</i> (%)	26.00	25.28	14.29	9.61	1.89	0

สำหรับการทดลองรอบที่ 2 พบว่าปริมาณของ *Ps. aeruginosa* มีแนวโน้มลดลงเช่นเดียวกับการทดลองรอบที่ 1 โดยจะเห็นได้ว่าการบำบัดบ่อที่ 5 ที่ทำการตากแดดร่วมกับการเติมโพโรไบโอติก และบ่อ 6 ที่ทำการบำบัดด้วยการตากแดดร่วมกับการเติมโพโรไบโอติกและการพลิกเลนตรวจไม่พบแบคทีเรียชนิดนี้ตั้งแต่วันที่ 9 ของการทดลอง นอกจากนั้นบ่อที่ 3 ที่ทำการบำบัดด้วยการตากแดด

ร่วมกับการโรยปูนขาวและการพลิกเลนยังตรวจไม่พบ *Ps. aeruginosa* ในวันที่ 15 ของการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 25

ตารางที่ 25 ปริมาณ *Ps. aeruginosa* ในตัวอย่างซีเมนต์ที่บำบัดด้วยวิธีการต่างกันในการทดลองรอบที่ 2

ชุดการทดลอง	พารามิเตอร์	วันที่ 0	วันที่ 3	วันที่ 6	วันที่ 9	วันที่ 12	วันที่ 15
0	ปริมาณแบคทีเรีย ($\times 10^3$ CFU/g)	6.80	5.63	13.20	7.93	4.00	9.50
	<i>Ps. aeruginosa</i> ($\times 10^3$ CFU/g)	0.43	0.37	1.10	0.43	0.20	0.10
	<i>Ps. aeruginosa</i> (%)	6.32	6.57	8.33	5.42	5.00	1.05
2	ปริมาณแบคทีเรีย ($\times 10^3$ CFU/g)	12.77	17.1	4.33	6.30	7.30	6.37
	<i>Ps. aeruginosa</i> ($\times 10^3$ CFU/g)	1.07	1.37	0.30	0.33	0.17	0.03
	<i>Ps. aeruginosa</i> (%)	8.38	8.01	6.93	5.24	2.33	0.47
3	ปริมาณแบคทีเรีย ($\times 10^3$ CFU/g)	8.70	3.57	4.07	8.50	4.63	2.33
	<i>Ps. aeruginosa</i> ($\times 10^3$ CFU/g)	0.73	0.27	0.23	0.20	0.03	0.00
	<i>Ps. aeruginosa</i> (%)	8.39	7.56	5.65	2.35	0.65	0.00
4	ปริมาณแบคทีเรีย ($\times 10^3$ CFU/g)	24.00	4.50	7.33	14.50	9.17	3.30
	<i>Ps. aeruginosa</i> ($\times 10^3$ CFU/g)	3.67	0.37	0.40	0.70	0.20	0.03
	<i>Ps. aeruginosa</i> (%)	15.29	8.22	5.45	4.83	2.18	0.91
5	ปริมาณแบคทีเรีย ($\times 10^3$ CFU/g)	3.00	7.13	18.97	0.00	1.73	2.50
	<i>Ps. aeruginosa</i> ($\times 10^3$ CFU/g)	0.27	0.60	1.27	0.00	0.00	0.00
	<i>Ps. aeruginosa</i> (%)	9.00	8.42	6.69	0.00	0.00	0.00
6	ปริมาณแบคทีเรีย ($\times 10^3$ CFU/g)	1.67	7.43	2.17	0.00	0.00	0.00
	<i>Ps. aeruginosa</i> ($\times 10^3$ CFU/g)	0.10	0.20	0.03	0.00	0.00	0.00
	<i>Ps. aeruginosa</i> (%)	5.99	2.69	1.38	0.00	0.00	0.00

4. ความสามารถของแบคทีเรียผสมต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณของแบคทีเรีย การเจริญเติบโต และคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

การศึกษาผลของแบคทีเรียโพรไบโอติกต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณของแบคทีเรียและการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ โดยเปรียบเทียบรูปแบบของเซลล์มีชีวิต (Live-sprayed) กับเซลล์แช่แข็ง (Freeze-dried) ที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียประจำถิ่นและการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ โดยให้ผลการทดลองดังนี้

4.1 ปริมาณแบคทีเรียในอาหารกึ่งกูลาดำ

อาหารกึ่งกูลาดำที่ไม่เติมโพรไบโอติก (อาหารควบคุม) มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด $1.64 \pm 1.27 \times 10^1$ CFU/g โดยพบ *Bacillus* ในปริมาณน้อย (10 CFU/g) ในขณะที่อาหารที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกในรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์แช่แข็งมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด $6.29 \pm 8.51 \times 10^9$ และ $7.40 \pm 5.10 \times 10^8$ CFU/g ตามลำดับ และพบ *Bacillus* ในปริมาณมากซึ่งอาหารที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกในรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์แช่แข็งมี *Bacillus* เท่ากับ $8.44 \pm 2.99 \times 10^8$ และ $2.27 \pm 1.37 \times 10^8$ CFU/g ตามลำดับ ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาอาหารกึ่งกูลาดำที่อุณหภูมิ 4°C เป็นระยะเวลา 1 เดือน พบว่าอาหารกึ่งกูลาดำมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดลดลงเล็กน้อย โดยอาหารที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกในรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์แช่แข็งมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด $1.02 \pm 5.21 \times 10^9$ และ $2.87 \pm 17.95 \times 10^8$ CFU/g ตามลำดับ และในอาหารที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกในรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์แช่แข็งพบ *Bacillus* เท่ากับ $5.64 \pm 7.14 \times 10^8$ และ $1.44 \pm 12.49 \times 10^8$ CFU/g ตามลำดับ ซึ่งปริมาณแบคทีเรียโพรไบโอติกลดลงร้อยละ 33.18 และ 36.56 ตามลำดับ

4.2 คุณภาพน้ำที่ใช้เลี้ยงกึ่งกูลาดำ

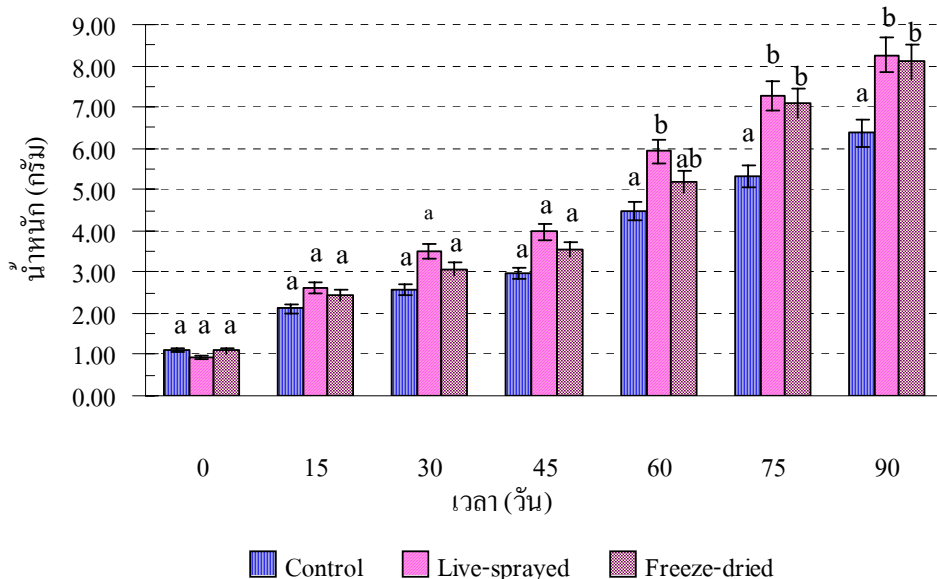
จากการศึกษาคุณภาพน้ำที่ใช้เลี้ยงกึ่งกูลาดำในแต่ละกลุ่มทดลอง พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ในแต่ละกลุ่มทดลอง ตลอดระยะเวลาการทดลอง ซึ่งปริมาณไนโตรเจนและไนเตรตเพิ่มมากขึ้น แต่ไม่เกินระดับที่เป็นพิษต่อกึ่งกูลาดำ ขณะที่พีเอช อุณหภูมิ ความเค็ม ปริมาณของแข็งที่ละลายในน้ำและปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำมีค่าค่อนข้างคงที่และอยู่ในระดับที่ยอมรับได้สำหรับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ดังแสดงในตารางที่ 26

ตารางที่ 26 คุณภาพน้ำที่ใช้ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

ชุดการทดลอง	พีเอช	อุณหภูมิ (°C)	ความเค็ม (ppt)	NO ₂ ⁻ (mg/l)	NO ₃ ⁻ (mg/l)	DO (mg/l)	TDS (mg/l)
Control	8.67-9.01	26-29	10-12	0.08-1.89	0.108-0.240	8.7-10.1	10-12
Live-sprayed	8.79-9.06	26-29	10-12	0.09-1.71	0.109-0.241	8.5-10.2	10-12
Freeze-dried	8.83-9.04	26-29	10-12	0.09-1.86	0.109-0.241	8.3-10.2	10-12

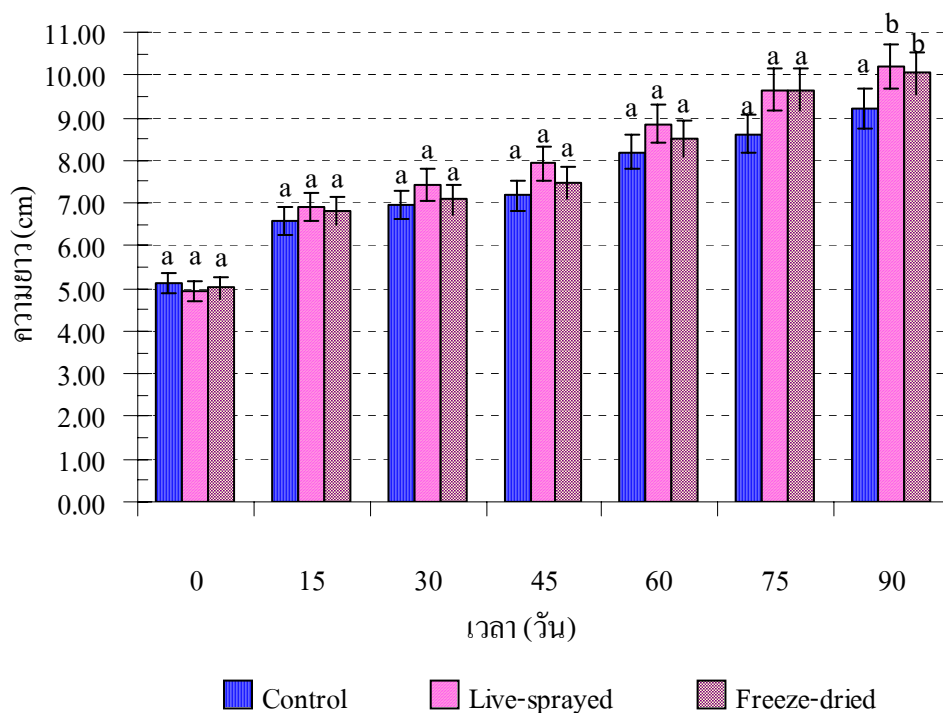
4.3 การเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ

จากการผสมแบบคี่ที่เรียงผสมทั้ง 6 ชนิดลงในอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำ แล้วนำมาเลี้ยงกุ้งกุลาดำเป็นเวลา 90 วัน พบว่ากุ้งกุลาดำกลุ่มที่ได้รับโปรไบโอติกรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์แช่แข็งมีน้ำหนักเฉลี่ยเท่ากับ 8.26 ± 1.09 และ 8.10 ± 0.21 กรัม ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ระหว่างสองกลุ่มการทดลอง แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับกลุ่มควบคุมที่มีน้ำหนักเท่ากับ 6.37 ± 0.11 กรัม ดังภาพที่ 7 สำหรับกุ้งกุลาดำกลุ่มที่ได้รับโปรไบโอติกรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์แช่แข็งมีความยาวเฉลี่ยเท่ากับ 10.20 ± 0.42 และ 10.04 ± 0.15 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ระหว่างกัน แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับกลุ่มควบคุมที่มีค่าเท่ากับ 9.21 ± 0.13 เซนติเมตร ดังแสดงในภาพที่ 8



ภาพที่ 7 น้ำหนักกุ้งกุลาดำตลอดระยะเวลาการทดลอง 90 วัน

หมายเหตุ อักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)



ภาพที่ 8 ความยาวของกึ่งกลาดำตลอดระยะเวลาการทดลอง 90 วัน

หมายเหตุ อักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

กึ่งกลาดำกลุ่มที่ได้รับโปรไบโอติกรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์แช่แข็งมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (SGR) เท่ากับ 2.43 ± 0.13 และ 2.25 ± 0.03 ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ระหว่างสองกลุ่มการทดลองนี้ แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับกลุ่มควบคุมที่มีค่าเท่ากับ 1.94 ± 0.01 ดังนั้นอาหารกึ่งกลาดำที่เติมโปรไบโอติกสามารถทำให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของกึ่งกลาดำมีค่าสูงขึ้นตลอดระยะเวลาการทดลอง 90 วัน นอกจากนี้กึ่งกลาดำกลุ่มที่ได้รับโปรไบโอติกรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์แช่แข็งมีเปอร์เซ็นต์น้ำหนักและความยาวที่เพิ่มขึ้นเท่ากับ 797.46 ± 4.32 , 106.48 ± 3.26 และ 656.70 ± 4.15 , 100.73 ± 3.19 ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ระหว่างกัน แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับกลุ่มควบคุมที่มีค่าเท่ากับ 473.42 ± 3.16 และ 79.88 ± 2.49 ตามลำดับ

กึ่งกลาดำกลุ่มควบคุมมีน้ำหนักเพิ่มขึ้นรายวัน (ADG) เท่ากับ 0.058 ± 0.001 กรัมต่อวัน ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับกึ่งกลาดำกลุ่มที่ได้รับโปรไบโอติก โดยกึ่งกลาดำกลุ่มที่ได้รับโปรไบโอติกรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์แช่แข็งมีน้ำหนักเพิ่มขึ้นรายวันเท่ากับ $0.081 \pm$

0.001 และ 0.078 ± 0.003 กรัมต่อวัน และไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ระหว่างกัน สำหรับอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (FCR) ของกึ่งกุลาดำกลุ่มควบคุมมีค่าเท่ากับ 2.03 ± 0.04 ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับกึ่งกุลาดำกลุ่มที่ได้รับโปรไบโอติก โดยกึ่งกุลาดำกลุ่มที่ได้รับโปรไบโอติกรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์แช่แข็งมีอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อเท่ากับ 1.74 ± 0.11 และ 1.84 ± 0.04 ตามลำดับ ซึ่งอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงกึ่งกุลาดำควรมีค่าไม่มากกว่า 1.50 ดังนั้นโปรไบโอติกทั้งสองรูปแบบนี้สามารถช่วยลดอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อของกึ่งกุลาดำได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังตารางที่ 27

ตารางที่ 27 การเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ

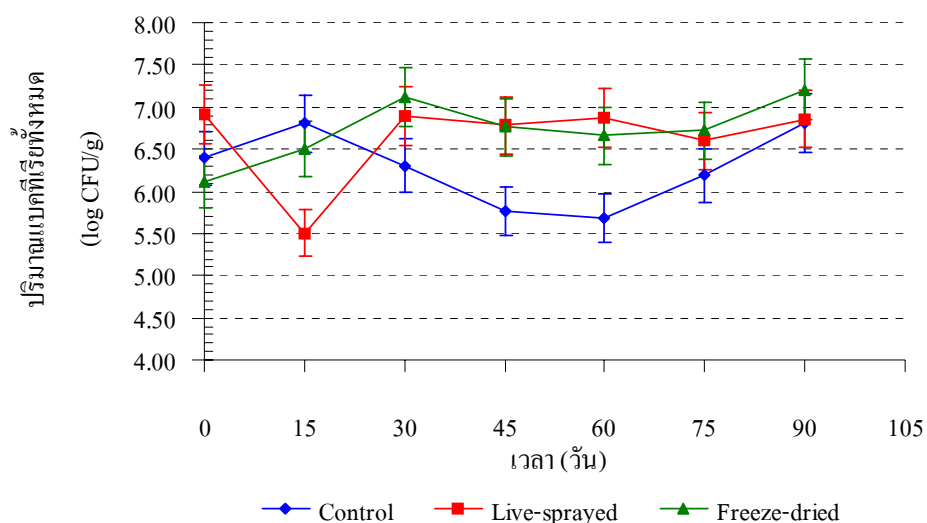
Treatment	Initial weight (g)	Initial length (cm)	Final weight (g)	Final length (g)	% Weight gain	% Length gain	% Specific Growth Rate (SGR)	Average Daily Growth (ADG) g/day	FCR
Control	1.11 ± 0.19^a	5.13 ± 0.32^a	6.37 ± 0.11^b	9.21 ± 0.13^b	473.42 ± 3.16^b	79.88 ± 2.49^b	1.94 ± 0.01^b	0.058 ± 0.001^b	2.03 ± 0.04^b
Live-sprayed	0.92 ± 0.09^a	4.94 ± 0.13^a	8.26 ± 1.09^a	10.20 ± 0.42^a	797.46 ± 4.32^a	106.48 ± 3.26^a	2.43 ± 0.13^a	0.081 ± 0.011^a	1.74 ± 0.11^a
Freeze-dried	1.07 ± 0.11^a	4.99 ± 0.32^a	8.10 ± 0.21^a	10.04 ± 0.15^a	656.70 ± 4.15^a	100.73 ± 3.19^a	2.25 ± 0.03^a	0.078 ± 0.003^a	1.84 ± 0.04^a

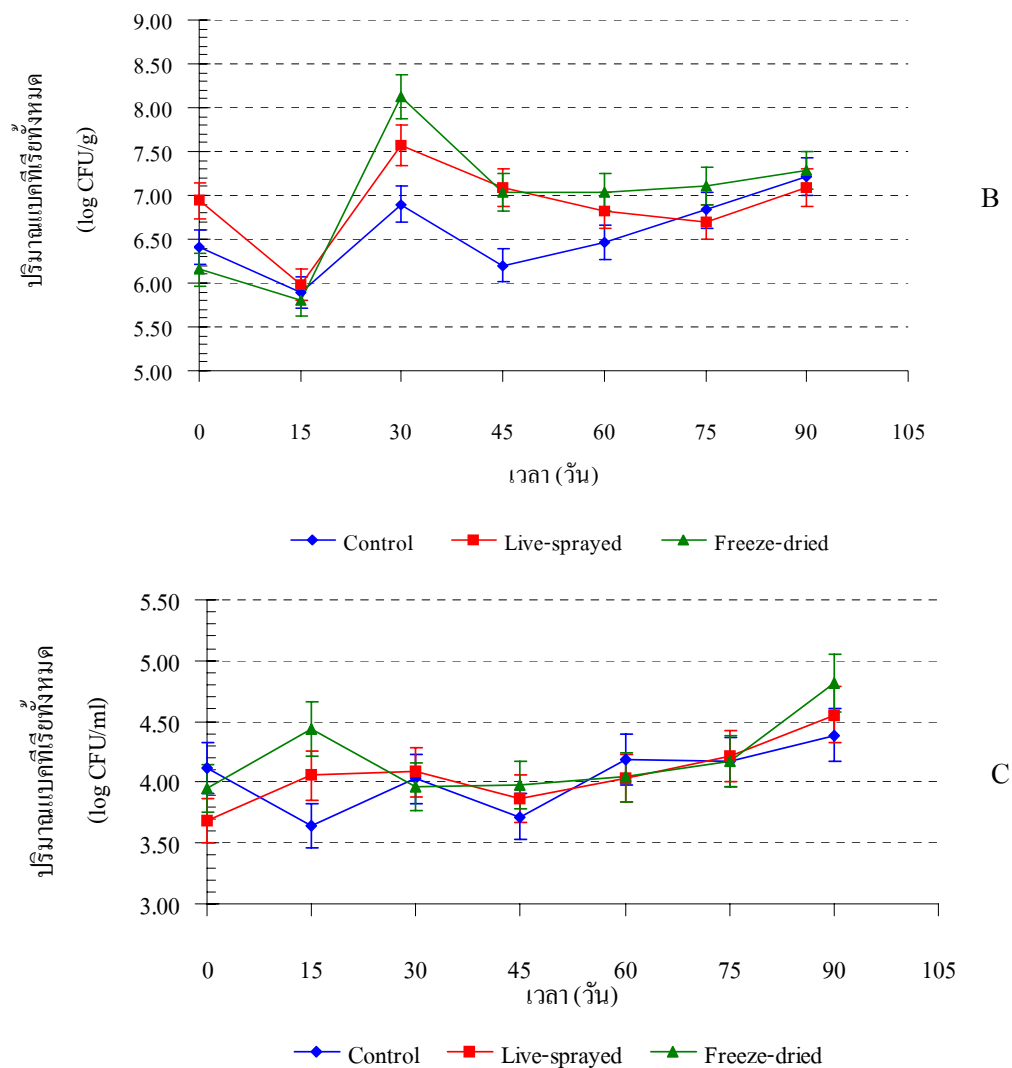
หมายเหตุ อักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันตามแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

4.4 ปริมาณแบคทีเรียของกิ้งกูดดำ

4.4.1 ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด

แบคทีเรียทั้งหมดใน Hepatopancreas ของกิ้งกูดดำของกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับ โปรไบโอติกรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์แช่แข็งมีปริมาณเท่ากับ $6.20 \pm 15.23 - 7.20 \pm 11.10 \times 10^6$, $10.4 \pm 16.20 - 12.30 \pm 23.32 \times 10^6$ และ $8.50 \pm 25.96 - 16.4 \pm 6.30 \times 10^6$ CFU/g ตามลำดับ ตลอดระยะเวลาการทดลองปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดของทุกกลุ่มการทดลองค่อนข้างคงที่ สำหรับแบคทีเรียทั้งหมดในลำไส้กิ้งกูดดำของกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับโปรไบโอติกรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์แช่แข็งมีปริมาณเท่ากับ $5.30 \pm 15.28 - 8.3 \pm 9.36 \times 10^6$, $11.04 \pm 22.02 - 12.30 \pm 17.24 \times 10^6$ และ $8.50 \pm 9.60 - 8.15 \pm 26.39 \times 10^6$ CFU/g ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณลดลงในวันที่ 15 ของการทดลองแล้วเพิ่มขึ้นในวันที่ 30 ของการทดลอง จากนั้นปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดค่อนข้างคงที่ตลอดระยะเวลาการทดลองในทุกชุดการทดลอง และตลอดระยะเวลาการทดลองปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำที่ใช้เลี้ยงกิ้งกูดดำมีปริมาณเปลี่ยนแปลงจากวันเริ่มต้นการทดลองไม่มากนัก โดยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในทุกกลุ่มการทดลอง ซึ่งปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดใน Hepatopancreas ลำไส้และน้ำที่ใช้เลี้ยงกิ้งกูดดำในทุกกลุ่มการทดลองไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ดังภาพที่ 9



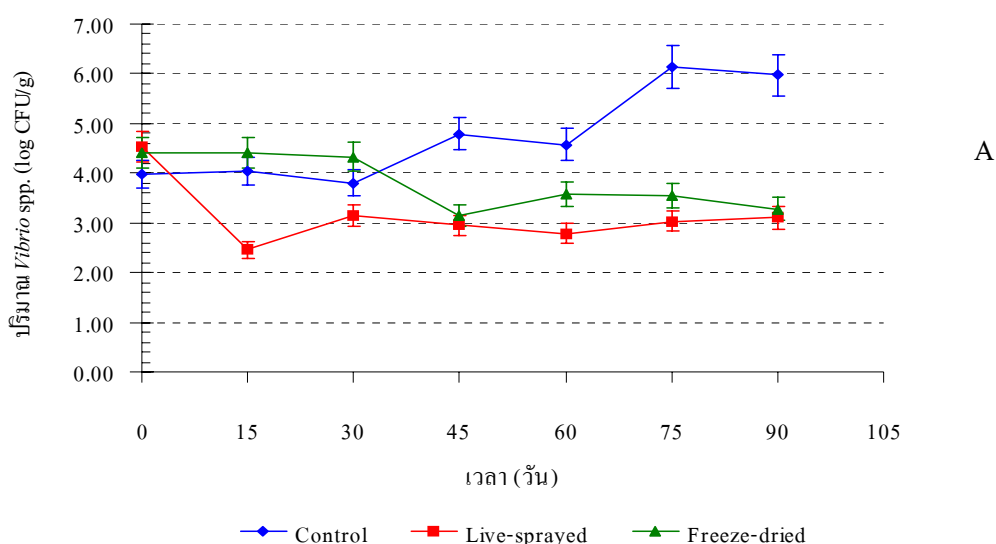


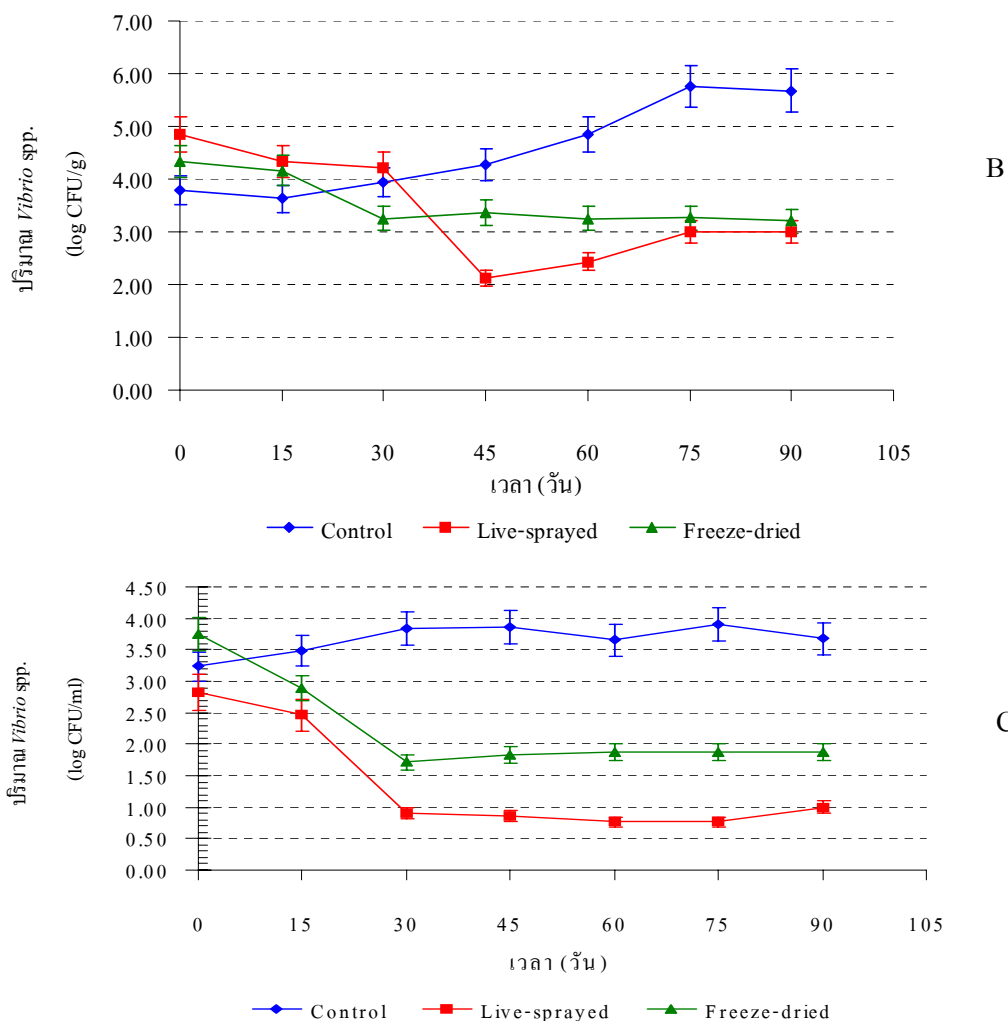
ภาพที่ 9 ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดของกุ้งกุลาดำตลอดระยะเวลาการทดลอง 90 วัน
 (A) Hepatopancreas (B) ลำไส้ (Intestine) (C) น้ำที่ใช้เลี้ยง

4.4.2 ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrios*

แบคทีเรียกลุ่ม *Vibrios* ใน Hepatopancreas ของกุ้งกุลาดำของกลุ่มที่ได้รับ โปรไบโอติกรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์แช่แข็งมีปริมาณเท่ากับ $1.30 \pm 3.00 \times 10^3$ – $1.97 \pm 12.28 \times 10^4$ และ $1.40 \pm 3.00 \times 10^3$ – $4.45 \pm 7.50 \times 10^4$ CFU/g ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณลดลงร้อยละ 46.13 และ 34.86 ตามลำดับ จากวันเริ่มต้นการทดลอง โดยกลุ่มที่ได้รับโปรไบโอติกรูปแบบเซลล์มีชีวิตมีปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrios* ลดลงตั้งแต่วันที่ 15 ของการทดลองและคงที่ตลอดการทดลอง ขณะที่กลุ่มที่ได้รับโปรไบโอติกรูปแบบเซลล์แช่แข็งมีปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrios* ตั้งแต่วันที่ 30 ของการทดลองและคงที่ตลอดการทดลองเช่นเดียวกัน ซึ่งปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrios* ที่พบ

ใน Hepatopancreas ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ระหว่างสองกลุ่มการทดลองนี้ แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับกลุ่มควบคุมที่มีค่าเท่ากับ $1.95 \pm 21.20 \times 10^4 - 9.65 \pm 12.50 \times 10^5$ CFU/g ซึ่งมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ขณะที่ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrios* ในลำไส้กุ้งกุลาดำของกลุ่มที่ได้รับโปรไบโอติกในรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์แช่แข็งมีแนวโน้มลดลงเช่นเดียวกับปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrios* ใน Hepatopancreas ของกุ้งกุลาดำ โดยมีปริมาณเท่ากับ $10.5 \pm 3.50 \times 10^3 - 2.84 \pm 36.00 \times 10^5$ และ $1.80 \pm 8.00 \times 10^3 - 9.10 \pm 5.61 \times 10^4$ CFU/g ตามลำดับ โดยมีปริมาณลดลงร้อยละ 62.21 และ 34.89 ตามลำดับ จากวันเริ่มต้นการทดลอง ซึ่งกลุ่มที่ได้รับโปรไบโอติกในรูปแบบเซลล์มีชีวิตมีปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrios* ลดลงตั้งแต่วันที่ 30 ของการทดลอง ขณะที่กลุ่มที่ได้รับโปรไบโอติกในรูปแบบเซลล์แช่แข็งมีปริมาณลดลงตั้งแต่วันที่ 15 ของการทดลองและคงที่ตลอดการทดลอง ส่วนแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrios* ในกลุ่มควบคุมมีปริมาณเท่ากับ $2.18 \pm 14.20 \times 10^4 - 9.85 \pm 2.50 \times 10^5$ เมื่อวิเคราะห์ค่าทางสถิติพบว่าแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrios* ในลำไส้มีความแตกต่างทางสถิติเช่นเดียวกับแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrios* ใน Hepatopancreas ของกุ้งกุลาดำ ขณะที่แบคทีเรียกลุ่ม *Vibrios* ในน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งกุลาดำของกลุ่มที่ได้รับโปรไบโอติกในรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์แช่แข็งมีแนวโน้มลดลงเช่นเดียวกับแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrios* ใน Hepatopancreas และลำไส้ของกุ้งกุลาดำ โดยมีปริมาณเท่ากับ $3.33 \pm 4.71 \times 10^2 - 2.20 \pm 17.66 \times 10^3$ และ $4.66 \pm 3.68 \times 10^2 - 7.36 \pm 35.42 \times 10^3$ CFU/mL ตามลำดับ แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ระหว่างกลุ่มที่ได้รับโปรไบโอติกและกลุ่มควบคุม ดังภาพที่ 10



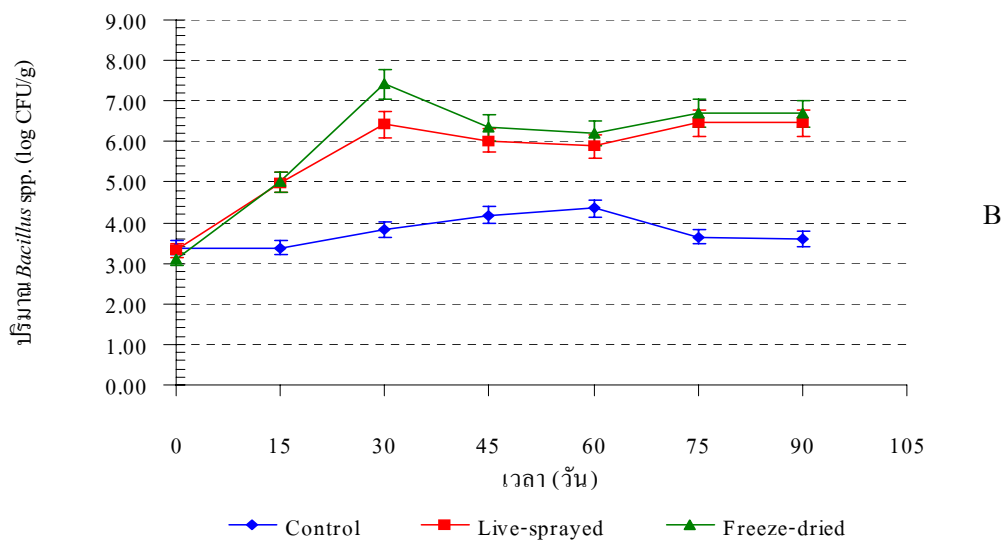
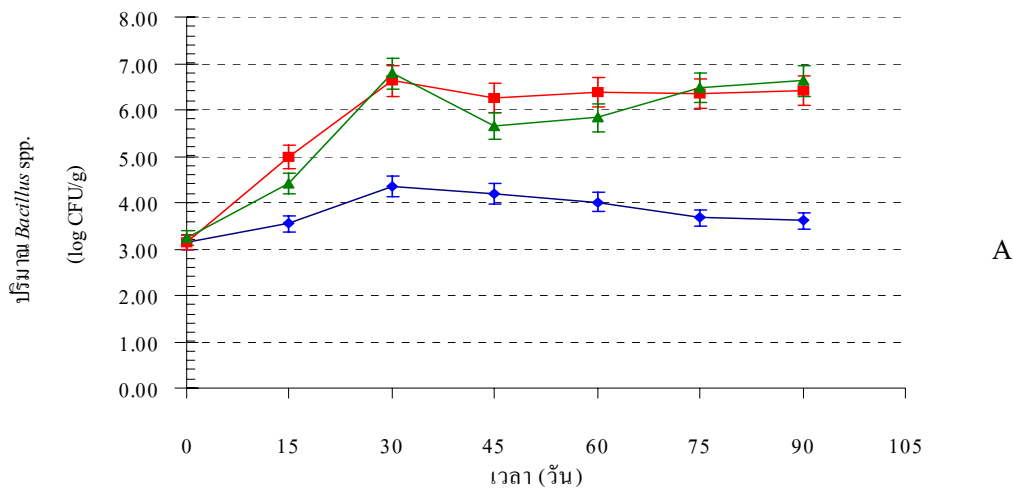


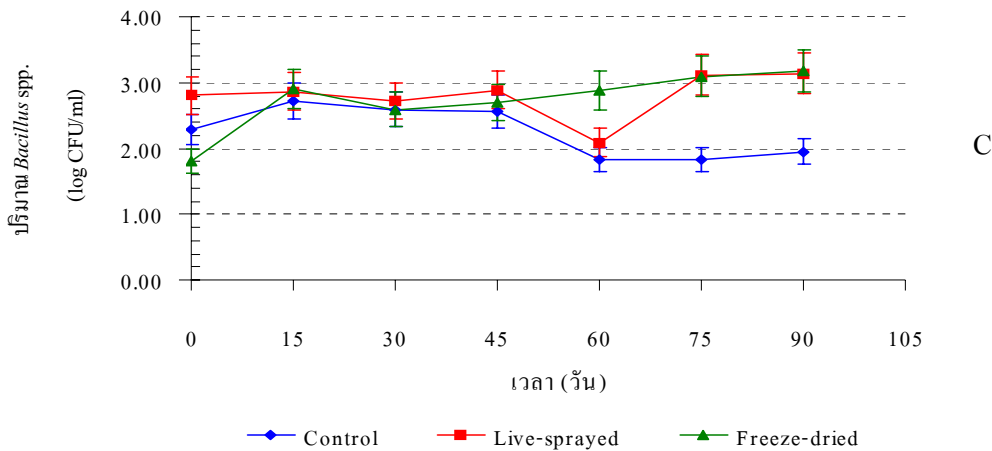
ภาพที่ 10 ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrios* ของกุ้งกุลาดำตลอดระยะเวลาการทดลอง 90 วัน
(A) Hepatopancreas (B) ลำไส้ (Intestine) (C) น้ำที่ใช้เลี้ยง

4.4.3 ปริมาณ *Bacillus* spp.

ปริมาณ *Bacillus* ใน Hepatopancreas ของกุ้งกุลาดำของกลุ่มที่ได้รับโปรไบโอติกในรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์แช่แข็งมีค่าเท่ากับ $1.53 \pm 5.44 \times 10^3 - 2.60 \pm 6.00 \times 10^6$ และ $1.90 \pm 6.17 \times 10^3 - 4.70 \pm 22.00 \times 10^6$ CFU/g ตามลำดับ และไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ระหว่างสองกลุ่มการทดลองนี้ แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับกลุ่มควบคุมที่มีค่าเท่ากับ $17.33 \pm 11.26 - 4.10 \pm 1.00 \times 10^3$ CFU/g ขณะที่ปริมาณ *Bacillus* ในลำไส้กุ้งกุลาดำของกลุ่มที่ได้รับโปรไบโอติกในรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์แช่แข็งมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกับปริมาณ *Bacillus* ใน Hepatopancreas ของกุ้งกุลาดำ โดยมีปริมาณเท่ากับ 2.13 ± 5.73

$\times 10^3 - 3.00 \pm 6.00 \times 10^6$ และ $1.60 \pm 11.43 \times 10^3 - 5.00 \pm 14.00 \times 10^6$ CFU/g ตามลำดับ ซึ่ง *Bacillus* ในHepatopancreas และลำไส้ของกุ้งกุลาดำที่ได้รับโพรไบโอติกรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์แช่แข็งมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นตั้งแต่วันที่ 15 ของการทดลอง และสูงสุดในวันที่ 30 ของการทดลองแล้ว ก่อนข้างคงที่จนสิ้นสุดการทดลอง และปริมาณ *Bacillus* ในน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งกุลาดำของกลุ่มที่ได้รับโพรไบโอติกรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์แช่แข็งมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกับปริมาณ *Bacillus* ในHepatopancreas และลำไส้ของกุ้งกุลาดำ โดยมีปริมาณเท่ากับ $7.33 \pm 3.68 \times 10^2 - 1.43 \pm 4.03 \times 10^3$ และ $7.50 \pm 5.50 \times 10^2 - 1.57 \pm 3.85 \times 10^3$ CFU/g ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ค่าทางสถิติพบว่าปริมาณ *Bacillus* ในลำไส้และน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งกุลาดำมีความแตกต่างทางสถิติเช่นเดียวกับปริมาณ *Bacillus* ใน Hepatopancreas ของกุ้งกุลาดำ ดังแสดงในภาพที่ 11

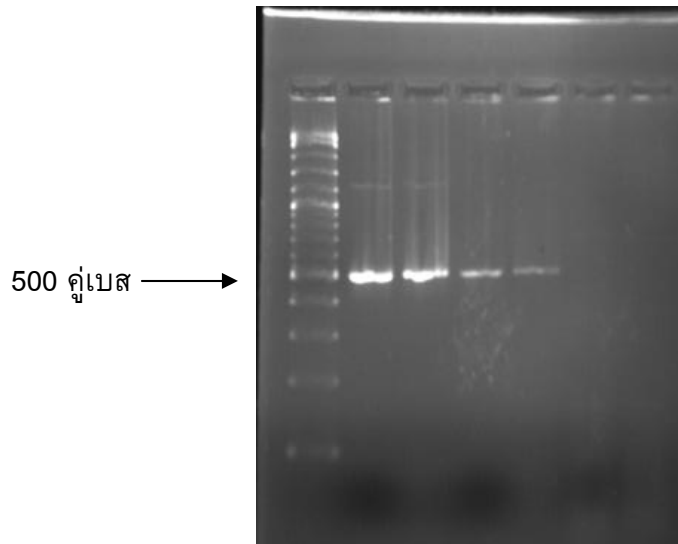




ภาพที่ 11 ปริมาณ *Bacillus* spp. ของกุ้งกุลาดำตลอดระยะเวลาการทดลอง 90 วัน
(A) Hepatopancreas (B) ลำไส้ (Intestine) (C) น้ำที่ใช้เลี้ยง

5. ยีนที่มีความสามารถในการผลิต Antimicrobial Peptide ของแบคทีเรีย

จากการศึกษาคุณสมบัติของกลุ่มแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติครบทั้ง 4 ประการ ในขั้นตอนต่อไป จะทำการศึกษาคูณสมบัติพิเศษของแบคทีเรียแต่ละชนิด จากการศึกษางานวิจัยที่เกี่ยวข้องพบว่า แบคทีเรียโดยเฉพาะ *B. subtilis* มีความสามารถในการผลิตยาปฏิชีวนะ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการผลิตสาร Antimicrobial Peptide ด้วยการใช้ยีนกลุ่ม Subtilin หรือแบคทีเรียชนิดอื่นที่ผลิตยีนในกลุ่ม Nisin เป็นต้น เพื่อทำให้ทราบถึง Sequence และการทำงานของยีนดังกล่าว ซึ่งจะทำให้สามารถพัฒนาศักยภาพของยีนดังกล่าวและนำมาซึ่งการเพิ่มประสิทธิภาพของกลุ่มแบคทีเรียดังกล่าวได้ในด้านการต้านทานต่อแบคทีเรียก่อโรคต่อไป ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้พบว่า แบคทีเรียทั้ง 6 ชนิดไม่มียีนกลุ่ม Subtilin ซึ่งเป็นยีนที่สามารถผลิต Antimicrobial peptide ซึ่งยีนดังกล่าวมีขนาดประมาณ 170 คู่เบส ดังแสดงในภาพที่ 12-14 และจากการวิเคราะห์ลำดับเบสในสายนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียดังกล่าวไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูลโดยวิธี BLASTN 2.2.10 (Altschul et al., 1997) พบว่าแบคทีเรียดังกล่าวไม่มียีนของ Antimicrobial peptide เช่นเดียวกัน



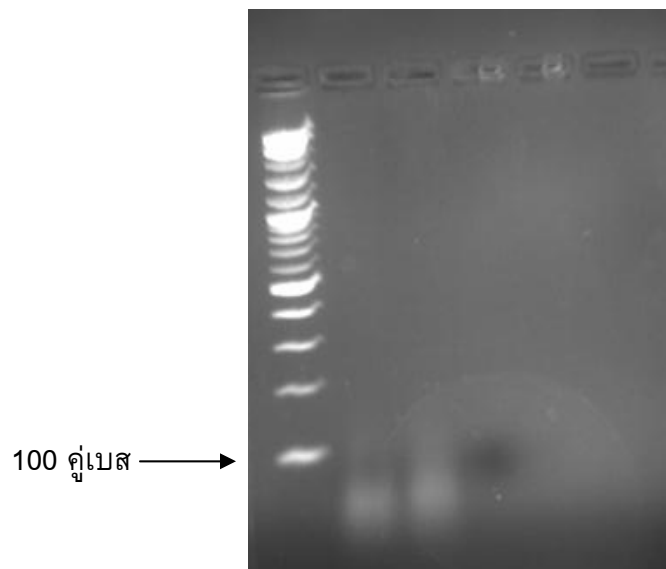
ภาพที่ 12 ลักษณะแบนของ Genomic DNA ของแบคทีเรียโพรไบโอติก

หมายเหตุ ช่องที่ 1 คือ Marker

ช่องที่ 2 และ 3 คือ ตัวอย่าง DNA ของ BUU 001

ช่องที่ 4 และ 5 คือ ตัวอย่าง DNA ของ BUU 002

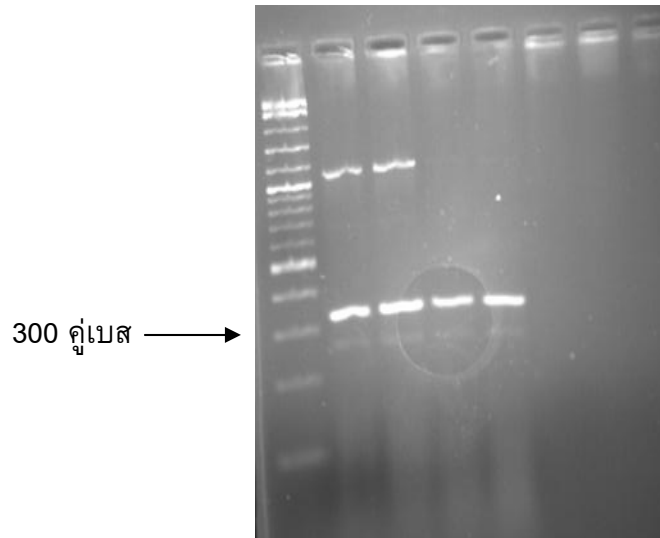
ช่องที่ 5 และ 6 คือ ตัวอย่าง DNA ของ BUU 003



ภาพที่ 13 ลักษณะแบนของ Genomic DNA ของ BUU 004

หมายเหตุ ช่องที่ 1 คือ Marker

ช่องที่ 2 และ 3 คือ ตัวอย่าง DNA ของ BUU 004



ภาพที่ 14 ลักษณะแบนของ Genomic DNA ของ BUU 005

หมายเหตุ ช่องที่ 1 คือ Marker

ช่องที่ 2, 3, 4 และ 5 คือ ตัวอย่าง DNA ของ BUU 005

6. กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส อะไมเลส และไลเปสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียกลุ่มที่มี แนวไหมเป็นโพไบโอติก

จากการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอาหารประเภทโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมัน พบว่าแบคทีเรียทุกไอโซเลทมีความสามารถในการย่อยสลายสารอาหารประเภทดังกล่าว ซึ่งในการทดลองขั้นต่อไปได้ทำการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์แต่ละชนิดที่ทำหน้าที่ย่อยสลายสารอาหารดังกล่าว ได้แก่ เอนไซม์โปรติเอส อะไมเลสและไลเปสของแบคทีเรียแต่ละชนิด แสดงดังตารางที่ 28

ตารางที่ 28 กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส อะไมเลสและไลเปสจากแบคทีเรียที่มีแนวโน้มเป็นโพรไบโอติก

แบคทีเรีย	เอนไซม์โปรติเอส (U/mL) ¹	เอนไซม์อะไมเลส (U/mL) ²	เอนไซม์ไลเปส (U/mL) ³
BUU 001	108.89 ± 2.01 ^{bc}	3.65 ± 0.28 ^b	0.14 ± 0.04 ^a
BUU 002	304.31 ± 4.82 ^e	11.16 ± 1.00 ^d	0.35 ± 0.09 ^c
BUU 003	197.78 ± 4.25 ^d	9.23 ± 0.86 ^c	0.29 ± 0.02 ^b
BUU 004	87.08 ± 3.00 ^b	8.34 ± 0.33 ^c	1.01 ± 0.08 ^d
BUU 005	86.53 ± 4.45 ^b	4.69 ± 0.36 ^{bc}	0.29 ± 0.03 ^b
BUU 006	2.05 ± 0.28 ^a	1.01 ± 0.54 ^a	0.33 ± 0.10 ^{bc}

หมายเหตุ : ¹ 1 หน่วย (U) ของเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายโปรตีนได้เป็นไทโรซีน 1 ไมโครโมล เป็นเวลา 30 นาที ภายใต้สภาวะที่ใช้ทดลอง

² 1 หน่วย (U) ของเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลาย Soluble starch ได้เป็นน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครกรัม เป็นเวลา 30 นาที ภายใต้สภาวะที่ใช้ทดลอง

³ 1 หน่วย (U) ของเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลาย Olive Oil ได้เป็นกรดโอเลอิก 1 ไมโครโมล เป็นเวลา 30 นาที ภายใต้สภาวะที่ใช้ทดลอง

ตัวอักษรเหมือนกันในแนวดิ่งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

($p > 0.05$)

จากตารางที่ 28 พบว่า BUU 002 เป็นแบคทีเรียที่มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสและอะไมเลสสูงที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 304.31 ± 4.82 และ 11.16 ± 1.00 U/mL ตามลำดับ รองลงมา คือ BUU 003 ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสและอะไมเลสเท่ากับ 197.78 ± 4.25 และ 9.23 ± 0.86 U/mL ตามลำดับ และ BUU 004 เป็นแบคทีเรียที่มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุด คือ 1.01 ± 0.08 U/mL

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

สรุปผลการทดลอง

1. จากการตรวจนับปริมาณแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกจำนวน 12 ตัวอย่าง พบว่า ปริมาณแบคทีเรียของผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกส่วนใหญ่มีค่าอยู่ระหว่าง 6.13×10^2 ถึง 1.26×10^8 CFU/g ซึ่งน้อยกว่าปริมาณที่ระบุบนฉลากข้างขวด ยกเว้นผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก Probiotic 11 ที่ผลิตจากประเทศสหรัฐอเมริกาที่มีปริมาณแบคทีเรียเท่ากับ 1.30×10^9 CFU/g ซึ่งใกล้เคียงกับปริมาณที่ระบุบนฉลากข้างขวดที่มีค่าเท่ากับ 10^9 CFU/g เมื่อจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียของผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกส่วนใหญ่ประกอบด้วยแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ที่ตรวจพบทั้งหมด 40 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 68.10 ของปริมาณไอโซเลททั้งหมดที่คัดแยกได้จากผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกทั้ง 12 ตัวอย่าง

2. จากการทดลองศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายแอมโมเนีย ในเทรต ในไทรต์ และฟอสเฟตที่มีการใช้น้ำและดินตะกอนจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ โดยแบคทีเรียผสมทั้ง 6 ชนิด จากการเปรียบเทียบกัน 3 ชุดการทดลอง คือ ชุดทดลองที่มีการเติมแบคทีเรียผสมลงไป ชุดควบคุมแบบไม่ใส่เชื้อและชุดควบคุมแบบฆ่าเชื้อในระยะเวลาการทดลอง 7 วัน พบว่าชุดทดลองที่ได้เติมแบคทีเรียผสมลงไปมีความสามารถในการย่อยสลายในเทรต ในไทรต์และฟอสเฟตได้ดีกว่าชุดควบคุมแบบไม่ใส่เชื้อและชุดควบคุมแบบฆ่าเชื้อ โดยความเข้มข้นของสารดังกล่าวมีเปอร์เซ็นต์การลดลงที่มากกว่า ยกเว้นแอมโมเนียที่เปอร์เซ็นต์การลดลงในชุดทดลองเท่ากับชุดควบคุมแบบไม่ใส่เชื้อ

3. การควบคุมคุณภาพน้ำโดยใช้แบคทีเรียผสมทั้ง 6 ชนิด ภายในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ จำลอง พบว่ากลุ่มแบคทีเรียนี้สามารถย่อยสลายแอมโมเนีย ในเทรต ในไทรต์และฟอสเฟตให้อยู่ในระดับความเข้มข้นที่ไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อกุ้งและมีการสะสมอยู่ในปริมาณต่ำกว่าชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมกลุ่มแบคทีเรียลงไป นอกจากนี้ยังส่งผลเกิดการย่อยสลายสารอินทรีย์ภายในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำจำลอง ทำให้มีการสะสมของอินทรีย์วัตถุในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำจำลองที่มีการเติมกลุ่มแบคทีเรียมีปริมาณที่น้อยกว่าอย่างแตกต่างจากชุดควบคุมเช่นกัน

4. จากการศึกษาศักยภาพของแบคทีเรียผสมในการบำบัดซีเลนเปรียบเทียบกับวิธีการบำบัดของเสียวิธีอื่นในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ พบว่าการตากแดดจะช่วยลดพีเอชของซีเลนลงได้ ขณะที่การตากแดดรวมกับการพลิกเลนจะเพิ่มพีเอชของซีเลน นอกจากนี้การตากแดดรวมกับการพลิกเลนและเติมแบคทีเรียโพรไบโอติกเป็นวิธีการบำบัดซีเลนที่มีประสิทธิภาพ โดยสามารถปรับพีเอชและปริมาณสารอินทรีย์ให้เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ และสามารถย่อยสลายสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ที่เป็นพิษได้ อีกทั้งยังสามารถกำจัดแบคทีเรียก่อโรคกลุ่ม *Vibrios* and *Pseudomonads* ได้เช่นเดียวกัน

5. กุ้งกุลาดำที่ได้รับแบคทีเรียโพรไบโอติกในรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์แช่แข็งมีอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นและอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อลดลง โดยไม่มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มการทดลองทั้งสอง แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) กับกุ้งกุลาดำในกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการเติมแบคทีเรียโพรไบโอติก

6. การเลี้ยงกุ้งกุลาดำด้วยแบคทีเรียโพรไบโอติกในรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์แช่แข็งมีผลต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มต่าง ๆ โดยปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทโทโรโทรปทั้งหมดในกุ้งกุลาดำกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียโพรไบโอติกในรูปแบบเซลล์มีชีวิต เซลล์แช่แข็งและควบคุมมีการเปลี่ยนแปลงของปริมาณแบคทีเรียดังกล่าวใน Hepatopancreas และลำไส้ไม่มากนักและมีปริมาณค่อนข้างคงที่ ดังนั้นแบคทีเรียโพรไบโอติกที่เติมลงไปเพื่อใช้เลี้ยงกุ้งกุลาดำจึงไม่มีผลกระทบต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทโทโรโทรปทั้งหมดหรือแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในระบบทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำ สำหรับผลของแบคทีเรียโพรไบโอติกต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrios* ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคของกุ้งกุลาดำพบว่า ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrios* ใน Hepatopancreas และลำไส้ของกุ้งกุลาดำกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียโพรไบโอติกในรูปแบบเซลล์มีชีวิต เซลล์แช่แข็งมีปริมาณลดลง ขณะที่ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มนี้ใน Hepatopancreas และลำไส้ของกุ้งกุลาดำในกลุ่มควบคุมมีปริมาณเพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียโพรไบโอติกที่เติมในอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำสามารถควบคุมและลดปริมาณแบคทีเรียก่อโรคได้ นอกจากนี้ปริมาณ *Bacillus* ซึ่งเป็นตัวแทนของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่เติมลงในอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำในรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์แช่แข็งมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นสูงสุดภายในระยะเวลา 30 วันและคงที่ตลอดระยะเวลาการทดลองทั้งใน Hepatopancreas และลำไส้ของกุ้งกุลาดำ ซึ่งให้เห็นว่าแบคทีเรียโพรไบโอติกสามารถเพิ่มปริมาณและมีชีวิตอยู่ในระบบทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำได้ ดังนั้นแบคทีเรียโพรไบโอติกผสมที่ใช้ในการทดลองมีสมบัติเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ดี เนื่องจากสามารถลดอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อและปริมาณแบคทีเรียก่อโรค โดยไม่มีผลกระทบต่อแบคทีเรียกลุ่มที่มีประโยชน์ต่อกุ้งกุลาดำ รวมทั้งเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำได้อีกด้วย

7. จากการศึกษาความสามารถในการผลิต Antimicrobial Peptide ของแบคทีเรียที่แยกได้ พบว่าแบคทีเรียทั้ง 6 ชนิดไม่มียีนกลุ่ม Subtilin ซึ่งเป็นยีนที่สามารถผลิต Antimicrobial peptide

8. จากการศึกษากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส อะไมเลสและไลเปสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียกลุ่มที่มีแนวโน้มเป็นโพรไบโอติกจาก พบว่า BUU 002 เป็นแบคทีเรียที่มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสและอะไมเลสสูงที่สุด รองลงมา คือ BUU 003 ขณะที่ BUU 004 เป็นแบคทีเรียที่มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุด

อภิปรายผลการทดลอง

1. คุณสมบัติของผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกที่ผลิตในประเทศและนำเข้าจากต่างประเทศ

การคัดแยกแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกจำนวน 12 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ผลิตในประเทศไทยและจากต่างประเทศ จากการทดลองพบว่าปริมาณแบคทีเรียของผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกส่วนใหญ่มีค่าอยู่ระหว่าง 6.13×10^2 ถึง 1.26×10^8 CFU/g ซึ่งน้อยกว่าปริมาณที่ระบุบนฉลากข้างขวด ยกเว้นผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก Probiotic 11 ที่ผลิตจากประเทศสหรัฐอเมริกาที่มีปริมาณแบคทีเรียเท่ากับ 1.30×10^9 CFU/g ซึ่งใกล้เคียงกับปริมาณที่ระบุบนฉลากข้างขวดที่มีค่าเท่ากับ 10^9 CFU/g ดังนั้นในการใช้โพรไบโอติกนั้นควรต้องทำการทดลองใช้ก่อนถ้าได้ผลดีแล้วค่อยมีการใช้อย่างมากขึ้นเพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงต้นทุนในการเลี้ยงสัตว์น้ำโดยเฉพาะอย่างยิ่งกึ่งกุลาดำหรือกึ่งเศรษฐกิจอื่น ๆ เมื่อนำแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างทั้งหมดมาจำแนกสกุล พบว่าแบคทีเรียที่จำแนกได้มีอยู่ด้วยกันหลากหลายชนิดผสมกันอยู่คือ สกุล *Bacillus* ร่วมกับ *Staphylococcus* และ/หรือ *Micrococcus* และ/หรือ *Corynebacterium* และ/หรือ *Streptococcus*

จากการศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอาหารประเภทโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมันของผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก พบว่าผลิตภัณฑ์หมายเลข 1 - 6 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอาหารทั้ง 3 ชนิด โดยผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกแต่ละชนิดมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไม่แตกต่างกันและพบว่าผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกดังกล่าวประกอบด้วยแบคทีเรียหลายชนิด ไม่ว่าจะเป็น *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus* และ *Corynebacterium* โดย *Bacillus* เป็นแบคทีเรียที่พบมากที่สุด สอดคล้องกับรายงานของวารสารสัตว์น้ำ (ไม่ปรากฏชื่อผู้แต่ง, 2541) ที่กล่าวว่าแบคทีเรียที่พบในผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกได้แก่ *Bacillus*, *Lactobacillus* และ *Enterococcus* เป็นต้น ซึ่งการย่อยสลายสารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรต ไขมันและโปรตีนของผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกเหล่านี้อาจจะสรุปได้ว่า *Bacillus* น่าจะเป็นแบคทีเรียชนิดที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลาย ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Leonel Ochoa-Solano & Olmos-Soto (2006) ที่พบว่าแบคทีเรียสกุล *Bacillus* เป็นแบคทีเรียที่ย่อยสลายสารอาหารเหล่านี้ได้ดีที่สุด ดังนั้นประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอาหารนั้นอาจจะขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรียที่ผสมกันอยู่ จากการทดลองครั้งนี้พบว่าผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกบางผลิตภัณฑ์เท่านั้นที่สามารถย่อยสลายโปรตีน ไขมันและคาร์โบไฮเดรตได้ แสดงให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกบางผลิตภัณฑ์ไม่มีคุณสมบัติที่ดีในการนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ในขณะที่ผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพ (หมายเลข 1 -6) จะมีศักยภาพในการนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เพื่อช่วยย่อยสลายสารอาหารที่สัตว์น้ำกินเข้าไปได้ ซึ่งอาหารสัตว์น้ำส่วนใหญ่จะประกอบด้วยโปรตีน ไขมันและคาร์โบไฮเดรต (เวียง, 2542) อันจะส่งผลให้สัตว์น้ำมีอัตราการเจริญเติบโต การรอดชีวิตและผลผลิตที่สูงขึ้น

2. ประสิทธิภาพในการย่อยสลายแอมโมเนีย ไนเตรต ไนไตรต์และฟอสเฟต โดยแบคทีเรียผสมทั้ง 6 ชนิด ภายในขวดซีรัม

แบคทีเรียที่แยกได้จากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำและลำไส้กุ้งกุลาดำได้แก่ BUU 001, BUU 002, BUU 003, BUU 004, BUU 005 และ BUU 006 จัดอยู่ในกลุ่ม Nitrite oxidizers มีความสามารถในการออกซิไดส์ไนไตรต์ไปเป็นไนเตรตซึ่งเป็นส่วนหนึ่งในปฏิกิริยาไนตริฟิเคชัน ยกเว้น A2 ที่จัดเป็นแบคทีเรียในกลุ่มดีไนตริไฟเออร์ (Denitrifiers; Hargreaves, 1998) ซึ่งมีความสามารถในการรีดิวส์ไนเตรตในปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชันได้ โดยเปอร์เซ็นต์การลดลงของแอมโมเนีย ไนเตรต ไนไตรต์และฟอสเฟตจากการทดลองโดยแบคทีเรียผสมทั้ง 6 ชนิด จะเห็นว่าเปอร์เซ็นต์การลดลงของไนเตรต ไนไตรต์และฟอสเฟตในชุดทดลองจะมากกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ ยกเว้นแอมโมเนียที่เปอร์เซ็นต์การลดลงในชุดทดลองนั้นเท่ากับชุดควบคุมแบบไม่ใส่เชื้อ ซึ่งจากการทดลองนี้อาจจะกล่าวได้ว่าแบคทีเรียผสมทั้ง 6 ชนิด ที่มีการเติมลงไปในชุดทดลองนั้นมีความสามารถในการย่อยสลายไนเตรต ไนไตรต์และฟอสเฟตได้ดีกว่าจุลินทรีย์ที่มีอยู่แล้วในน้ำและดินตะกอนจากบ่อเลี้ยง เนื่องจากแบคทีเรียผสมนั้นมีคุณสมบัติจัดอยู่ทั้งในกลุ่มไนตริไฟเออร์ (Nitrifiers) และดีไนตริไฟเออร์ (Denitrifiers) จึงมีส่วนไปช่วยสนับสนุนการเปลี่ยนแปลงสารประกอบไนโตรเจนในการทดลองนี้ โดยปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันนั้นเริ่มจากการเปลี่ยนแปลงแอมโมเนียไปเป็นไนไตรต์และไนเตรต ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียและไนไตรต์ในชุดการทดลองลดลง แล้วความเข้มข้นไนเตรตคงเหลือสะสมอยู่ แต่ในระดับความเข้มข้นที่ต่ำกว่าชุดควบคุมแบบไม่ใส่เชื้อและชุดควบคุมแบบฆ่าเชื้อ อาจเพราะแบคทีเรียที่เติมลงไปมี A2 โดยเป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ในกลุ่มดีไนตริไฟเออร์ จึงมีผลต่อการลดลงของไนเตรตจากปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชัน (Hargreaves, 1998)

3. ประสิทธิภาพในการย่อยสลายแอมโมเนีย ไนเตรต ไนไตรต์และฟอสเฟต โดยแบคทีเรียผสมทั้ง 6 ชนิด ภายในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำจำลอง

จากการตรวจวัดคุณภาพน้ำตลอดระยะเวลาการทดลองประกอบด้วยอุณหภูมิ ความเค็ม พีเอช ค่าออกซิเจนละลายน้ำและความขุ่น เมื่อเปรียบเทียบกับค่าเริ่มต้นของน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งที่นำมาทดลองนั้น พบว่าความเค็มและพีเอชมีค่าเพิ่มขึ้น โดยความเค็มและอุณหภูมิของชุดควบคุมและชุดทดลองนั้นอยู่ช่วงที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 25 - 33 °C (วิภูษิต มั่นทะจิตร และคณะ, 2534) ค่าพีเอชในชุดควบคุมมีความเป็นด่างสูงกว่าในชุดทดลอง โดยไมตรี ดวงสวัสดิ์ และจารุวรรณ สมศิริ (2528) รายงานว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำควรอยู่ในช่วง 6.5 - 9.0 ซึ่งพีเอชที่ค่อนข้างสูง (8.4 - 9) จะมีผลให้เกิดการแตกตัวของแอมโมเนียเพิ่มขึ้นในขณะที่แอมโมเนีย-ไฮดรอกไซด์ลดลง (สะไบทิพย์ อมรจารุชิต และคณะ, 2543)

แอมโมเนียที่เติมลงในบ่อเลี้ยงกุ้งในวันแรก สัปดาห์ที่ 1 และ 3 ของการทดลองที่ระดับความเข้มข้นสูงขึ้นเช่นเดียวกับไนเตรตและไนไตรต์ ในชุดทดลองที่มีการเติมแบคทีเรียผสมทั้ง

6 ชนิดลงไปจะมีความเข้มข้นลดลงแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างชัดเจนและมีเปอร์เซ็นต์การลดลงที่เพิ่มมากขึ้น อาจเพราะนอกจากแอมโมเนียที่เติมลงไปแล้วยังมีเศษอาหารกุ้ง สิ่งขับถ่าย ซากสิ่งมีชีวิตที่ตายลงอันเป็นแหล่งให้เกิดการสะสมของแอมโมเนียโดยแบคทีเรียทำหน้าที่ย่อยสลายสารอินทรีย์ในโตรเจนผ่านปฏิกิริยาแอมโมนิฟิเคชัน ซึ่งแบคทีเรียที่มีอยู่ในธรรมชาติอาจจะไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอในการลดความเข้มข้นของแอมโมเนียได้ดีเท่ากับในชุดทดลอง ทำให้ในวันสุดท้ายของการทดลองมีแอมโมเนียคงเหลืออยู่ในชุดควบคุมสูงถึง 10.78 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่ชุดทดลองเหลืออยู่เพียง 0.086 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งนี้เนื่องจากการมีปริมาณออกซิเจนที่ค่อนข้างมากประกอบกับแบคทีเรียที่เติมลงไปมีความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาแอมโมนีออกซิเดชัน (Ammonia oxidation) ได้ดี ทำให้แอมโมเนียเปลี่ยนไปเป็นไนไตรต์และไนไตรต์ แล้วสามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงต่อไปเป็นไนเตรตได้ซึ่งเป็นปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันที่สมบูรณ์จึงไม่ทำให้เกิดการสะสมของไนไตรต์ขึ้น อันจะมีผลไปยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันอีกทางหนึ่งได้ (Burrell et al., 1999) แต่ทั้งนี้แพลงก์ตอนพืชในบ่อเลี้ยงก็มียบทบาทในการดูดซึมแอมโมเนีย เพื่อใช้สร้างสารอินทรีย์ในกระบวนการสังเคราะห์แสง (Photosynthesis) ทำให้ความเข้มข้นของแอมโมเนียในทั้ง 2 ชุดการทดลองลดลงอีกทางหนึ่ง (พุทธ ส่องแสงจินดา และคณะ, 2543) แต่จากการทดลองในชุดควบคุมจะมีสีน้ำที่เขียวกว่าในชุดทดลองอาจเพราะมีแพลงก์ตอนพืชมากเมื่อเกิดการสังเคราะห์แสงในเวลากลางวันจะทำให้สีน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งมีค่าพีเอชสูงขึ้นและถ้ามีสีเข้มอยู่เป็นเวลานานจะเกิดการเปลี่ยนแปลงสมดุลของระบบนิเวศอย่างรวดเร็ว เมื่อแพลงก์ตอนพืชจำนวนมากตายลงพร้อม ๆ กันในบ่อเลี้ยงกุ้งทำให้การสังเคราะห์แสงลดลง การดูดซึมแอมโมเนียไปใช้ลดลงและการผลิตออกซิเจนก็จะลดลงด้วย (Platon, 2002) จึงส่งผลให้เกิดการสะสมของแอมโมเนียที่มีความเป็นพิษต่อกุ้งในชุดควบคุมมากขึ้นด้วย

การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายไนเตรตโดยแบคทีเรียผสมทั้ง 6 ชนิด ภายในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำจำลอง จะเห็นว่าในบ่อที่มีการเติมแบคทีเรียผสมลงไปในช่วงสัปดาห์ที่ 4 เปอร์เซ็นต์การลดลงของไนเตรตสูงแตกต่างจากบ่อควบคุมอย่างชัดเจน เมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นไนเตรตเป็น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ความสามารถในการย่อยสลายไนเตรตในชุดควบคุมและชุดทดลองใกล้เคียงกันแต่ในชุดทดลองก็มีเปอร์เซ็นต์การลดลงที่มากกว่าในชุดควบคุม หลังจากที่เราเพิ่มความเข้มข้นของไนเตรตลงไปในสัปดาห์ที่ 3 เป็น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นจะมีการเปลี่ยนแปลงลดลงแล้วเพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อย แต่ความเข้มข้นก็สามารถลดลงได้เป็นอย่างดีจนกระทั่งในวันสุดท้ายของการทดลองมีความเข้มข้นเหลืออยู่เพียง 0.003 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งในบ่อควบคุมยังคงมีไนเตรตสะสมอยู่ถึง 15.33 มิลลิกรัมต่อลิตร แสดงให้เห็นว่ากลุ่มแบคทีเรียที่เติมลงไปมีความสามารถในการเปลี่ยนรูปไนเตรตไปเป็นไนไตรต์ หรือก๊าซไนโตรเจนโดยปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชัน ส่วนความเข้มข้นของไนเตรตที่ลดลงในชุดควบคุมอาจจะเกิดจากการดูดซับกับอนุภาคแขวนลอยหรือตกตะกอนไปสะสมในดิน (Schulz et al., 2001) และแพลงก์ตอนพืชดูดซึมไนเตรตไปใช้เพื่อการเจริญเติบโต แต่ความเข้มข้นที่สะสมก็ยังคงอยู่ในระดับที่เป็นพิษต่อกุ้ง

ประสิทธิภาพการย่อยสลายไนโตรเจนในชุดทดลองภายในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำเกิดได้ดี แม้จะมีการเพิ่มความเข้มข้นขึ้นในสัปดาห์ที่ 2 และ 3 ของการทดลองเป็น 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ กลุ่มแบคทีเรียที่เติมลงไปสามารถทำให้เปอร์เซ็นต์การลดลงของไนโตรเจนเพิ่มขึ้นก็มีความสามารถในการลดความเข้มข้นของไนโตรเจนได้อย่างรวดเร็วจนเหลือความเข้มข้นเพียง 0.001 มิลลิกรัมต่อลิตร เนื่องจากแบคทีเรียผสมที่เติมลงไปมีประสิทธิภาพในการเกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันและดีไนตริฟิเคชันได้อย่างสมบูรณ์ เพราะในสภาวะที่มีออกซิเจนแบคทีเรียอาจจะสามารถเกิดปฏิกิริยาได้ทั้ง Heterotrophic nitrification และ Aerobic denitrification เพื่อเปลี่ยนรูปไนโตรเจนซึ่งเป็นสารตัวกลางระหว่างสองปฏิกิริยานี้ (Matsuzaka et al., 2003) จึงไม่ทำให้เกิดการสะสมของไนโตรเจนขึ้น สำหรับชุดควบคุมมีไนโตรเจนสะสมอยู่ถึง 15.86 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำมาก อาจเพราะค่าพีเอชของชุดควบคุมนั้นอยู่ในระดับที่ค่อนข้างสูงมีผลให้เกิดการแตกตัวของแอมโมเนียมไอออนไปเป็นแอมโมเนียเพิ่มมากขึ้น อีกทั้งแอมโมเนียที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีผลยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันในธรรมชาติ (WHO, 1986) นอกจากนี้การสะสมของไนโตรเจนอาจจะเกิดจากสภาวะไร้ออกซิเจนบริเวณดินตะกอนจึงเกิดปฏิกิริยาไนเตรดรีดักชัน (Nitrate reduction) เป็นสาเหตุให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจากไนเตรตไปเป็นไนโตรเจน ซึ่งในชุดทดลองให้ผลการทดลองที่ตรงกันข้ามกับบทความดังกล่าว เช่นเดียวกับการศึกษาของ Sakai และคณะ (1996) พบว่า *Bacillusadius* I-73 จะมีการเจริญควบคู่ไปกับความสามารถเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นไนโตรเจนให้ไปสะสมอยู่ในรูปของไนเตรต แต่จะถูกยับยั้งการเจริญได้เล็กน้อยถ้าความเข้มข้นของโซเดียมไนไตรต์ (NaNO_2) เป็น 20 มิลลิโมลาร์ (1,380 มิลลิกรัมต่อลิตร)

การเติมแบคทีเรียผสมทั้ง 6 ชนิดลงไปในชุดทดลองนั้น จะเห็นว่าตลอดระยะเวลาการทดลองแบคทีเรียผสมที่เติมลงไปมีประสิทธิภาพในการช่วยลดความเข้มข้นของสารประกอบแอมโมเนีย ไนเตรตและไนโตรเจนได้อย่างมีประสิทธิภาพดีกว่าในชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมแบคทีเรียผสมแม้จะมีการเพิ่มความเข้มข้นของสารดังกล่าว โดยกิจกรรมหลักซึ่งเกิดจากแบคทีเรียในการลดปริมาณสารประกอบไนโตรเจน คือปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันที่ช่วยเปลี่ยนแปลงแอมโมเนียไปเป็นไนเตรต และปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชันที่เปลี่ยนแปลงไนเตรตต่อไปเป็นไนตริกออกไซด์ ไนตรัสออกไซด์หรือก๊าซไนโตรเจน

ตลอดระยะเวลาการทดลองความเข้มข้นของฟอสเฟตในชุดทดลองและชุดควบคุมมีอัตราการลดลงที่ใกล้เคียงกันมาก แสดงว่าแบคทีเรียผสมที่เติมลงไปไม่มีความสามารถในการลดความเข้มข้นของฟอสเฟตได้ดีกว่าแบคทีเรียที่มีอยู่ในธรรมชาติ โดยความเข้มข้นที่ลดลงอาจจะเกิดจากการดูดซึมเอาฟอสเฟตไปใช้โดยแพลงก์ตอนพืชสำหรับการเจริญ เกิดจากปฏิกิริยาทางเคมีและกายภาพโดยการตกตะกอนและการดูดซับกับอนุภาคของดินตะกอนได้ หรือโดยแบคทีเรียที่มีความสามารถในการเปลี่ยนแปลงสารอินทรีย์ฟอสฟอรัสไปเป็นสารอนินทรีย์ฟอสเฟตได้ แล้วแบคทีเรียในแหล่งน้ำนำฟอสเฟตไปใช้ในการสร้างส่วนประกอบของเซลล์ (Intrasungkha et al., 1999) ซึ่งในวันสุดท้ายของการทดลองมีฟอสเฟตสะสมอยู่ในชุด

ทดลองและชุดควบคุมเท่ากับ 1.63 และ 2.23 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งแหล่งน้ำที่มีฟอสเฟตสูงเกิน 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร จัดว่าเป็นแหล่งน้ำที่มีสารอาหารธรรมชาติมากเกินไป อาจจะทำให้เกิดปัญหายูโทรฟิเคชัน (Eutrofication) ได้ (Thakur & Lin, 2003)

4. ความสามารถของแบคทีเรียผสมในการบำบัดซีเลนเปรียบเทียบกับวิธีการบำบัดของเสียวิธีอื่นในบ่อเลี้ยงกุ้งจำลอง

การลดลงของพีเอชในการทดลองรอบที่ 1 และ 2 เกิดจากความแห้งของดินและแสงแดดซึ่งเป็นปัจจัยหลักในการควบคุมการลดลงของพีเอช การตากแดดช่วยให้อากาศผ่านเข้าไปในดินได้มากขึ้นทำให้ดินมีอุณหภูมิเหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชัน โดยแบคทีเรียกลุ่มไนตริไฟเออร์ซึ่งเป็นแบคทีเรียต้องการออกซิเจนในการเจริญ (Avnimelech & Ritvo, 2003) การเกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชันจะทำให้เกิดการปลดปล่อยไฮโดรเจนไอออน (H^+) ลงสู่ดินทำให้ดินมีพีเอชลดลง (Hargreaves, 1998) ซึ่งการทดลองรอบที่ 1 การเพิ่มขึ้นของพีเอชมีความสัมพันธ์กับสภาวะที่มีน้ำท่วมขังซึ่งจะยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาไนตริฟิเคชัน (Charman & Roper, 2000; Avnimelech & Ritvo, 2003) นอกจากนี้ในกรณีที่สะสมอยู่ในดินพื้นบ่อสามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาดีไนตริฟิเคชันทำให้มีพีเอชเพิ่มขึ้นได้ (Charman & Roper, 2000; Fenton & Helyar, 2000) ส่วนการทดลองรอบที่ 2 พบว่าพีเอชลดลงในทุกชุดการทดลองคล้ายกับการทดลองรอบที่ 1 แสดงให้เห็นว่าเกิดจากปฏิกิริยาไนตริฟิเคชัน เมื่อมีการตากแดดร่วมกับพลิกเลน (บ่อที่ 2) และการตากแดดร่วมกับการเติมปูนขาวและพลิกเลน (บ่อที่ 3) พบว่าดินที่ถูกบำบัดจะมีพีเอชเป็นกลางแสดงให้เห็นว่าปูนขาวมีความเหมาะสมในการนำมาใช้ในการบำบัดซีเลนเพื่อให้ซีเลนมีพีเอชลดลง ตามปกติแล้วปูนขาวมีความเหมาะสมในการนำมาใช้ปรับปรุงดินเพื่อให้ดินมีสภาวะเป็นกรดอย่างอ่อน (Golez, 1995) ซึ่งสามารถนำมาปรับพีเอชในดินได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Charman & Roper, 2000)

อินทรีย์วัตถุที่ตรวจวัดในการศึกษานี้หมายถึงชีวมวลซึ่งเป็นอินทรีย์วัตถุที่มีประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยงกุ้ง (Shang et al., 1998) ตามปกติแล้วซีเลนประกอบด้วยสารที่เป็นพิษจำนวนมาก เช่น ไฮโดรเจนซัลไฟด์ ก๊าซแอมโมเนียและแบคทีเรียก่อโรค (Bergheim & Asgard, 1996; Avnimelech & Ritvo, 2003) การเพิ่มขึ้นของอินทรีย์วัตถุในทุกชุดการทดลองระหว่างการทดลองรอบที่ 1 และ 2 แสดงให้เห็นว่าการตากแดดมีผลต่อการย่อยสลายสารอินทรีย์ ซึ่งการตากแดดจะช่วยเพิ่มปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารอินทรีย์ทำให้การย่อยสลายเกิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Arenas & De La LanZa, 1981) Campbell และคณะ (1994) รายงานว่าความชื้นและอุณหภูมิเป็นปัจจัยหลักในการควบคุมการย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ของอินทรีย์วัตถุในวัฏจักรไนโตรเจนและคาร์บอน อุณหภูมิของดินที่ทำการศึกษานี้ครั้งนี้อยู่ระหว่าง 30-36 °C ซึ่งจะทำให้มีการย่อยสลายอินทรีย์วัตถุเพิ่มมากขึ้นสอดคล้องกับรายงานของ Boyd (1995) ที่รายงานว่าอุณหภูมิของดินและบริเวณรอยต่อระหว่างผิวดินกับน้ำมีผลต่อการเกิดกระบวนการทางชีวภาพ กายภาพและเคมีในดิน

จากการศึกษาแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดในซีเลนในการทดลองรอบที่ 1 พบว่ามีปริมาณสูงกว่าการรายงานก่อนหน้านี้เล็กน้อย (Deveraja et al., 2002; Tendencia et al., 2006) โดย Deveraja และคณะ (2002) รายงานว่าแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดในดินพื้นบ่อที่เลี้ยงกุ้งกุลาดำมีปริมาณเท่ากับ 3.75×10^5 CFU/g ขณะที่ Tendencia และคณะ (2006) รายงานว่าแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดในดินพื้นบ่อที่เลี้ยงกุ้งมีปริมาณอยู่ระหว่าง $5.4 - 6.8 \times 10^5$ CFU/g อย่างไรก็ตามพบว่าดินในบ่อเลี้ยงปลาฉลามมีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดสูงกว่านี้มาก ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง $1.2 \pm 3.1 \times 10^6 - 7.3 \pm 1.1 \times 10^7$ CFU/g (Al-Harbi & Uddin, 2005) เมื่อสิ้นสุดการทดลองในระยะที่ 2 พบว่าแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดมีปริมาณลดลง โดยมีปริมาณอยู่ระหว่าง $0.58 \pm 0.07 \times 10^6$ CFU/g แสดงให้เห็นว่าการตากแดดสามารถลดปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดได้ จากรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่าการตากแดดในระหว่างการเพาะเลี้ยงกุ้งสามารถลดการสะสมของแบคทีเรียก่อโรคก่อนการเพาะเลี้ยงครั้งต่อไปได้ และยังช่วยกำจัดก๊าซพิษ เช่น ไฮโดรเจนซัลไฟด์ แอมโมเนียและมีเทน รวมทั้งทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของเฟอร์ริกซัลไฟด์ (FeS) เพิ่มพีเอชและคาร์ดิออกพอกเทนเซียล นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มการย่อยสลายสารอินทรีย์คาร์บอน อินทรีย์ไนโตรเจนและอินทรีย์ฟอสฟอรัส (Boyd, 1992; De Groot & Van Wijck, 1993; Kongkeo, 1997)

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า *Vibrio parahaemolyticus* เป็นแบคทีเรียกลุ่ม Vibrios ที่พบมากในซีเลน ซึ่งปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม Vibrios ในช่วงเริ่มต้นการทดลองในการทดลองรอบที่ 1 มีปริมาณใกล้เคียงกับการรายงานของ Gopal และคณะ (2005) และ Tendencia & dela Pena (2002) สำหรับปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม Pseudomonads ซึ่งเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นที่อาศัยอยู่ในน้ำและมีความสำคัญในสิ่งแวดล้อม (Hongxiang et al., 2008) เนื่องจาก Pseudomonads บางชนิด เช่น *Ps. anguilliseptica* อาจเป็นสาเหตุของการเกิดโรคในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (Costa et al., 1988; Nimrat et al., 2005; Colakoglu et al., 2006; Nimrat & Vuthiphandchai, 2008) ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม Pseudomonads ในช่วงเริ่มต้นการทดลองในรอบที่ 1 มีปริมาณสูงกว่าปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม Pseudomonads ในบ่อเลี้ยงปลาฉลามในประเทศซาอุดีอาระเบีย (Al-Harbi & Uddin, 2005) โดยการบำบัดด้วยการตากแดดร่วมกับการเติมโพโรไบโอติกและการพลิกเลน (บ่อที่ 6) สามารถกำจัดแบคทีเรียกลุ่ม Pseudomonads ได้ดีที่สุด การลดปริมาณอย่างรวดเร็วของแบคทีเรียกลุ่ม Vibrios เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียกลุ่ม Pseudomonads ซึ่งลดลงอย่างช้าๆ แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียกลุ่ม Pseudomonads ทนต่อสภาพความแห้งและแสงแดดได้ดีกว่าแบคทีเรียกลุ่ม Vibrios การบำบัดด้วยการตากแดดร่วมกับการเติมโพโรไบโอติกและการพลิกเลน (บ่อที่ 6) จึงกำจัดแบคทีเรียกลุ่ม Pseudomonads ได้ดีที่สุด ตามปกติแล้วแบคทีเรียกลุ่ม Vibrios และ Pseudomonads เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นที่อาศัยอยู่ในน้ำและพบว่าเป็นสาเหตุหลักที่ก่อให้เกิดโรคในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (Thune et al., 1993; Toranzo & Barja, 1993; Costa et al., 1998; Nimrat et al., 2005; Colakoglu

et al., 2006; Nimrat & Vuthiphandchai, 2008) การตากแดดร่วมกับการเติมโพไบโอติกและการพลิกเลนสามารถลดปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrios* และ *Pseudomonads* ได้ดีกว่าชุดการทดลองอื่น ซึ่งการตากแดดจะช่วยให้อากาศซึมผ่านเข้าไปในดินได้ง่ายขึ้นจึงช่วยเพิ่มอัตราการย่อยสลายสารอินทรีย์และการเปลี่ยนกลุ่มของจุลินทรีย์ (Sonnenholzer & Boyd, 2000) ยกตัวอย่างเช่น กระบวนการเมตาบอลิซึมของ Oxidizing bacteria ในดินจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วหลังจากการตากแดดดินนาน 2-3 ชั่วโมง (Avnimelech & Ritvo, 2003) การหายไปของ *Ps. aeruginosa* หลังจากวันที่ 9 ในการทดลองรอบที่ 2 ของชุดการทดลองที่ทำการบำบัดด้วยการตากแดดร่วมกับการเติมโพไบโอติกและการพลิกเลน (บ่อที่ 6) อาจจะเป็นผลมาจากการพลิกเลนและการใช้โพไบโอติก การพลิกเลนจะช่วยเพิ่มอากาศในดินทำให้มีสภาวะเหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียโพไบโอติก (Avnimelech & Ritvo, 2003) แบคทีเรียโพไบโอติกจะช่วยลดปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrios* และ *Pseudomonads* ด้วยการผลิตสารปฏิชีวนะหรือขับเอนไซม์ออกมานอกเซลล์หรือการแข่งขันยึดเกาะและแย่งสารอาหารกับแบคทีเรียก่อโรค (Moriarty, 1998; Gram et al., 1999; Balcazar & Rojas-Luna, 2007; Balcazar et al., 2007) Boyd (1995) รายงานว่าการใช้โพไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจะช่วยเพิ่มการย่อยสลายสารอินทรีย์ เพิ่มการละลายของออกซิเจนในน้ำและเพิ่มการย่อยสลายของเสีย เช่น ไนโตรเจน แอมโมเนีย คาร์บอนไดออกไซด์ แลคติกแอซิด การบำบัดด้วยการตากแดดร่วมกับการเติมโพไบโอติกและการพลิกเลนจะส่งผลให้สภาพของดินพื้นบ่อดีขึ้นและยังช่วยลดอัตราการเกิดโรคในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

การศึกษาครั้งนี้ได้ใช้ *Bacillus* เป็นแบคทีเรียโพไบโอติก Moriarty (1998) รายงานว่า *Bacillus* เป็นแบคทีเรียที่สามารถควบคุมแบคทีเรียก่อโรคได้ โดย *Bacillus* จะผลิตเอนไซม์ออกมานอกเซลล์ซึ่งสามารถย่อยเมือก (Slime/biofilms) ที่ล้อมรอบเซลล์แบคทีเรียแกรมลบก่อโรคและ *Bacillus* ยังสามารถเจริญได้รวดเร็วกว่าแบคทีเรียก่อโรคทำให้มีประสิทธิภาพในการแข่งขันในการแย่งสารอาหารกับแบคทีเรียก่อโรค นอกจากนี้ *Bacillus* ยังสามารถผลิตสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค Moriarty (1998) แสดงให้เห็นว่า *Bacillus* เป็นแบคทีเรียโพไบโอติกที่สามารถควบคุมแบคทีเรียกลุ่มเรืองแสงในดินตะกอนได้ และ Vaseeharan และคณะ (2004) รายงานว่าบ่อที่บำบัดด้วย *Bacillus* ที่ใช้เป็นโพไบโอติกตรวจพบแบคทีเรียก่อโรค คือ *Vibrio anguillarum* ในปริมาณน้อยกว่าบ่อที่ไม่มีการบำบัดด้วยโพไบโอติก

5. ความสามารถของแบคทีเรียผสมต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณของแบคทีเรียการเจริญเติบโตและคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

การศึกษาน้ำหนักและอัตราการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำในกลุ่มที่ได้รับโพไบโอติกรูปแบบเซลล์มีชีวิตและรูปแบบเซลล์แช่แข็งเป็นระยะเวลา 90 วัน แสดงให้เห็นว่ากุ้งกุลาดำทั้งสองกลุ่มการทดลองมีน้ำหนักและอัตราการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) ระหว่าง

กัน แต่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มควบคุมซึ่งมีอัตราการเจริญเติบโตน้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับโพรไบโอติก สอดคล้องกับการศึกษาของ Ziaei-Nejad และคณะ (2006) รายงานว่าการใช้ *Bacillus* เป็นโพรไบโอติก สามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิต อัตราการเจริญเติบโตและปริมาณผลผลิต รวมทั้งลดอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อและยังช่วยเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส โปรติเอสและอะไมเลส ของกุ้งขาวอินเดียได้อีกด้วย อีกทั้งการศึกษาในครั้งนี้ยังชี้ให้เห็นว่าการนำโพรไบโอติกที่อยู่ในรูปแบบเซลล์แช่แข็งมาใช้เพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำสามารถเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตได้อย่างมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับการใช้เซลล์ที่อยู่ในรูปแบบเซลล์มีชีวิต (Yanbo & Zirong, 2006; Wang, 2007) ทั้งนี้อัตราการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำกลุ่มที่ได้รับโพรไบโอติกที่เพิ่มขึ้นอาจมีสาเหตุมาจากโพรไบโอติกที่เติมลงไปนั้นสามารถสังเคราะห์วิตามิน โคแฟกเตอร์และเอนไซม์ต่าง ๆ เช่น เอนไซม์ไลเปส โปรติเอสและอะไมเลส เป็นต้น (Gullian et al., 2004; Balcazar et al., 2006; Leonel Ochoa-Solano & Olmos-Soto, 2006) ถึงแม้เอนไซม์ที่หลังจากแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ที่เข้าสู่ระบบทางเดินอาหารมีปริมาณไม่มากนัก แต่อาจส่งผลต่อการกระตุ้นให้กุ้งผลิตเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ออกมาย่อยอาหารมากขึ้น ทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยอาหารและการดูดซึมสารอาหารดียิ่งขึ้นส่งผลให้อัตราการเจริญเติบโตสูงขึ้นตามไปด้วย (Ziaei-Nejad et al., 2006; Wang, 2007) นอกจากนี้อัตราการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำที่เพิ่มขึ้นอาจเกิดจากกลไกการทำงานของโพรไบโอติกที่เข้ายึดเกาะบริเวณเยื่อบุแทนที่จุลินทรีย์ที่กีดขวางการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำทำให้กุ้งกุลาดำเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว (Gullian et al., 2004)

จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียกลุ่มเฮทโทโรโทรปทั้งหมดในระบบทางเดินอาหาร (ลำไส้และ Hepatopancreas) ของกุ้งกุลาดำของทุกกลุ่มการมีทั้งแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อนและแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างท่อน อีกทั้งยังพบแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลมแต่พบในปริมาณไม่มากนัก แบคทีเรียหลักที่พบในระบบทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำในกลุ่มควบคุมเป็นแบคทีเรียสกุล *Vibrio* ได้แก่ *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* รวมทั้งยังพบ *Aeromonas hydrophila*, *Shewanella putrefaciens* และ *Photobacterium damsela* อีกด้วย และพบ *Bacillus* spp. ในปริมาณไม่มากนัก สอดคล้องกับการศึกษาของ Sung และคณะ (2003) รายงานว่า *Vibrio*, *Aeromonas* และ *Photobacterium* เป็นแบคทีเรียที่พบได้ในกุ้งและสิ่งแวดล้อมของการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล ขณะที่ระบบทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำในกลุ่มที่ได้รับโพรไบโอติกรูปแบบเซลล์มีชีวิตและรูปแบบเซลล์แช่แข็งพบแบคทีเรียสกุล *Bacillus* เป็นส่วนใหญ่ เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณ *Bacillus* ในช่วงเริ่มต้นการทดลองพบว่าปริมาณ *Bacillus* ที่พบใน Hepatopancreas ของกุ้งกุลาดำเพิ่มขึ้น 103.33% และ 103.69% ตามลำดับ ขณะที่ *Bacillus* ที่พบในลำไส้กุ้งกุลาดำเพิ่มขึ้น 95.47% และ 115.65% ตามลำดับ รวมทั้งยังพบ *Vibrio* spp. ในปริมาณน้อย สอดคล้องกับการรายงานของ Rengpipat และคณะ (1998) ได้ศึกษาผลของ *Bacillus* S11 ต่ออัตราการเจริญเติบโตและอัตราการรอดชีวิตของกุ้งกุลาดำพบว่าระบบทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำมีปริมาณ *Bacillus* เพิ่มขึ้น

และ *Vibrio* มีปริมาณลดลง อีกทั้ง Ziaei-Nejad และคณะ (2006) รายงานว่าการเติม *Bacillus* เป็นโพรไบโอติกในการอนุบาลลูกกุ้งขาวอินเดียสามารถเพิ่มปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดและ *Bacillus* ในระบบทางเดินอาหารของกุ้งได้ สำหรับแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรโทรปทั้งหมดในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำของกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับโพรไบโอติกนั้นพบว่า มีลักษณะเช่นเดียวกับในระบบทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำ แต่พบในปริมาณที่น้อยกว่ามาก เนื่องจากโครงสร้างของทางเดินอาหารมีบริเวณ (Receptor) สำหรับจุลินทรีย์ยึดเกาะ ดังนั้นจุลินทรีย์ที่สามารถแย่งบริเวณยึดเกาะได้ก็จะสามารถดำรงชีวิตอยู่ในระบบทางเดินอาหารได้ (Jiravanichpaisal & Miyazaka, 1994) แต่ในน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งกุลาดำนั้นเป็นน้ำที่มีแร่ธาตุต่าง ๆ ที่เข้มข้นสูง จุลินทรีย์ส่วนใหญ่ไม่สามารถเจริญได้จึงพบจุลินทรีย์ในปริมาณน้อย (บัญญัติ สุขศรีงาม, 2534)

ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrios* ในระบบทางเดินอาหารของกลุ่มควบคุมมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น แต่ในขณะที่เดียวกันปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrios* ในระบบทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำของกลุ่มที่ได้รับโพรไบโอติกมีแนวโน้มลดลง โดยแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrios* ที่พบส่วนใหญ่เป็นกลุ่มที่หมักยอยน้ำตาลซูโครส (โคโลนีสีเหลืองบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar) และกลุ่มไม่หมักยอยน้ำตาลซูโครส (โคโลนีสีเขียว) พบได้น้อยลงเมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเริ่มต้นการทดลอง ซึ่งแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrios* ที่ก่อโรคในกุ้งมักเป็นกลุ่มไม่หมักยอยน้ำตาลเป็นส่วนใหญ่ (Gatesoupe, 1998) ดังนั้นแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrios* กลุ่มนี้จึงต้องเฝ้าระวังเพื่อป้องกันการเกิดโรคในระหว่างการเลี้ยงกุ้ง การลดลงของ *Vibrio* เป็นผลมาจากกลไกการทำลายแบคทีเรียก่อโรคของ *Bacillus* โดยการแข่งขันแย่งสารอาหารและหลั่งเอนไซม์ที่สามารถย่อยเมือก (Slime layer/biofilm) ที่ล้อมรอบเซลล์แบคทีเรียก่อโรคแกรมลบ ทำให้สารปฏิชีวนะที่ *Bacillus* ผลิตขึ้นสามารถเข้าทำลายองค์ประกอบของเซลล์ส่งผลให้แบคทีเรียก่อโรคหยุดการเจริญและถูกทำลายในที่สุด (Moriarty, 1998) เมื่อแบคทีเรียก่อโรคลดลงทำให้ *Bacillus* เพิ่มจำนวนมากขึ้นและยึดเกาะบริเวณเยื่อทางเดินอาหารแทนที่แบคทีเรียก่อโรค โดย Maedo & Liao (1992) รายงานว่าการใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ PM-4 ที่แยกได้จากดินเป็นโพรไบโอติกสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำระยะนอร์เพลียสและยับยั้งการเจริญของ *V. anguillarum* นอกจากนี้ Rengpipat และคณะ (1998) รายงานว่าการใช้ *Bacillus* S11 สามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของกุ้งกุลาดำระยะโพสลาวาที่ถูกบุกรุกด้วยแบคทีเรียเรืองแสงซึ่งเป็นผลมาจากกิจกรรมของสารปฏิชีวนะที่ *Bacillus* ผลิตขึ้น นอกจากนี้ด้วยกลไกการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำยังทำให้แบคทีเรียก่อโรคลดปริมาณลง จากการศึกษพบว่าผนังเซลล์ของ *Bacillus* ที่มีเปปติโดไกลแคน (Peptidoglycan) เป็นองค์ประกอบ รวมทั้งสารเมแทบอลิต์ที่เซลล์ผลิตขึ้นมีสมบัติเป็นตัวกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Rengpipat et al., 2000) ซึ่งจะกระตุ้นกระบวนการจับกิน (Phagocytic activity) ของระบบ Stimulating phagocytic activity ของเซลล์เม็ดเลือดชนิดกรานูลลาร์ของกุ้งกุลาดำ รวมทั้งยังกระตุ้นการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมที่เกิดจากกิจกรรมของเซลล์และสารน้ำ (Cellular and humoral immune defense response) ทำ

ให้ระบบภูมิคุ้มกันของกึ่งกลาดำพร้อมทำงานตลอดเวลา ดังนั้นเมื่อแบคทีเรียก่อโรคบุกรุกเข้าเซลล์ ระบบภูมิคุ้มกันจะทำงานและกำจัดแบคทีเรียก่อโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Ziaei-Nejad et al., 2006) อีกทั้ง Van de Braak และคณะ (2002) ได้ชี้ให้เห็นว่าการใช้โพรไบโอติกช่วยทำให้การหมุนเวียนของเซลล์เม็ดเลือดในระบบเลือดของกึ่งกลาดำเพิ่มมากขึ้น แสดงว่าโพรไบโอติกสามารถกระตุ้นการแบ่งเซลล์ของ Hematopoietic tissue (HPT) ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันทำงานได้ดียิ่งขึ้น

จากการเพาะเลี้ยงกึ่งกลาดำด้วยแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ที่อยู่ในรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์แช่แข็งพบว่า *Bacillus* ในระบบทางเดินอาหารของกึ่งกลาดำทั้งใน Hepatopancreas และลำไส้มีปริมาณเพิ่มขึ้นใกล้เคียงกัน สอดคล้องกับการศึกษาของ Rengpipat และคณะ (2000) ที่รายงานว่ากึ่งกลาดำระยะโพสลาวาที่ได้รับ *Bacillus* S11 มีปริมาณ *Bacillus* ในทางเดินอาหารเท่ากับ 10^6 CFU/g และ Ziaei-Nejad และคณะ (2006) พบว่าทางเดินอาหารของกึ่งขาวอินเดียที่ได้รับโพรไบโอติกมีปริมาณ *Bacillus* ในทางเดินอาหารเพิ่มมากขึ้นและมีปริมาณสูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับโพรไบโอติก ตามปกติแล้วการเติม *Bacillus* เป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกสามารถเพิ่มปริมาณ *Bacillus* ในระบบทางเดินอาหารของกึ่งกลาดำได้ (ไตรมาศ บุญไทย และคณะ, 2550; สุภัณฑิต นิมรัตน์ และคณะ, 2551; Moriarty, 1998; Rengpipat et al., 1998) แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียโพรไบโอติกกลุ่ม *Bacillus* มีความสามารถในการเพิ่มปริมาณในระบบทางเดินอาหารของกึ่งกลาดำ (Rengpipat et al., 1998, 2000; Gullian & Rodriguez, 2002; Ziaei-Nejad et al., 2006) ในขณะที่ระบบทางเดินอาหารของกึ่งกลาดำกลุ่มควบคุมพบ *Bacillus* ในปริมาณไม่มากนัก การพบ *Bacillus* ในทางเดินอาหารของกึ่งกลาดำกลุ่มนี้ในปริมาณน้อยเนื่องจาก *Bacillus* เป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในดินตะกอนและตะกอนน้ำเค็ม ซึ่งกึ่งกลาดำอาจกินตะกอนเหล่านี้เข้าไป (Moriarty, 1998, 1999) รวมทั้ง *Bacillus* ยังเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นที่พบได้ในบริเวณเหงือก ผิวหนังและท่อทางเดินอาหารของกึ่งกลาดำ (Gatesoupe, 1999; Vaseeharan & Ramasamy, 2003) ดังนั้นแบคทีเรียผสมที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้มีสมบัติเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ดี เนื่องจากสามารถลดปริมาณแบคทีเรียก่อโรค โดยไม่มีผลกระทบต่อแบคทีเรียกลุ่มที่มีประโยชน์ต่อกึ่งกลาดำ รวมทั้งสามารถเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของกึ่งกลาดำได้อีก

การใช้โพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงกึ่งกลาดำสามารถเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของกึ่งกลาดำและลดปริมาณแบคทีเรียก่อโรคลกลุ่ม *Vibriosis* และแบคทีเรียแกรมลบชนิดอื่นได้ อาจจะเกิดจากกลไกการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน การแย่งชิงสารอาหาร การสร้างสารปฏิชีวนะ การหลั่งเอนไซม์ วิตามินและโคแฟกเตอร์มาช่วยในระบบการย่อยอาหาร แต่การดำเนินการจะบรรลุผลสำเร็จนั้นขึ้นอยู่กับธรรมชาติของการแข่งขันระหว่างชนิดหรือสายพันธุ์ของแบคทีเรียโพรไบโอติกกับแบคทีเรียก่อโรค ความเข้มข้นของโพรไบโอติก (ต้องมีปริมาณมากพอที่จะสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้) ความเหมาะสมของโพรไบโอติกต่อกึ่งกลาดำ และสภาวะ

แวดล้อมในการเลี้ยงต้องมีความเหมาะสมด้วยเช่นกัน รวมทั้งผู้ดำเนินการต้องมีข้อมูลและเทคนิคในการดำเนินการที่ดี (Moriarty, 1999)

8. ยีนที่มีความสามารถในการผลิต Antimicrobial Peptide ของแบคทีเรีย

จากการศึกษาหาเหินที่มีความสามารถในการผลิต Antimicrobial peptide พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำและลำไส้กุ้งกุลาดำทั้ง 6 ชนิดไม่มีเหินกลุ่ม Subtilin ซึ่งเป็นเหินที่สามารถผลิต Antimicrobial peptide จากการศึกษาก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตสารดังกล่าว โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียสกุล *Bacillus* (Rosovitz et al., 1998; Wu et al., 2005) ยกตัวอย่างเช่น *B. subtilis* เป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะและสารต้านจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น Bacteriocins, Subtilosin A (Stein, 2005) ซึ่ง Subtilosin A เป็น Antimicrobial peptide ที่แยกได้จาก *B. subtilis* 168 สายพันธุ์ Wild strain ในปี ค.ศ. 1985 (Babasaki et al., 1985) *B. cereus* Bc7 สามารถผลิต Cerecin 7 ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกหลายชนิด (Oscariz et al., 1999) นอกจากนี้ *B. thuringiensis* ยังสามารถผลิต Toxinin, Thuringin 7 และ Entomocidin 9 สารทั้งสามชนิดนี้สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้หลายชนิด เช่น *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, and *Pseudomonas aeruginosa* (Paik et al., 1997, Cherif et al., 2001, 2003) หากแบคทีเรียโพรไบโอติกที่แยกได้จากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำและลำไส้กุ้งกุลาดำในการศึกษานี้มีคุณสมบัติในการผลิต Antimicrobial peptide จะทำให้แบคทีเรียโพรไบโอติกมีศักยภาพในการใช้เป็นโพรไบโอติกเพื่อควบคุมแบคทีเรียก่อโรคในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

9. กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส อะไมเลสและไลเปสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียกลุ่มที่มีแนวโน้มเป็นโพรไบโอติก

การใช้ประโยชน์จากโพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีหลายด้านด้วยกัน เช่น การควบคุมแบคทีเรียก่อโรค การปรับปรุงคุณภาพน้ำ การกระตุ้นภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำ รวมถึงความสามารถในการผลิตเอนไซม์เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยอาหารของสัตว์น้ำ (Thompson et al., 1999; Ali, 2000; Verschuere et al., 2000; Kesarcodi-Watson et al., 2008) ซึ่งโดยทั่วไปแล้วอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้งจะประกอบด้วยสารประเภทโปรตีน คาร์โบไฮเดรตและไขมัน ซึ่งอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้งนับเป็นปัจจัยแรกที่มีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของกุ้ง (Irianto & Austin, 2002; Leonel Ochoa-Solano & Olmos-Soto, 2006) จากการศึกษานี้พบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำและลำไส้กุ้งกุลาดำจำนวน 6 ชนิด ซึ่งไม่เป็นแบคทีเรียก่อโรค โดยพบว่าทุกชนิดมีความสามารถย่อยสลายสารทั้ง 3 ประเภท คือ โปรตีน คาร์โบไฮเดรตและไขมัน ซึ่งมีความสอดคล้องกับรายงานที่ผ่านมาที่พบว่าแบคทีเรียสกุล *Bacillus* เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ได้หลากหลาย

ทั้งเอนไซม์โปรติเอส อะไมเลส ไลเปสและเซลลูเลส เป็นต้น (Gupta et al., 2003; Gupta et al., 2004; Saxena et al., 2003) และแบคทีเรียสกุล *Bacillus* เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ออกมานอกเซลล์ (Moriarty, 1996, 1998; Verschueren et al., 2000; Farzanfar, 2006) จากรายงานการวิจัยของ Leonel Ochoa-Solano & Olmos-Soto (2006) ได้ทำการศึกษาแยกแบคทีเรียสกุล *Bacillus* จากดินตะกอนน้ำเค็มเพื่อศึกษาความสามารถในการเจริญและย่อยสลายอาหารในอาหารเลี้ยงเชื้อ จากการศึกษาพบแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ คือ *B. subtilis*, *B. megaterium* และ *B. megaterium* ซึ่ง *Bacillus* ทั้ง 3 สายพันธุ์นี้สามารถเจริญและผลิตเอนไซม์ออกมาย่อยสลายประเภทโปรตีน คาร์โบไฮเดรตและไขมันในอาหารเลี้ยงเชื้อได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้งานวิจัยของ Gupta และคณะ (2003) ได้กล่าวว่าแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* เช่น *B. subtilis*, *B. licheniformis* และ *B. amyloliquefaciens* เป็นต้น เป็นแบคทีเรียมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์และสามารถย่อยสลายสารอาหารได้หลากหลายชนิด (Khyami-Horani, 1999; Hamilton et al., 1999; Gupta et al., 2003) อย่างไรก็ตามยังมีรายงานวิจัยอื่นๆ ที่มีความสอดคล้องกันโดยกล่าวว่าแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ชนิดอื่นๆ ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ต่าง ๆ ออกมาภายนอกเซลล์เพื่อทำหน้าที่ในการย่อยสลายสารอาหาร ได้แก่ *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. pumilus* และ *B. sphaericus* (Jaeger et al., 1999; Sharma et al., 2002; Gupta et al., 2004) ซึ่งสารอาหารเหล่านี้เป็นส่วนประกอบสำคัญในอาหารที่ใช้ในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้ง โดยเฉพาะสารอาหารประเภทโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบที่มีความสำคัญในอาหารกุ้ง เนื่องจากกุ้งจะนำสารอาหารดังกล่าวไปใช้ในการเจริญเติบโต (Kureshy & Davis, 2002) และจากรายงานที่ผ่านมามีพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ผลิตได้จากโพรไบโอติกสามารถส่งเสริมการย่อยสลายสารประเภทโปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมันและเซลลูโลสซึ่งเป็นผลดีต่อการเจริญเติบโตของกุ้ง (Lara-Flores et al., 2003; Tovar-Ramirez et al., 2004; Ziaei-Nejad et al., 2006) ดังนั้นแบคทีเรียที่แยกได้ที่น่ามาใช้ในการศึกษาครั้งนี้จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำไปใช้เป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลเพื่อเป็นการเสริมสร้างประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอาหารและเพิ่มการดูดซึมสารอาหารส่งผลให้กุ้งมีอัตราการรอดและการเจริญเติบโตที่ดีขึ้น (Leonel Ochoa-Solano & Olmos-Soto, 2006)

เอกสารอ้างอิง

- กองเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง. (2534). คู่มือการเลี้ยงกุ้งทะเล. วันที่ค้นข้อมูล 13 ตุลาคม 2546, เข้าถึงได้จาก <http://www.fisheries.go.th/it-network/knowledge/giant%20tiger%20shrimp%20talay/giant%20%20tiger%20shrimp%20talay.html>.
- คเชนทร เณลิมวัฒน์. (2544). การเพาะเลี้ยงพืชและสัตว์น้ำ. ภาควิชาวาริชศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.
- ชนินทร์ แสงรุ่งเรือง. (2549). สถานีเพาะเลี้ยงชายฝั่งจังหวัดตราด. เข้าถึงได้จาก <http://www.fisheries.go.th/cs-trat>
- ชลอ ลิ้มสุวรรณ และพรเลิศ จันทร์ราชกุล. (2547). อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย. กรุงเทพฯ: คณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.
- ธนาคารกสิกรไทย. (2535). การเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำนโยบายเศรษฐกิจต้องควบคู่กับการอนุรักษ์สภาพแวดล้อม. เกษตรวันนี้, 11(129): 37-41.
- ไทรมาศ บุญไทย, วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย และสุภัณฑิต นิมรัตน์. (2550). ผลของโพรไบโอติกต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณของ *Vibrio* และปริมาณแบคทีเรียโพรไบโอติกระหว่างการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45 ระหว่างวันที่ 30 มกราคม – 2 กุมภาพันธ์ 2550.
- ดีพร้อม ไชยวงศ์เกียรติ. (2531). ระบบน้ำและของเสียในบ่อกุ้ง. คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- บัญญัติ สุขศรีงาม. (2534). จุลชีววิทยาทั่วไป (พิมพ์ครั้งที่ 3). กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.
- เบญจามินทร์ ทองเปิง. (2543). การเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบยั่งยืน. นนทบุรี: ฐานเกษตรกรรม.
- บุญรัตน์ ประทุมชาติ. (2546). การเพาะเลี้ยงชายฝั่ง. ภาควิชาวาริชศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.
- ประจวบ หล้าอุบล. (2527). กุ้ง. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล, คณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ประจวบ หล้าสกุล. (2531). การเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำในการทำนากุ้งกุลาดำ. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล, คณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ประดิษฐ์ ชมชื่นชอบ และวราภรณ์ หนูดี. (2544). การตรวจติดตามคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบพัฒนาในจังหวัดสุราษฎร์ธานี. ใน เอกสารวิชาการฉบับที่ 29/2544. สุราษฎร์ธานี: ศูนย์พัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งสุราษฎร์ธานี.
- พุทธ ส่องแสงจินดา, ลักขณา ละอองศิริวงศ์ และชัชวาล อินทรมนตรี. (2543). พลัทธิของสารประกอบไนโตรเจนที่ผิวสัมผัสของน้ำ-ตะกอนดินในบ่อเลี้ยงกุ้งทะเล. สงขลา: ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลฝั่งอ่าวไทย.

- พุทธ ส่องแสงจินดา, ลักษณะ ละอองศิริวงศ์ และชัชวาล อินทรมตรี. (2545). *ฟลักซ์ของสารประกอบในโตรเจนที่ผิวสัมผัสของน้ำ-ตะกอนดินในบ่อเลี้ยงกุ้งทะเล*. สงขลา: ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลฝั่งอ่าวไทย.
- พุทธ ส่องแสงจินดา และสำรอง อินเอก. (2546). *การเปลี่ยนแปลงสารประกอบในโตรเจนในน้ำทะเลจากการทดลองย่อยสลายอาหารกุ้ง*. สงขลา: สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง.
- ภวัต สังขะวัณณะ. (2544). *การพัฒนาผลิตภัณฑ์นมหมักคล้ายโยเกิร์ตโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์โพรไบโอติก*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต, สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ทัศนีย์ อัดตะนันท์ และจรงค์ จันท์เจริญสุข. (2524). *แบบฝึกหัดและคู่มือปฏิบัติการการวิเคราะห์ดินและพืช* (พิมพ์ครั้งที่ 7). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- มณจันทร์ เมฆชน และกมลพร มาแสวง. (2543). *ศักยภาพของแบคทีเรียที่มีประโยชน์บางชนิดในการยับยั้งแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ที่ทำให้เกิดโรคเรืองแสงในกุ้ง*. ใน การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38 (หน้า 259-268). สาขาประมงและสาขาวิทยาศาสตร์ 1-4 กุมภาพันธ์ 2543.
- ไมตรี ดวงสวัสดิ์ และจารุวรรณ สมศิริ. (2528). *คุณสมบัติของน้ำและวิธีวิเคราะห์สำหรับการวิจัยทางประมง*. กรุงเทพฯ: ชุมชนสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.
- ไม่ปรากฏชื่อผู้แต่ง. (2541). *โรคกุ้งทะเล*. *วารสารสัตว์น้ำ*, 110: 23-26.
- วิภูษิต มั่นทะจิตร, วรวิทย์ ชีวพร และสมถวิล จิตตวร. (2534). *ปัจจัยทางนิเวศวิทยาที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ, *Penaeus monodon* Fabricius (ปัจจัยทางชีวภาพ)*. ภาควิชาวาริชศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.
- เวียง เชื้อโพธิ์หัก. (2542). *โภชนศาสตร์และการให้อาหารสัตว์น้ำ*. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สนธิ แดงสกุล และลีลา เรืองแป้น. (2541). *ประสิทธิภาพของโพรไบโอติกที่ผลิตจาก *Bacillus* เพื่อการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ*. *วารสารการประมง*, 51(5), 446-456.
- สมเจตน์ จันทวัฒน์, ศุภมาศ พนิชศักดิ์พัฒนา, จรงค์ จันท์เจริญสุข, วิโรจน์ อัมพิทักษ์ และอัญชลี สุทธิปรการ. (2529). *ปฐพีวิทยาเบื้องต้น*. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สรวิศ เผ่าทองสุข. (2546). *ระบบหมุนเวียนน้ำแบบปิดที่มีการบำบัดในเตรทสำหรับบ่อเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ*. วันที่ค้นข้อมูล 8 มกราคม 2548, เข้าถึงได้จาก http://red.biotech.or.th/RDEResultF1.asp?Id_Rde=557.

สละไบทิพย์ อมรจารุชิต, พัชรिता เหมมัน, สิริ ทุกษ์วินาศ และรังสิไชย ทับแก้ว. (2543).

การศึกษาความผันแปรของคุณภาพน้ำและดินในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ในเขตพื้นที่น้ำจืด จังหวัดราชบุรี. ใน เอกสารวิชาการฉบับที่ 10/2543.

กรมประมง: สถาบันวิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล.

สุนิสา สุขสวัสดิ์, วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย และสุภัณฑิต นิมรัตน์. (2549). การกำจัด *Vibrio spp.* และ *Pseudomonas spp.* ในซีโตนด้วยวิธีการบำบัด 4 วิธีที่แตกต่างกัน. การประชุมวิชาการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติครั้งที่ 5 วันที่ 8-10 มีนาคม 2549 กรุงเทพฯ: สมาคมวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย.

สุนิสา สุขสวัสดิ์, วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย และสุภัณฑิต นิมรัตน์. (2550). ผลการบำบัดซีโตนจากการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ 4 วิธี ที่แตกต่างกันต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มที่ใช้ออกซิเจน, แบคทีเรียแกรมลบและ *Vibrio*. การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45 วันที่ 30 มกราคม - 2 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2550

สุนิสา สุขสวัสดิ์, วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย และสุภัณฑิต นิมรัตน์. (2551). การศึกษาผลของการบำบัดซีโตน 4 วิธีต่อปริมาณแบคทีเรียในซีโตนสะสมจากการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46 ระหว่างวันที่ 29 มกราคม - 1 กุมภาพันธ์ 2551.

สุภัณฑิต นิมรัตน์. (2551). การพัฒนาผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกสำหรับการเลี้ยงกุ้งทะเล.

การนำเสนอผลงานวิจัยแห่งชาติ 2551 สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ณ ศูนย์ประชุมบางกอกคอนเวนชันเซ็นเตอร์ เซ็นทรัลเวิลด์, กรุงเทพฯ, วันที่ 12-16 กันยายน 2551.

สุภัณฑิต นิมรัตน์, ไตรมาส บุญไทย และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. (2551). ผลของแบคทีเรียโพรไบโอติกต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณบาซิลลัสและการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ. การประชุมทางวิชาการ “วิจัยบูรพา ครบรอบวันสถาปนา 58 ปี” มหาวิทยาลัยบูรพา จ. ชลบุรี วันที่ 7 กรกฎาคม 2551.

สุภัณฑิต นิมรัตน์, มานพ กาญจนบุรากร, ปิยาภรณ์ สมสมัคร, นเรศ เชื้อสุวรรณ, ปฎิมา ชัยพิริยะศักดิ์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. (2550a). คุณสมบัติของผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกที่จำหน่ายในประเทศไทยและต่างประเทศ. วารสารการประมง, 60(1), 27-34.

สุภัณฑิต นิมรัตน์, รณชัย ทองสนธิ, สุนิสา สุขสวัสดิ์, นเรศ เชื้อสุวรรณ, บุญรัตน์ ประทุมชาติ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. (2550b). การใช้โพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. วารสารการประมง, 60(2), 128-136.

สุภัณฑิต นิมรัตน์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. (2552). การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอย่างยั่งยืน: บทบาทของจุลินทรีย์และการประยุกต์ใช้. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

- สุบัณฑิต นิมรรัตน์, วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย และสาลีณี ผลมัตย์. (2547). การจัดการและการบำบัดน้ำเสียจากการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ เพื่อให้การเลี้ยงกุ้งกุลาดำมีความยั่งยืนและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา (สกอ.) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2547.
- อนันต์ ตันสุตะพานิช. (2537). แนวทางการปฏิบัติการเลี้ยงกุ้งกุลาดำระบบปิดและระบบหมุนเวียนน้ำกลับมาใช้ใหม่. ใน การสัมมนาเรื่องการพัฒนาการเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบยั่งยืน จังหวัดจันทบุรี.
- Adams, C. (1998). Selected factors affecting seafood markets in the United States. *Journal of Food Distribution Research*, 29(1), 8-17.
- Al-Harbi, A.H. & Uddin, N. (2005). Bacterial diversity of tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in brackish water in Saudi Arabia. *Aquaculture*, 250, 566–572.
- Ali, A. (2000). *Probiotics in fish farming: Evaluation of a bacterial mixture*. Ph.D. Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences. Umea, Sweden.
- Allan, G.L. & Maguire, G.E. (1991). Lethal levels of low dissolved oxygen and effects of short term oxygen stress on subsequent growth of juvenile *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 94, 27-37.
- Arenas, V. & De La Lanza, G. (1981). Effect of dried and cracked sediment on the availability of phosphorus in a coastal lagoon. *Estuaries*, 4, 206-212.
- Avnimelech, Y. & Ritvo, G. (2003). Shrimp and fish pond soils: Processes and management. *Aquaculture*, 220, 549–567.
- Babasaki, K., Takao, T., Shimonishi, Y., & Kurahashi, K. (1989). Subtilisin A, a new antibiotic peptide produced by *Bacillus subtilis* 168: isolation, structural analysis, and biogenesis. *J Biochem (Tokyo)*, 98, 585–603.
- Balcazar, J.L. & Rojas-Luna, T. (2007). Inhibitory activity of probiotic *Bacillus subtilis* UTM 126 against *Vibrio* species confers protection against vibriosis in juvenile shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Current Microbiology*, 5, 409–412.
- Balcazar, J.L., Rojas-Luna, T., & Cunningham, D.P. (2006). Effect of the addition of four potential probiotic strains on the survival of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following immersion challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 96, 147–150.
- Bergheim, A. & Asgard, T. (1996). Waste production from aquaculture. In: D.J. Baird, M.C.M. Beveridge, L.A. Kelly & J.F. Muir (Eds.), *Aquaculture and Water Resource Management* (pp. 50-80). Oxford: Blackwell.
- Bernfeld, P. (1955). Amylases, a- and b-. *Methods in Enzymology*, 1, 149-158.

- Bhaskar, N., Sett, T.M., Mondal, S., Joseph, M.A., Raju, C.V., Raghunath, B.S., & Anantha, C.S. (1998). Prevalence of bacteria of public health significance in the cultured shrimp (*Penaeus monodon*). *Food Microbiology*, 15, 511-519.
- Boyd, C.E. (1979). *Water quality in warmwater fish pond*. Alabama: Fisheries and Allied Aquaculture Department, Auburn University.
- Boyd, C.E. (1989). *Water quality management and aeration in shrimp farming*. In Fisheries and Allied Aquaculture Departmental Series vol. 2. Alabama: Agricultural Experiment Station, Auburn University, Alabama.
- Boyd, C. E. (1992). *Shrimp pond bottom soil and sediment management*. In: J. Wyban (Ed.). *Proceedings Special Session on Shrimp Farming* (pp. 166-181). Baton Rouge: World Aquaculture Society.
- Boyd, C.E., Tanner, M.E., Madkour, M. & Masuda, K. (1994). Chemical characteristics of bottom soils from freshwater and brackishwater aquaculture ponds. *Journal of the World Aquaculture Society*, 25, 517–534.
- Boyd, C.E. (1995). *Bottom soil, sediment and pond aquaculture*. Department of Fishery and Allied Aquaculture, Auburn University, Alabama.
- Bratvold, D. & Browdy, C.L. (2001). Effect of sand sediment and vertical surfaces on production, water quality and microbial ecology in an intensive *Litopenaeus vannamei* culture system. *Aquaculture*, 195, 81-94.
- Burford, M.A., Thompson, P.J., McIntosh, R.P., Bauman, R.H. & Pearson, D.C. (2003). Nutrient and microbial dynamics in high-intensity, zero-exchange shrimp ponds in Belize. *Aquaculture*, 219, 393-411.
- Burrell, P., Keller, J. & Blackhall, L.L. (1999). Characterization of the bacterial consortium involved in nitrite oxidation in activated sludge. *Water Science and Technology*, 39(6), 45-52.
- Campbell, C.A., Jame, Y.M., Akinremi, O.O., & Beckie, H. (1994). Evaluating potential nitrogen mineralization for predicting fertilizer nitrogen requirements of long-term field experiments. In: J.L. Havlin & J.S. Jacobson (Eds.). *Soil Testing: Prospects for Improving Nutrient Recommendations* (pp. 81–100). Madison: Soil Science Society of America.
- Chuntapa, B., Powtongsook, S. & Mennasveta, P. (2002). Water quality control using *Spirulina platensis* in shrimp culture tanks. *Aquaculture*, 220, 355-366.

- Charman, P.E.V. & Roper, M.M. (2000). *Soil organic matter*. In: P.E.V. Charman & B.W. Murphy (Eds.). *Soil: Their Properties and Management* (pp. 260–270). Melbourne: Oxford University Press.
- Chen, J.C. & Lin, C.Y. (1992). Effects of ammonia on growth and molting of *Penaeus monodon* juveniles. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 101(3), 449-452.
- Chen, J.C., Liu, P.C. & Lin, Y.T. (1989). Culture of *Penaeus monodon* in an intensified systems in Taiwan. *Aquaculture*, 77, 319-328.
- Cherif, A., Chehimi, S., Limem, F., Hansen, B.M., Hendriksen, N.B., Daffonchio, D. & Boudabous, A. (2003). Detection and characterization of the novel bacteriocin entomocin 9, and safety evaluation of its producer, *Bacillus thuringiensis* ssp. entomocidus HD9. *Journal of Applied Microbiology*, 95, 990–1000.
- Cherif, A., Ouzari, H., Daffonchio, D., Cherif, H., Ben Slama, K., Hassen, A., Jaoua, S., & Boudabbous, A. (2001) Thuricin 7: a novel bacteriocin produced by *Bacillus huringiensis* BMG1.7, a new strain isolated from soil. *Letters in Applied Microbiology*, 32, 243–47.
- Chythanya, R. & Karunasagar, I. (2002). Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by a marine *Pseudomonas* I-2 strain. *Aquaculture*, 208, 1-10.
- Colakoglu, F.A., Sarmasik, A., & Koseoglu, B. (2006). Occurrence of *Vibrio* spp. and *Aeromonas* spp. in shellfish harvested off Dardanelles coast of Turkey. *Food Control*, 17, 648–652.
- Costa, R., Mermoud, I., Koblavi, S., Morlet, B., Haffner, P., Berthe, F., Legromellec, M., & Grimont, P. (1998). Isolation and characterization of bacteria associated with a *Penaeus stylirostris* disease (Syndrome 93) in New Caledonia. *Aquaculture*, 164, 297-309.
- Day, J.W., Hopkinson, C.S. & Corner, W.H. (1982). An analysis of environmental factors regulating community metabolism and fisheries production in a Louisiana estuary. In V.S. Kennedy (Ed.) *Estuarine Comparisons* (pp. 121-164). New York: Academic Press,
- De Groot, C.J. & Van Wijck, C.V. (1993). The impact of desiccation of a freshwater marsh (Garcines Nord, Camargue, France) on sediment–water–vegetation interactions Part 1: The sediment chemistry. *Hydrobiologia*, 252, 83–94.
- Department of Fisheries. (2000). *Statistics of shrimp culture 2000: Publication No. 2-2003*. Fisheries statistics analysis and research group, Ministry of agriculture and cooperatives, Thailand.

- Devaraja, T.N., Yusoff, F.M. & Shariff, M. (2002). Changes in bacterial populations and shrimp production in ponds treated with commercial microbial products. *Aquaculture*, 206, 245–256.
- Direkbusarakom, S., Yoshimizu, M., Ezura, Y., Ruangpan, L. & Danayadol, Y. (1998). *Vibrio* spp. the dominant flora in shrimp hatchery against some fish pathogenic viruses. *Journal of marine biotechnology*, 6, 266–267.
- Farzanfar, A. (2006). The use of probiotics in shrimp aquaculture. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 48, 149-158.
- Fast, A.W. & Boyd, C.E. (1992). Water circulation, aeration and other management practices. In A.W. Fast & L.J. Lester (Eds.) *Marine Shrimp Culture: Principles and Practices* (pp. 457-495). Amsterdam: Elsevier.
- FAO/WHO. (2001). *Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria*. Cordoba, Argentina.
- Fenton, G. & Helyar, K.R. (2000). Soil acidification. In: P.E.V. Charman & B.W. Murphy (Eds.). *Soil: Their Properties and Management* (pp. 223–237). Melbourne: Oxford University Press.
- Gatesoupe, F.J. (1999). The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, 180, 147-165.
- Gilbert, E.J., Drodzd, J.W. & Jones, C.W. (1991). Physiological regulation and optimization of lipase activity in *Pseudomonas aeruginosa* EF2. *Journal of General Microbiology*, 137, 2215-2221.
- Golez, N.V. (1995). Formation of acid sulfate soil and its implications to brackish water ponds. *Aquacultural Engineering*, 14, 297–316.
- Gopal, S., Ottas, K., Kumar, S., Karunasagar, I., Nishibuchi, M. & Karunasagar, I. (2005). The occurrence of *Vibrio* species in tropical shrimp culture environments: Implications for food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 102, 151-159.
- Gopakumar, G. & Kuttyamma, V.J. (1996). Effect of hydrogen sulphide on two species of penaeid prawns *Penaeus indicus* (H. Milne Edwards) and *Metapenaeus dobsoni* (Miers). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 57, 824-828.

- Gram, L., Melchiorson, J., Spanggaard, B., Huber, I. & Nielsen, T.F. (1999). Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 969-973.
- Gross, A., Nemirovski, A., Zilberg, D., Khaimov, A., Brenner, A., Snir, E., Ronen, Z. & Nejdat, A. (2003). Soil nitrifying enrichment as biofilter starters in intensive recirculating saline water aquaculture. *Aquaculture*, 223, 51-62.
- Gullian, M., Thompson, F. & Rodriguez, J. (2004). Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 233, 1-14.
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K. & Chauhan, B. (2003). Microbial α -amylases: A biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, 38, 1599-1616.
- Gupta, R., Gupta, N. & Rath, P. (2004). Bacterial lipases: An overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64, 763-781.
- Hamilton, L.M., Kelly, C.T. & Fogarty, W.M. (1999). Production and properties of the raw starch-digesting α -amylase of *Bacillus* sp. IMD 435. *Process Biochemistry*, 35, 27-31.
- Hargreaves, J.A. (1998). Review: Nitrogen biogeochemistry of aquaculture ponds. *Aquaculture*, 166, 181-212.
- Hongxiang, X., Min, W., Xiaogu, W., Junyi, Y. & Chunsheng, W. (2008). Bacterial diversity in deep-sea sediment from northeastern Pacific Ocean. *Acta Ecologica Sinica*, 28, 479-485.
- Hopkins, J.S., Sandifer, P.A. & Browdy, C.L. (1994). Sludge management in intensive pond culture of shrimp effect of management regime on water quality, sludge characteristics, nitrogen extinction, and shrimp production. *Aquacultural Engineering*, 13, 11-30.
- Hughes, D.A. (1968). Factors controlling emergence of pink shrimp (*Penaeus duorarum*) from the substrate. *Biology Bulletin*, 134, 48-59.
- Intrasungkha, N., Keller, J. & Blackhall, L.L. (1999). Biological nutrient removal efficiency in treatment of saline wastewater. *Water Science and Technology*, 39(6), 183-190.
- Irianto, A. & Auatin, B. (2002). Probiotics in aquaculture. *Journal of Fish Disease*, 25, 633-642.

- Islam, S., Sarker, J., Yamamoto, T., Wahab, A. & Tanaka, M. (2004). Water and sediment quality, partial mass budget and effluent N loading in coastal brackishwater shrimp farms in Bangladesh. *Marine Pollution Bulletin*, 48, 471-485.
- Jaeger, K.E., Dijkstra, B.W. & Reetz, M.T. (1999). Bacterial biocatalysts: Molecular biology, three-dimensional structures and biotechnological applications of lipases. *Annual Review of Microbiology*, 53, 315-351.
- Jiravanichpaisal, P. & Miyazaka, T. (1994). Histopathology, biochemistry and pathogenicity of *Vibrio harveyi* infecting black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Journal of Aquatic Animal Health*, 6, 27-35.
- Jones, A.B., Dennison, W.C. & Preston, N.P. (2001). Integrated treatment of shrimp effluent by sedimentation, oyster filtration and macroalgal absorption: A laboratory scale study. *Aquaculture*, 193, 155-178.
- Kamei, Y., Yoshimizu, M., Ezura, Y. & Kimura, T. (1988). Screening of bacteria with antiviral activity from fresh water salmonid hatcheries. *Microbiology and Immunology*, 32, 67-73.
- Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, J. & Gibson, L. (2008). Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture*, 274, 1-14.
- Khyami-Horani, H. (1996). Thermotolerant strain of *Bacillus licheniformis* producing lipase. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 12, 399-401.
- Kongkeo, H. (1997). Comparison of intensive shrimp farming systems in Indonesia, Philippines, Taiwan and Thailand. *Aquaculture Research*, 28, 789-796.
- Kureshy, N. & Davis, D.A. (2002). Protein requirement for maintenance and maximum weight gain for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 204, 125-143.
- Lilley, D.M. & Stillwell, R.J. (1965). Probiotics: Growth promoting factors produced by micro-organisms. *Science*, 147, 747-748.
- Lara-Flores, M., Olvera-Novoa, M.A., Guzman-Mendez, B.E. & Lopez-Madrid, W. (2003). Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 216, 193-201.
- Leonel Ochoa-Solano, J. & Olmos-Soto, J. (2006). The functional property of *Bacillus* for shrimp feeds. *Food Microbiology*, 23, 519-525.

- Lightner, D.V. & Redman, R.M. (1998). Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*, 164, 201-230.
- Lin, C.K. (1989). Prawn culture in Thailand: What went wrong? *Journal of the World Aquaculture Society*, 20(2), 19-20.
- Lin, C.K. & Nash, G.L. (1996). *Asian shrimp news collected volume 1989-1995*. Bangkok: Asian Shrimp Culture Council.
- Maeda, M. & Liao, I.C. (1992). Effect of bacterial population on the growth of a prawn larva, *Penaeus monodon*. *Bulletin of National Research Institute of Aquaculture*, 21, 25–29.
- Matsuzaka, E., Nobura, N., Nakajima-Kambe, T., Okada, N. & Nakahara, T. (2003). A simple screening procedure for heterotrophic nitrifying bacteria with oxygen-tolerant denitrification activity. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 95(4), 409-411.
- Menasveta, P., Panritdam, T., Sihanonth, P., Powtongsook, S., Chuntapa, B. & Lee, P. (2001). Design and function of a closed, recirculating seawater system with denitrification for the culture of black tiger shrimp broodstock. *Aquaculture Engineering*, 25, 35-49.
- Metchnikoff, E. (1908). *The nature of man: Studies in optimistic philosophy*. London: William Heinemann.
- Moriarty, D.J.M. (1997). The role of microorganisms in aquaculture ponds. *Aquaculture*, 151, 333–349.
- Moriarty DJW (1998) Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture* 164: 351–358.
- Moriarty, D.J.W. (1999). Disease control in shrimp aquaculture with probiotic bacteria. In C.R. Bell, M. Brylinsky & P. Johnson-Green (Eds.). *Microbial Biosystems: New Frontiers Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology*. Halifax: Atlantic Canada Society for Microbial Ecology.
- Muluk, C. & Bailey, C. (1996). Social and environmental impacts of coastal aquaculture in Indonesia. In: C. Baily, S. Jentoft & P. Sinclair (Eds.) *Aquaculture Development* (pp. 193-210). Boulder: Westview Press.
- Nemcova, R., Laukova, A., Gancarcikova, S. & Kastel, R. (1997). In vitro studies of porcine lactobacilli for possible probiotic use. *Berlin Munchen Tierarztl Wschr.*, 110, 413-417.

- Nimrat, S. & Vuthiphandchai, V. (2008). Role of bacteria in the chilled storage and cryopreservation of sperm in aquatic animals: A review. In: S.H. Schwartz (Ed.). *Aquaculture Research Trends* (pp. 149–184). New York: Nova Science Publishers.
- Nimrat, S., Sangnawakij, T. & Vuthiphandchai, V. (2005). Preservation of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) spermatophores by chilled storage. *Journal of the World Aquaculture Society*, 36, 76–86.
- Nimrat, S., Suksawat, S., Maleeweach, P. & Vuthiphandchai, V. (2008). Effect of different shrimp pond bottom soil treatments on the change of physical characteristics and pathogenic bacteria in pond bottom soil. *Aquaculture*, 285, 123-129.
- Nimrat, S., Polmat, S. & Vuthiphandchai, V. (2003). *Utilization of biodegrading microorganisms under aerobic and aerobic denitrifying conditions on the waste treatment in the intensive black tiger shrimp (Penaeus monodon) ponds: Laboratory and simulated ponds*. Poster presentation in Marine Biotechnology Conference, Chiba, Japan, September 21-28.
- Ogilvie, B.G., Rutter, M. & Nedwell, D.B. (1997). Selection by temperature of nitrate - reducing bacteria from estuarine sediment: species composition and competition for nitrate. *FEMS Microbiology Ecology*, 23, 11-22.
- O'Neill, P. (1993). *Environmental chemistry* (2nd ed.). Suffolk: Edmundsbury.
- Oscariz, J.C., Lasa, I., Pisabarro, A.G. (1999). Detection and characterization of cerein 7, a new bacteriocin produced by *Bacillus cereus* with a broad spectrum of activity. *FEMS Microbiology Letters*, 178, 337–341.
- Paik, H.D., Bae, S.S., Park, S.H., & Pan, J.G., (1997). Identification and partial characterization of tochicin, a bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* subsp tochigiensis. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 19, 294–298.
- Panigrahi, A., Kiron, V., Puangkaew, J., Kobayashi, T., Satoh, S. & Sugita, H. (2005). The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 243, 241-254.
- Parker, R.B. (1974). Probiotics: The other half of the antimicrobial story. *Animal Nutrition and Health*, 29, 4–8.

- Platon, R. (2002). *Mangrove friendly shrimp culture technique: Research for Thailand*. Retrieved 8 August, 2003, from <http://www.aquachallenge.org/workshop/material/platon.pdf>.
- Phillips, M.J., Kwein-Lin, C. & Beveridge, M.C.M. (1993). Shrimp culture and the environment - lessons from the world's most rapidly expanding warm water aquaculture sector. In R.S.V. Pullin, H. Rosenthal & J.L. Maclean (Eds.) *Environment and Aquaculture in Developing Countries* (pp. 171–197). ICLARM Conf. Proc., Vol. 31.
- Ritvo, G., Neill, W.H., Lawrence, A.L. & Samocha, T.M. (1997). Turbidity related to shrimp size in tanks with soil substrate. *Aquacultural Engineering*, 16, 221–225.
- Primavera, J.H. (1994). Environmental and socio-economic effects of shrimp farming: The Philippines experience. *INFOFISH International*, 1, 44-49.
- Rengpipat, S., Phianphak, W., Piyatiratitivorakul, S. & Menasaveta, P. (1998). Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. *Aquaculture*, 167, 301–313.
- Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitivorakul, S. & Menasaveta, P. (2000). Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). *Aquaculture*, 191, 271–288.
- Rønnestad, I., Thorsen, A. & Finn, R.N. (1999). Fish larval nutrition: A review of recent advances in the roles of amino acids. *Aquaculture*, 177, 201–216.
- Rulifson, R.A. (1981). Substrate preference of juvenile penaeid shrimps in estuarine habitat. *Contributions in Marine Science*, 24, 35–52.
- Rosas, C., Martinez, E., Gaxiola, G., Brito, R., Sanchez, A. & Soto, L.A. (1999). The effect of dissolved oxygen and salinity on oxygen consumption, ammonia excretion and osmotic pressure of *Penaeus setiferus* (Linnaeus) juveniles. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 234, 41-57.
- Rosenberry, B. (1996). *World Shrimp Farming 1996*. Annual Report of Shrimp News International, San Diego, CA: pp. 68.
- Sakai, K., Ikehata, Y., Ikenaga, Y., Wakayama, M. & Moriguchi, M. (1996). Nitrite oxidation by heterotrophic bacteria under various nutritional and aerobic conditions. *Aquaculture*, 82, 613-617.
- Salminen, S., Ouwehand, A., Benno, Y. & Lee, Y.K. (1999). Probiotics: How should they be defined? *Trends in Food Science & Technology*, 10, 107–110.

- Saxena, R.K., Davidson, W.S., Sheoran, A. & Giri, B. (2003). Purification and characterization of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*. *Process. Biochemical Journal*, 39, 239-247.
- Schroeder, G.L. (1975). Nighttime material balance for oxygen in fish receiving waste. *Bamidgeh*, 27(3), 64-65.
- Schulz, C., Gelbrecht, J. & Rennert, B. (2001). *Nutrient removal from aquaculture effluents in constructed wetlands with free water surface*. Retrieved 11 November, 2002, from http://www.igb-berlin.de/institut/deutsch/2001/Research/Nutrient_removal.pdf
- Scottish Executive Central Research Unit. (2002). *Review and synthesis of the environmental impact of aquaculture*. Edinburgh: The stationery office.
- Sharma, R., Soni, S.K., Vohra, R.M., Gupta, L.K. & Gupta, J.K. (2002). Purification and characterization of a thermostable alkaline lipase from a new thermophilic *Bacillus* sp. RSJ-1. *Process Biochemistry*, 37, 1075-1084.
- Shang, Y.C., Leung, P. & Ling, B.H. (1998). Comparative economics of shrimp farming in Asia. *Aquaculture*, 164, 183–200.
- Skjermo, J. & Vadstein, O. (1999). Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae. *Aquaculture*, 177, 333–343.
- Smith, P.T. (1996). Physical and chemical characteristics of sediments from prawn farms and mangrove habitats on the Clarence River, Australia. *Aquaculture*, 146, 47–83.
- Solbe, J.F. (1979). Studies on the effects of pollution on freshwater fish. In *Biological aspects of freshwater pollution*. Oxford: Pergamon.
- Sonnenholzner, S. & Boyd, C.E. (2000). Chemical and physical properties of shrimp pond bottom soils in Ecuador. *Journal of the World Aquaculture Society*, 31, 358-375.
- Stein, T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: Structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*, 56, 845–857.
- Tendencia, E.A. & dela Peña, L.D. (2002). Level and percentage recovery of resistance to oxytetracycline and oxolinic acid of bacteria from shrimp ponds. *Aquaculture*, 213, 1-13.
- Tendencia, E.A., dela Pena, M.R. & Choresca Jr., C.H., (2006). Effect of shrimp biomass and feeding on the anti-*Vibrio harveyi* activity of *Tilapia* sp. in a simulated shrimp–tilapia polyculture system. *Aquaculture*, 253, 154–162.

- Thakur, D.P. & Lin, C.K. (2003). Water quality and nutrient budget in closed shrimp (*Penaeus monodon*) culture systems. *Aquacultural Engineering*, 27, 159-176.
- Thompson, F.L., Abreu, P.C. & Wasielesky, W. (2002). Importance of biofilm for Water quality and nourishment in intensive shrimp culture. *Aquaculture*, 203, 263-278.
- Thune, R.L., Stanley, L.A. & Cooper, R.K. (1993). Pathogenesis of gram-negative bacterial infections in warmwater fish. *Annual Review of Fish Diseases*, 3, 37-68.
- Toranzo, A.E. & Barja, J.L. (1993). Virulence factors of bacteria pathogenic for coldwater fish. *Annual Review of Fish Diseases*, 3, 5-36.
- Tovar-Ramirez, D., Zambonino, I.J., Cahu, C., Gatesoupe, F.J. & Vazquez-Juarez, R. (2004). Influence of dietary live yeast on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larval development. *Aquaculture*, 234, 415-427.
- Vadstein, O., Oie, G., Olsen, Y., Salvesen, I., Skjermo, J. & Skjak-Braek, G. (1993). A strategy to obtain microbial control during larval development of marine fish. In: H. Reinertsen, L.A. Dahle, L. Jorgensen & K. Tvinnereim (Eds.). *Proceedings of the First International Conference on Fish Farming Technology* (pp. 69-75). Rotterdam: Balkema.
- Van de Braak, K., Botterblom, M.H.A., Liu, W., Taverne, N., Van der Knaap, W.P.W., & Rombout, J.H.W.M. (2002). The role of the haematopoietic tissue in haemocyte production and maturation in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish and Shellfish Immunology*, 12, 253-272.
- Vaseeharan, B. & Ramasamy, P. (2003). Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Letters in Applied Microbiology*, 36, 83-87.
- Venkat, H.K., Sahu, N.P. & Jain, K.K. (2004). Effect of feeding *Lactobacillus*-based probiotics on the gut microflora, growth and survival of postlarvae of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquaculture Research*, 35, 501-507.
- Verschurre, L., Rombaut, G., Sorgeloss, P. & Verstraete, W. (2000). Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4), 655-671.
- Wahab, M. A., Bergheim, A. & Braaten, B. (2003). Water quality and partial mass budget in extensive shrimp ponds in Bangladesh. *Aquaculture*, 218, 413-423.
- Walter, H.E. (1984). *Methods of enzymatic analysis*. Weinheim: Verlag Chemie.

- Wang, Y.B. & Han, J.Z. (2007). The role of probiotic cell wall hydrophobicity in bioremediation of aquaculture. *Aquaculture*, 269, 349–354.
- Williams, A.B. (1958). Substrate as a factor in shrimp distribution. *Limnology and Oceanography*, 3, 283–290.
- World Health Organization [WHO]. (1986). Environmental health criteria 54 Ammonia. Retrieved 11 November, 2003, from <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc54.html>.
- Wu, S., Jia, S., Sun, D., Chen, M., Chen, X., Zhong, J. & Huan, L. (2005). Purification and characterization of two novel antimicrobial peptides subpeptin JM4-A and subpeptin JM4-B produced by *Bacillus subtilis* JM4. *Current Microbiology*, 51, 295-296.
- Yanbo, W. & Zirong, X. (2005). Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. *Animal Feed Science and Technology*, 127, 283–292
- Yu, B.P. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews*, 74, 139-162.
- Ziaei-Nejad, S., Rezaei, M.H., Takami, G.A., Lovett, D.L., Mirvaghefi, A. & Shakouri, M. (2006). The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. *Aquaculture*, 252, 516– 524.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

Nimrat S, Suksawat S, Maleeweach P, Vuthiphandchai V (2008) Effect of different shrimp pond bottom soil treatments on the change of physical characteristics and pathogenic bacteria in pond bottom soil. *Aquaculture* 285: 123-129.

Nimrat S and Vuthiphandchai V (2007) Characteristics of commercial probiotic products for aquaculture of marine shrimp in Thailand. In: *International Conference on Recent trends in biodiversity and biotechnology (RTBB-2007)*, Aurangabad, India, November 15-17, 2007.

Nimrat S and Vuthiphandchai V (2007) The role of probiotic for aquaculture in Thailand. In: *Sustainable Agriculture: Issues and the Way Forward*, December, 6-8, PPL Conference Room, University Putra Malaysia, Selangor, Malaysia.

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- **เชิงพาณิชย์ (มีการนำไปผลิต/ขาย/ก่อให้เกิดรายได้หรือมีการนำไปประยุกต์ใช้โดยภาคธุรกิจ/บุคคลทั่วไป)**

ภายในระยะเวลา 3 ปีที่ทำการเผยแพร่ผลงานทางวิชาการทั้งแบบผลงานตีพิมพ์ภายในประเทศและระดับนานาชาติพบว่าการสอบถามทั้งโดยตรงหรือติดต่อทาง email จากทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศในการขอข้อมูลของผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกและคำแนะนำในการใช้โพรไบโอติก รวมทั้งขอความรู้ที่ได้จากการศึกษาแยกเชื้อในครั้งนี้อย่างมีประสิทธิภาพที่มีความสนใจที่จะใช้ผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก (จากที่คัดแยกและกำลังศึกษาในครั้งนี้อยู่) ที่กำลังดำเนินการอยู่เพราะมีข้อมูลที่น่าเชื่อถือมากกว่าผลิตภัณฑ์อื่นๆ ที่ค่อนข้างมีความเชื่อมั่นไม่มากนัก นอกจากนี้ยังมีการทบทวนในการร่วมมือในการผลิตโพรไบโอติกจากบริษัทเอกชน แต่กำลังอยู่ในการพิจารณาจากหลายด้านรวมทั้งเวลาในการประสานงานดังกล่าว

- **เชิงนโยบาย**

-

- **เชิงสาธารณะ (มีเครือข่ายความร่วมมือ/สร้างกระแสความสนใจในวงกว้าง)**

ดังได้กล่าวมาแล้วในหัวข้อ “เชิงพาณิชย์” รวมทั้งได้มีการประสานงานร่วมกับนักวิชาการระดับชาติในประเทศไต้หวันและประเทศออสเตรเลียที่จะร่วมมือพัฒนาโพรไบโอติกต่อไปให้มีประสิทธิภาพสูงกว่าผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกที่มีจำหน่ายอยู่แล้ว

- **เชิงวิชาการ (มีการพัฒนาการเรียนการสอน/สร้างนักวิจัยใหม่)**

(1) นำผลการวิจัยที่ได้ไปใช้ประกอบการเรียนการสอนและการค้นคว้าวิจัยด้าน

จุลชีววิทยา วาริชศาสตร์ ชีววิทยา วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม วิทยาศาสตร์ชีวภาพและสาขาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำต่อนิสิตทั้งระดับปริญญาตรี ปริญญาโทและปริญญาเอกของมหาวิทยาลัยบูรพา

(2) นำองค์ความรู้จากการศึกษาในครั้งนี้และจากประสบการณ์ที่ผ่านมาเกี่ยวกับโพรไบโอติกสามารถนำมาเรียบเรียงเป็นส่วนหนึ่งของหนังสือ “การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอย่างยั่งยืน: บทบาทของจุลินทรีย์และการประยุกต์ใช้” ที่ได้รับตีพิมพ์ในสำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในปี 2552

(3) ได้พัฒนานักวิจัยใหม่น้อย 2 คนในระดับปริญญาโท สาขาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม

3. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ/หนังสือ

Nimrat S (2007) Characteristics and nutrient removal of six candidate probiotic bacteria in batch and simulated shrimp ponds. การประชุม “นักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีอาวุโส สกว. ครั้งที่ 7” วันที่ 11-13 ตุลาคม 2550 โรงแรมแอมบาสเดอร์ ซิตี้ จอมเทียน พัทยา จ. ชลบุรี.

Nimrat S and Vuthiphandchai V (2007) In vitro assessment of potential probiotic bacteria from aquaculture environments in Thailand. In: International Conference on The Sixth Princess Chulabhorn International Science Congress, November 25-29, 2007, Shangri-La Hotel, Bangkok, Thailand.

Nimrat S and Vuthiphandchai V (2007) Bacterial composition of commercial probiotic products for use in marine shrimp cultivation in Thailand. In: The 7th Annual Meeting of the Science and Technology: Science and Technology for Self Sufficient Economics, November 28-30, 2007, Institute of Science and Technology for Research and Development Mahidol University, Salaya, Nakhonpathom, Thailand.

สุภัณฑิต นิมรัตน์ มานพ กาญจนบุรากร ปิยาภรณ์ สมสมัคร นเรศ เชื้อสุวรรณ ปฏิมาชัยพิริยะศักดิ์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย (2550) คุณสมบัติของผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกที่จำหน่ายในประเทศไทยและต่างประเทศ. วารสารการประมง 60(1): 27-34.

สุนิสา สุขสวัสดิ์ วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย และ สุภัณฑิต นิมรัตน์ (2551) การศึกษาผลของการบำบัดซีโตน 4 วิธีต่อปริมาณแบคทีเรียในซีโตนสะสมจากการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46 ระหว่างวันที่ 29 มกราคม – 1 กุมภาพันธ์ 2551.

สุภัณฑิต นิมรัตน์ ไตรมาศ บุญไทย และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย (2551) ผลของแบคทีเรียโพรไบโอติกต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณบาซิลลัสและการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ. การประชุมทางวิชาการ “วิจัยบูรพา ครบรอบวันสถาปนา 58 ปี” มหาวิทยาลัยบูรพา จ. ชลบุรี วันที่ 7 กรกฎาคม 2551.

สุภัณฑิต นิมรัตน์, สุนิสา สุขสวัสดิ์, พงศ์ศิริ มาลีเวช และ วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย (2551) Organic sludge management in simulated black tiger shrimp ponds: effects of liming and probiotic treatments. การประชุมวิชาการ “นักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว.” โรงแรมฮอลิเดย์อินน์ รีสอร์ท ธีรเจนท์ บีช ชะอำ เพชรบุรี วันที่ 16-18 ตุลาคม 2551.

Nimrat S , Suksawat S and Vuthiphanchai V (2009) Organic sludge treatment and impact in marine shrimp cultivation. International Symposium on Recent Trend in Environmental Pollution and Impact 2009, 4-6 March, Burapha University, Chon Buri, Thailand.

สุภัณฑิต นิมรัตน์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย (2552) การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอย่างยั่งยืน: บทบาทของจุลินทรีย์และการประยุกต์ใช้. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สุภัณฑิต นิมรัตน์, ไตรมาศ บุญไทย และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. (2552). โพรไบโอติก : อดีต ปัจจุบัน และอนาคตของการใช้โพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ.

วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ฉบับพิเศษ (วารสารอยู่ในระหว่างการจัดพิมพ์เผยแพร่).

ภาคผนวก

บทความและเอกสารที่ตีพิมพ์เผยแพร่



Effect of different shrimp pond bottom soil treatments on the change of physical characteristics and pathogenic bacteria in pond bottom soil

Subuntith Nimrat^{a,*}, Sunisa Suksawat^a, Pongsiri Maleeweatch^b, Verapong Vuthiphandchai^b

^a Department of Microbiology, Environmental Science Program, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi 20131, Thailand

^b Department of Aquatic Science, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi 20131, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 April 2008

Received in revised form 22 August 2008

Accepted 24 August 2008

Keywords:

Shrimp pond soil

Organic sludge

Vibrio spp.

Pseudomonas spp.

Total heterotrophic bacteria

ABSTRACT

Various treatments of shrimp pond bottom soil containing organic sludge were examined for the changes in pH, organic matter and removal efficiency of pathogenic bacteria (*Vibrio* and *Pseudomonas*). The experimental period was divided into 3 phases. In the first phase, shrimp pond bottom soil and pond organic sludge were placed in the experimental tanks and subjected to 15 days of five treatments and a control. The treatments included: (1) drying in sunlight and tilling, (2) drying in sunlight and tilling with lime, (3) drying in sunlight and addition of lime, (4) drying in sunlight and addition of probiotics and (5) drying in sunlight and tilling with probiotics. The control consisted only of drying in sunlight. In the first phase, pH of all treated soil and the control decreased significantly ($P < 0.05$) over the experimental period. Organic matter of the treated and control groups increased significantly ($P < 0.05$) from $1.76 \pm 0.05\%$ on day 0 to $4.33 \pm 0.06\%$ on day 15. Total heterotrophic bacteria (THB) declined significantly ($P < 0.05$) only in soil dried in sunlight, tilled with probiotics added (treatment 5). *Vibrio* species were completely eliminated within 6 days in all treatments. *Pseudomonas* counts decreased significantly ($P < 0.05$) over time in all groups. In the second phase, water from a 3-month-old shrimp pond and pond organic sludge from the post-harvested shrimp pond were added above the treated pond bottom soils and left for 10 days in order to simulate the second crop after termination of the first phase. To begin the third phase, water was drained and the pond bottom soils subjected again to the same treatments for a further 15 days. Soil pH declined significantly ($P < 0.05$) in all groups except treatment 2 over the experimental period. A significant increase ($P < 0.05$) in organic matter was observed at the end of the experiment in the third phase, with values of $4.17 \pm 0.13\%$ to $4.64 \pm 0.04\%$. THB declined significantly ($P < 0.05$) in all groups over time. No *Vibrio* were found in any of the experimental tanks. In treatment 5, *Pseudomonas* was absent after day 9 of beginning the experiment in the third phase. In conclusion, drying in sunlight and tilling with probiotics were the best method for removal of *Vibrio* and *Pseudomonas* from shrimp pond bottom soil containing organic sludge.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) production has increased sharply in Thailand since 1972 and in Asia since 1989 (Lin and Nash, 1996). An intensive culture system is most commonly used for black tiger shrimp in Thailand (85%) because it produces higher yields than other systems (Shang et al., 1998). Since intensive shrimp culture requires high input of pelleted feed and other chemicals or drugs, improper management may cause environmental problems including disease, environmental degradation and accumulation of black and glutinous sediment, referred to as organic sludge, in pond bottom soil (Shang et al., 1998; Rosenberry, 1993). Organic sludge comprises uneaten feed, dead plankton, mineral soils, airborne debris, shrimp feces and pathogenic microorganisms (Bergheim and Asgard, 1996).

As a consequence, accumulated black organic sludge in shrimp pond bottom soil is a major environmental concern for shrimp growers and for sustainable development in the shrimp industry (Boyd, 1992; Smith, 1993, 1996; Hopkins et al., 1994). Between shrimp crops, the black organic sludge must be treated in order to remove toxic and undesirable materials in organic sludge and eliminate pathogenic microorganisms.

The commonly used treatment of organic sludge in Thailand is drying and the addition of lime. Drying of pond soil between crops is commonly used and accelerates degradation of pond organic sludge (Boyd and Teichert-Coddington, 1994). Liming neutralizes acidity and facilitates microbial activity (Boyd, 1995). Recently, a promising biotechnology called “bioremediation” or “bacterial augmentation” has received increasing attention because it constitutes an environmental friendly approach to minimize environmental degradation. Bioremediation products are available in a variety of forms and marked under the general term “bioremediation products or probiotics” (Gatesoupe, 1999). It is proposed that application of probiotics to

* Corresponding author. Tel.: +66 38 103120; fax: +66 38 393490.

E-mail address: subunti@buu.ac.th (S. Nimrat).

Table 1

Effect of five treatments and a control on pH change in the first phase experiment

Day	Control	Treatment 1	Treatment 2	Treatment 3	Treatment 4	Treatment 5
0	7.19±0.17 ^{a,2}	7.38±0.06 ^{a,3}	7.41±0.14 ^{a,2}	7.39±0.11 ^{a,2}	7.34±0.06 ^{a,2}	7.28±0.13 ^{a,2}
3	6.77±0.14 ^{a,1}	7.19±0.07 ^{b,2}	7.55±0.11 ^{c,2}	7.44±0.08 ^{bc,2}	7.14±0.08 ^{b,1}	6.68±0.02 ^{a,1}
6	6.69±0.08 ^{a,1}	7.02±0.06 ^{b,2}	7.43±0.05 ^{cd,2}	7.53±0.10 ^{d,2}	7.13±0.11 ^{b,1}	6.62±0.13 ^{a,1}
9	6.74±0.17 ^{ab,1}	7.01±0.09 ^{bc,2}	7.22±0.11 ^{c,1}	7.16±0.08 ^{c,1}	6.92±0.02 ^{bc,1}	6.54±0.14 ^{a,1}
12	6.66±0.21 ^{a,1}	7.13±0.12 ^{b,2}	7.30±0.02 ^{b,1}	7.14±0.09 ^{b,1}	6.99±0.04 ^{b,1}	6.51±0.10 ^{a,1}
15	6.67±0.16 ^{ab,1}	6.62±0.15 ^{ab,1}	7.24±0.07 ^{c,1}	7.08±0.07 ^{c,1}	6.99±0.04 ^{bc,1}	6.46±0.13 ^{a,1}

^{a,b,c}Different superscript letters indicate significant difference ($P<0.05$) in the number of pH in the first phase between five treatments and the control.^{1,2,3}Different superscript numbers indicate significant difference ($P<0.05$) in the number of pH in different time of the first phase.

pond soil can accelerate decomposition of undesirable organics and other waste products (Gatesoupe, 1999; Gross et al., 2003; Wang and Han, 2007) and perhaps even increase ambient levels of oxygen (Boyd, 1995; Sonnenholzner and Boyd, 2000a). Presently, there is limited information on changes of pH and organic matter in the pond bottom soil during treatment between drying only and the other practices, which are the important factors known to influence shrimp production and diseases. There are also limited data on changes in numbers of pathogenic bacteria during treatment of pond soil containing organic sludge, the studies by Boyd and Teichert-Coddington (1994) and Boyd (1995) being notable exceptions.

Bacteria of the genus *Vibrio* are indigenous in marine and estuarine aquatic ecosystems in which shrimp occur naturally or are farmed (Ruangpan and Kitao, 1991). Species in the genus *Vibrio* constitute the major bacterial pathogens in cultivated penaeid shrimp worldwide (Ruangpan and Kitao, 1991; Jiravanichpaisal et al., 1993; Lightner, 1993) although they are generally agreed to be opportunistic pathogens causing disease only when shrimp are stressed. Like *Vibrio* species, *Pseudomonas* species are part of the normal microflora of penaeid shrimp but may also cause disease (Costa et al., 1998). Since *P. monodon* behavior is closely associated with pond bottom soil, characteristics of the pond bottom soil can directly influence shrimp production. Costa et al. (1998) reported that moribund shrimp were always infected with Vibrionaceae and sometimes with a combination of Vibrionaceae and *Pseudomonas* sp. Pathogens in the pond organic sludge have the potential to cause disease outbreak and impaired shrimp production. The presence of pathogenic bacteria generates concerns not only for shrimp health but also that of consumers. Appropriate treatment to degrade pond organic sludge may enhance conditions for the efficient production of healthy shrimp.

The aim of this study was to determine the effect of five treatments compared to a control on counts of *Vibrio* and *Pseudomonas* in the shrimp pond bottom soil containing organic sludge. This study was also measured temporal changes in pH and organic matter after various treatments of pond bottom soil.

2. Materials and methods

2.1. Pond bottom soil and organic sludge

Bottom soil samples from a 3-month-old pond were collected from a brackishwater shrimp farm in Chonburi Province, Thailand. Soil

samples were collected in sterilized plastic bag and immediately transported to the laboratory and analyzed within 12 h. Organic sludge, referred to the soft fluidized, organic-rich residue, was collected from a post-harvested brackishwater shrimp farm in Chonburi Province. The organic sludge was collected in sterilized plastic bags and transported to the laboratory.

2.2. Preparation of probiotic cell suspension

A local probiotic referred to as probiotic A was obtained from Dr. Nimrat Laboratory, Burapha University. Probiotic bacteria in the Probiotic A were isolated and identified. Non pathogenic bacteria were found in Probiotic A and *Bacillus* sp. was the main bacteria in this product. Following the distribution instruction, the probiotic was increased in number by addition of 1 g probiotic to a 500-mL flask containing 200 mL of Trypticase Soy Broth (TSB; Difco, Detroit, MI, USA). The flask was shaken at 200 rpm, and incubated at 30 °C. Cells were harvested by centrifugation after 24 h, prior to suspension in 5 mL of phosphate buffer at an O.D.₅₈₀ of 1.5. The mixture was freshly prepared and adjusted to a final concentration of approximately 10¹⁰ CFU/mL.

2.3. Experimental design

Effect of various treatments of pond bottom soil containing organic sludge was studied in the experimental tanks. Pond bottom soil was added to a depth of 4 cm in fiber glass tanks (0.8×1.2×0.6 m) and overlaid at 6 cm depth with organic sludge to simulate the post-harvested pond bottom soils in shrimp ponds. Eighteen tanks were set up for five treated groups and a control group in triplicate ($N=3$). The experimental period was divided into 3 phases. In the first phase, pond bottom soil and organic sludge were placed in tanks and subjected to 15 days of experiment. The five treatments included: (1) drying with sunlight and tilling, (2) drying with sunlight and tilling with lime, (3) drying with sunlight and addition of lime, (4) drying with sunlight and addition of probiotics and (5) drying with sunlight and tilling with probiotics. The control consisted of drying with sunlight. Soil tilling was performed using a shovel once every 7 days in treatments 1, 2 and 5. Therefore, soil was mixed with organic sludge during the tilling process. In treatments 2 and 3, 60 g of lime was added at the beginning of the experiment. Probiotic at a volume of 50 mL was sprayed on the pond bottom soil containing organic sludge in treatments 4 and 5. Total heterotrophic bacteria (THB) and

Table 2

Effect of five treatments and a control on pH change in the third phase experiment

Day	Control	Treatment 1	Treatment 2	Treatment 3	Treatment 4	Treatment 5
0	7.19±0.15 ^{a,2}	7.06±0.10 ^{a,3}	7.52±0.11 ^{ab,2}	7.52±0.20 ^{ab,2}	7.22±0.05 ^{a,2}	7.25±0.12 ^{a,2}
3	6.66±0.26 ^{a,1}	6.75±0.10 ^{a,2}	7.47±0.07 ^{b,12}	7.26±0.17 ^{b,12}	6.64±0.13 ^{a,12}	6.80±0.13 ^{a,1}
6	6.43±0.07 ^{a,1}	6.66±0.08 ^{b,2}	7.41±0.10 ^{c,12}	7.32±0.06 ^{c,12}	6.48±0.12 ^{a,12}	6.56±0.09 ^{ab,1}
9	6.43±0.08 ^{ab,1}	6.25±0.09 ^{a,1}	7.28±0.10 ^{d,1}	7.04±0.03 ^{c,1}	6.27±0.16 ^{a,1}	6.62±0.17 ^{b,1}
12	6.51±0.08 ^{a,1}	6.16±0.11 ^{a,1}	7.41±0.09 ^{b,12}	7.31±0.15 ^{b,12}	6.69±0.13 ^{a,2}	6.51±0.12 ^{a,1}
15	6.55±0.13 ^{a,1}	6.71±0.09 ^{ab,2}	7.39±0.16 ^{c,12}	7.07±0.05 ^{bc,1}	6.46±0.07 ^{a,1}	6.56±0.15 ^{a,1}

^{a,b,c}Different superscript letters indicate significant difference ($P<0.05$) in the number of pH in the third phase between five treatments and the control.^{1,2,3}Different superscript numbers indicate significant difference ($P<0.05$) in the number of pH in different time of the third phase.

Table 3

Effect of five treatments and control on a change of organic matter (%) in the first phase experiment

Day	Control	Treatment 1	Treatment 2	Treatment 3	Treatment 4	Treatment 5
0	1.79±0.07 ^{a,1}	1.77±0.04 ^{a,1}	1.74±0.11 ^{a,1}	1.76±0.02 ^{a,1}	1.70±0.05 ^{a,1}	1.79±0.06 ^{a,1}
3	2.89±0.03 ^{a,3}	3.03±0.08 ^{a,3}	2.93±0.09 ^{a,3}	3.04±0.10 ^{a,4}	2.99±0.13 ^{a,4}	3.38±0.13 ^{b,4}
6	2.15±0.06 ^{a,2}	2.59±0.02 ^{bc,2}	2.67±0.09 ^{c,2}	2.53±0.08 ^{b,3}	2.56±0.07 ^{bc,3}	2.68±0.03 ^{c,2}
9	2.15±0.06 ^{a,2}	2.58±0.02 ^{cd,2}	2.51±0.04 ^{c,2}	2.09±0.02 ^{a,2}	2.27±0.06 ^{b,2}	2.64±0.04 ^{d,2}
12	3.37±0.03 ^{b,4}	3.31±0.10 ^{ab,4}	3.16±0.11 ^{a,4}	3.17±0.12 ^{a,4}	3.39±0.16 ^{b,5}	3.12±0.06 ^{a,3}
15	4.13±0.06 ^{a,5}	4.36±0.03 ^{b,5}	4.56±0.07 ^{c,5}	4.32±0.08 ^{b,5}	4.26±0.03 ^{b,6}	4.33±0.08 ^{b,5}

^{a,b,c}Different superscript letters indicate significant difference ($P<0.05$) in the number of organic matter in the first phase between five treatments and the control.^{1,2,3}Different superscript numbers indicate significant difference ($P<0.05$) in the number of organic matter in different time of the first phase.**Table 4**

Effect of five treatments and control on a change of organic matter (%) in the third phase experiment

Day	Control	Treatment 1	Treatment 2	Treatment 3	Treatment 4	Treatment 5
0	1.51±0.04 ^{a,1}	1.47±0.02 ^{a,1}	1.49±0.11 ^{a,1}	1.49±0.02 ^{a,1}	1.56±0.06 ^{a,1}	1.52±0.06 ^{a,1}
3	2.35±0.03 ^{a,2}	2.56±0.01 ^{c,2}	2.48±0.05 ^{b,2}	2.46±0.03 ^{b,2}	2.46±0.01 ^{b,2}	2.64±0.02 ^{d,2}
6	2.78±0.09 ^{a,3}	3.05±0.07 ^{b,3}	2.83±0.12 ^{a,3}	2.94±0.12 ^{ab,4}	2.85±0.10 ^{ab,23}	2.91±0.12 ^{ab,3}
9	2.69±0.12 ^{ab,3}	2.71±0.02 ^{ab,4}	2.61±0.02 ^{a,2}	2.70±0.02 ^{ab,3}	2.87±0.05 ^{bc,23}	2.99±0.02 ^{c,3}
12	3.08±0.06 ^{ab,4}	3.48±0.11 ^{d,5}	3.19±0.14 ^{bc,4}	3.30±0.13 ^{cd,5}	3.16±0.13 ^{bc,3}	2.97±0.05 ^{a,3}
15	4.36±0.06 ^{a,5}	4.64±0.04 ^{a,6}	4.23±0.12 ^{a,5}	4.48±0.12 ^{a,6}	4.17±0.13 ^{a,4}	4.53±0.08 ^{a,4}

^{a,b,c}Different superscript letters indicate significant difference ($P<0.05$) in the number of organic matter in the third phase between five treatments and the control.^{1,2,3}Different superscript numbers indicate significant difference ($P<0.05$) in the number of organic matter in different time of the third phase.

pathogenic bacteria (*Vibrio* and *Pseudomonas*) were routinely determined once every 3 days during the experiment for the first 15 days.

In the second phase, water and organic sludge from the shrimp farm were added above to the treated soil and left for 10 days designed as the second shrimp growing cycle. The amount of organic sludge added was equal to that at the beginning of the first phase. Shrimp pond water (15 ppt) was then added to a depth of 50 cm above the bottom of the fiber glass tanks. To begin the third phase, water was drained from the fiber glass tanks and soil was subjected to the same treatment protocols similar to the first phase for an additional period of 15 days without re-overlaying with organic sludge. The soil was again treated and collected for analysis similar to phase I.

2.4. Sampling and determining the physical properties of pond bottom soils

Soil samples in the experimental tanks were randomly collected from the upper 5-cm layer of soil surface with a 5-cm diameter core sampler. This layer was selected for sampling because it was more reactive and had a greater influence on water quality than deeper layers (Masuda and Boyd, 1994). Soil samples containing organic sludge from the experimental tanks were collected from the four corners and the center during the experiment and pooled for analysis. Determination of pH was accomplished by inserting a glass electrode into a 1:5 mixture of dry, pulverized soil samples containing organic sludge and de-ionized water (Islam et al., 2004). Soil organic matter was determined by loss on ignition. Soil samples were dried, crushed, weighed and evaluated in porcelain crucibles at 350 °C (Norris and Hutton, 1969). At each sampling, 100 g of soil samples from each tank was taken for analysis.

2.5. Bacterial counts

Soil samples from the eighteen tanks were collected every 3 days, brought to the laboratory and processed immediately. Soil samples were analyzed for viable plate counts by a series of 10-fold dilutions using sterile saline (0.85% NaCl solution, w/v) as dilution blanks, and 0.1 mL from each dilution was plated on agar using spread plating. Total heterotrophic bacterial (THB) counts in soil samples were determined using plate count agar (PCA; Difco, Detroit, MI, USA). For the enumeration of total bacteria, the inoculated plates were incubated at 30 °C for 24–48 h (Guerra-Flores et al., 1997; Abraham et al., 2004). *Vibrio* and *Pseudomonas* species were enumerated using thiosulfate–citrate–bile salt–sucrose agar (TCBS; Difco, Detroit, MI, USA) and *Pseudomonas* isolation agar (PIA; Oxoid, Basingstoke, UK), respectively, using the spread plate method (Moriarty, 1998). Samples were diluted serially, 0.1 mL aliquots plated onto TCBS or PIA and the plates incubated at 30 °C for 24–48 h (Thomas and Wimpenny, 1996; Hoi et al., 1998; Geysen et al., 2005; González-Miret et al., 2006). Afterwards, colonies were counted and the amount of bacteria was calculated as colony forming unit (CFU) per gram. Then, morphology and the number of yellow and green colonies on TCBS were recorded and subcultured on TCBS and Tryptic Soya Agar (TSA) plus 2.0% NaCl (Difco Laboratories) prior to identification by biochemical tests. All colonies that appeared in these time intervals were assumed to be *Vibrio*. These results helped to identify some but not all of the additional strains according to Bergey's manual of determinative bacteriology (Krieg and Holt, 1984). Colonies on PIA were treated with the oxidase test and identified based on Bergey's manual of determinative bacteriology (Krieg and Holt, 1984). Presumptive identification was accomplished by standard biochemical tests

Table 5Effect of five treatments and control on number of total heterotrophic bacteria ($\times 10^6$ CFU/g) in the first phase

Day	Control	Treatment 1	Treatment 2	Treatment 3	Treatment 4	Treatment 5
0	5.53±2.01 ^{a,12}	6.87±2.57 ^{a,1}	6.01±0.95 ^{a,3}	8.31±0.57 ^{a,12}	5.57±0.76 ^{a,1}	5.32±0.99 ^{a,2}
3	7.17±1.63 ^{ab,2}	6.11±1.31 ^{a,1}	6.05±1.77 ^{a,3}	5.93±1.75 ^{a,1}	6.07±1.26 ^{a,1}	9.61±3.54 ^{b,3}
6	3.33±1.17 ^{a,1}	5.85±1.63 ^{b,1}	10.95±0.35 ^{d,4}	8.21±1.70 ^{c,12}	5.52±1.27 ^{b,1}	7.85±1.20 ^{c,3}
9	3.20±0.28 ^{a,1}	6.9±1.23 ^{b,1}	10.51±3.11 ^{c,4}	13.05±0.07 ^{d,3}	6.50±3.47 ^{b,2}	7.55±1.91 ^{b,3}
12	10.35±1.77 ^{c,3}	10.15±3.04 ^{c,2}	1.89±0.14 ^{a,1}	7.75±0.35 ^{b,12}	6.02±1.56 ^{b,1}	1.05±0.21 ^{a,1}
15	6.65±1.77 ^{bc,2}	10.63±1.14 ^{d,2}	4.45±1.49 ^{b,23}	9.11±4.10 ^{cd,2}	5.82±0.57 ^{b,1}	1.01±0.28 ^{a,1}

^{a,b,c}Different superscript letters indicate significant difference ($P<0.05$) in the number of total heterotrophic bacteria of the first phase between five treatments and the control.^{1,2,3}Different superscript numbers indicate significant difference ($P<0.05$) in the number of total heterotrophic bacteria in different time of the first phase.

Table 6Effect of five treatments and control on number of total heterotrophic bacteria ($\times 10^6$ CFU/g) in the third phase

Day	Control	Treatment 1	Treatment 2	Treatment 3	Treatment 4	Treatment 5
0	4.87 $\pm$ 2.23 ^{b,3}	2.51 $\pm$ 0.42 ^{a,2}	3.01 $\pm$ 0.44 ^{ab,2}	2.33 $\pm$ 0.23 ^{a,3}	4.05 $\pm$ 0.64 ^{ab,2,3}	2.33 $\pm$ 1.2 ^{a,2}
3	2.53 $\pm$ 0.46 ^{a,2}	4.03 $\pm$ 0.55 ^{b,3}	3.20 $\pm$ 0.46 ^{ab,2}	2.04 $\pm$ 0.02 ^{a,3}	4.51 $\pm$ 1.35 ^{bc,2,3}	5.6 $\pm$ 1.41 ^{c,3}
6	1.27 $\pm$ 0.15 ^{ab,12}	1.43 $\pm$ 0.75 ^{ab,12}	5.33 $\pm$ 0.91 ^{c,3}	0.80 $\pm$ 0.21 ^{ab,2}	1.83 $\pm$ 0.96 ^{b,12}	0.47 $\pm$ 0.31 ^{a,1}
9	8.05 $\pm$ 0.35 ^{a,4}	5.87 $\pm$ 1.19 ^{a,4}	5.47 $\pm$ 0.80 ^{a,3}	3.65 $\pm$ 0.64 ^{a,4}	6.57 $\pm$ 4.18 ^{a,3}	7.7 $\pm$ 0.65 ^{a,4}
12	0.19 $\pm$ 0.04 ^{a,1}	0.4 $\pm$ 0.08 ^{b,1}	0.17 $\pm$ 0.11 ^{a,1}	0.41 $\pm$ 0.10 ^{b,1}	0.26 $\pm$ 0.08 ^{a,1}	0.29 $\pm$ 0.11 ^{ab,1}
15	0.42 $\pm$ 0.07 ^{b,1}	0.39 $\pm$ 0.045 ^{b,1}	0.27 $\pm$ 0.05 ^{a,1}	0.27 $\pm$ 0.05 ^{a,1}	0.41 $\pm$ 0.01 ^{b,1}	0.58 $\pm$ 0.07 ^{c,1}

^{a,b,c}Different superscript letters indicate significant difference ($P<0.05$) in the number of total heterotrophic bacteria of the third phase between five treatments and the control.^{1,2,3}Different superscript numbers indicate significant difference ($P<0.05$) in the number of total heterotrophic bacteria in different time of the third phase.**Table 7**Effect of five treatments and control on number of *Vibrio* spp. ($\times 10^2$ CFU/g) in the first phase experiment

Day	Control	Treatment 1	Treatment 2	Treatment 3	Treatment 4	Treatment 5
0	2.15 $\pm$ 0.15 ^{a,3}	1.65 $\pm$ 0.21 ^{a,2}	1.55 $\pm$ 0.37 ^{a,3}	1.47 $\pm$ 0.57 ^{a,2}	2.05 $\pm$ 0.43 ^{a,3}	1.90 $\pm$ 0.28 ^{a,3}
3	1.60 $\pm$ 0.18 ^{d,2}	1.35 $\pm$ 0.07 ^{c,2}	0.85 $\pm$ 0.21 ^{b,2}	1.65 $\pm$ 0.21 ^{d,2}	1.03 $\pm$ 0.06 ^{b,2}	0.35 $\pm$ 0.07 ^{a,2}
6	0 $\pm$ 0 ^{a,1}	0 $\pm$ 0 ^{a,1}	0 $\pm$ 0 ^{a,1}	0 $\pm$ 0 ^{a,1}	0 $\pm$ 0 ^{a,1}	0 $\pm$ 0 ^{a,1}
9	0 $\pm$ 0 ^{a,1}	0 $\pm$ 0 ^{a,1}	0 $\pm$ 0 ^{a,1}	0 $\pm$ 0 ^{a,1}	0 $\pm$ 0 ^{a,1}	0 $\pm$ 0 ^{a,1}
12	0 $\pm$ 0 ^{a,1}	0 $\pm$ 0 ^{a,1}	0 $\pm$ 0 ^{a,1}	0 $\pm$ 0 ^{a,1}	0 $\pm$ 0 ^{a,1}	0 $\pm$ 0 ^{a,1}
15	0 $\pm$ 0 ^{a,1}	0 $\pm$ 0 ^{a,1}	0 $\pm$ 0 ^{a,1}	0 $\pm$ 0 ^{a,1}	0 $\pm$ 0 ^{a,1}	0 $\pm$ 0 ^{a,1}

^{a,b,c}Different superscript letters indicate significant difference ($P<0.05$) in the number of *Vibrio* sp. of the first phase between five treatments and the control.^{1,2,3}Different superscript numbers indicate significant difference ($P<0.05$) in the number of *Vibrio* sp. in different time of the first phase.

(Gerhardt et al., 1994), Gram staining and colony morphology determination.

2.6. Statistical analysis

Data were shown as mean $\pm$ standard deviation (SD). All parameters were determined in three replicates. Significant difference in the change of pH, organic matter and bacteria among the treatments over time was tested by using a two-way analysis of variance (ANOVA). Duncan's New Multiple Range Test was used to isolate any significant differences detected in the ANOVA (Duncan, 1955). All data were considered significant at $P<0.05$.

3. Results

3.1. Effect of different shrimp pond bottom soil treatments on the change of soil physical characteristics in the first and third phase

In the first phase, the accumulated black and glutinous organic sludge was layered on the pond soils and then studied on the effectiveness of various pond bottom soil containing organic sludge treatments on changes in pH, organic matter, total heterotrophic bacteria, *Vibrio* and *Pseudomonas*. The initial pH of the control and treated groups, 7.19 $\pm$ 0.17 to 7.41 $\pm$ 0.14, did not differ significantly ($P>0.05$; Table 1). In control tanks, pH of pond soils at the beginning of experiment was 7.19 $\pm$ 0.17, and decreased to 6.77 $\pm$ 0.14 ($P<0.05$) on day 3. Soils dried in sunlight and tilled (treatment 1) also had a significantly lower pH of 7.19 $\pm$ 0.07 ($P<0.05$) at day 3, followed by a further decline

to 6.62 $\pm$ 0.15 ($P<0.05$) at the end of experiment (day 15). Similarly, soil dried in sunlight with the addition of probiotic (treatment 4) or dried in sunlight and tilled along with the addition of probiotics (treatment 5) declined in pH ($P<0.05$) by day 3. In contrast, soil treated with sunlight, tilling and lime addition (treatment 2) or sunlight and lime addition (treatment 3), pH declined significantly ($P<0.05$) only after 9 days.

After the pond soils containing organic sludge were treated in the first phase, shrimp pond water and the same amount of organic sludge added in the first phase were transferred into the experimental tanks in order to simulate a second crop of shrimp. In the beginning of the experiment in the third phase (day 0), pH of pond bottom soils in all groups increased (Table 2), compared to those of the same treatment during the end of the first phase (Table 1). Although there was no significant difference ($P>0.05$) in pH between treated and control groups at the beginning of the experiment, a significant decline ($P<0.05$) was observed in all groups except treatment 2 over the experimental period (Table 2). At the end of the experiment (day 15), pH of soils in treatment 2 and 3 remained near neutrality with average values of 7.39 $\pm$ 0.16 and 7.07 $\pm$ 0.05, respectively, while those of other treatments were slightly acidic (6.46 $\pm$ 0.07 to 6.71 $\pm$ 0.09).

Organic content of all groups at the commencement of experiment of each of the first and third phase was not significantly different ($P>0.05$), with average values of 1.70 $\pm$ 0.05% to 1.79 $\pm$ 0.07% (Table 3) and 1.47 $\pm$ 0.02% to 1.56 $\pm$ 0.06% (Table 4), respectively. A significant increase ($P<0.05$) in organic matter was, however, observed at the end of the experiment in the first and third phase, with values of 4.13 $\pm$ 0.06% to 4.56 $\pm$ 0.07% and 4.17 $\pm$ 0.13% to 4.64 $\pm$ 0.04%, respectively.

Table 8Effect of five treatments and control on number of *Pseudomonas* spp. ($\times 10^3$ CFU/g) in the first phase experiment

Day	Control	Treatment 1	Treatment 2	Treatment 3	Treatment 4	Treatment 5
0	6.53 $\pm$ 0.78 ^{a,2}	7.25 $\pm$ 0.67 ^{a,2}	8.75 $\pm$ 1.63 ^{a,3}	9.15 $\pm$ 1.20 ^{a,4}	9.45 $\pm$ 2.05 ^{a,3}	8.77 $\pm$ 1.50 ^{a,4}
3	14.87 $\pm$ 0.38 ^{d,5}	16.33 $\pm$ 0.66 ^{c,3}	14.07 $\pm$ 0.67 ^{cd,4}	8.41 $\pm$ 0.71 ^{b,3}	9.36 $\pm$ 0.89 ^{c,3}	4.47 $\pm$ 1.04 ^{a,3}
6	11.24 $\pm$ 0.42 ^{c,4}	3.87 $\pm$ 1.88 ^{a,1}	6.75 $\pm$ 1.27 ^{b,2}	3.92 $\pm$ 2.12 ^{a,2}	3.67 $\pm$ 2.06 ^{a,12}	2.11 $\pm$ 0.85 ^{a,2}
9	4.85 $\pm$ 1.34 ^{e,1}	3.5 $\pm$ 0.66 ^{d,1}	0.75 $\pm$ 0.35 ^{a,1}	1.17 $\pm$ 0.25 ^{ab,1}	2.1 $\pm$ 0.44 ^{bc,1}	2.6 $\pm$ 1.63 ^{cd,2}
12	8.15 $\pm$ 0.35 ^{c,3}	6.67 $\pm$ 0.61 ^{d,2}	1.51 $\pm$ 0.42 ^{a,1}	1.21 $\pm$ 0.42 ^{a,1}	4.67 $\pm$ 0.74 ^{c,2}	2.65 $\pm$ 0.21 ^{b,2}
15	4.75 $\pm$ 1.20 ^{c,1}	2.95 $\pm$ 0.78 ^{b,1}	1.03 $\pm$ 0.28 ^{a,1}	3.03 $\pm$ 0.42 ^{b,2}	3.75 $\pm$ 0.07 ^{b,12}	0.60 $\pm$ 0.2 ^{a,1}

^{a,b,c}Different superscript letters indicate significant difference ($P<0.05$) in the number of *Pseudomonas* spp. of the first phase between five treatments and the control.^{1,2,3}Different superscript numbers indicate significant difference ($P<0.05$) in the number of *Pseudomonas* spp. in different time of the first phase.

Table 9Effect of five treatments and control on number of *Pseudomonas* spp. ($\times 10^3$ CFU/g) in the third phase

Day	Control	Treatment 1	Treatment 2	Treatment 3	Treatment 4	Treatment 5
0	6.80 $\pm$ 2.07 ^{a,23}	9.77 $\pm$ 1.06 ^{a,2}	8.70 $\pm$ 1.95 ^{a,3}	8.12 $\pm$ 1.65 ^{a,2}	11.03 $\pm$ 1.27 ^{a,2}	8.47 $\pm$ 0.25 ^{a,3}
3	5.63 $\pm$ 1.07 ^{ab,12}	13.11 $\pm$ 1.14 ^{c,3}	3.57 $\pm$ 0.95 ^{a,12}	4.51 $\pm$ 0.89 ^{a,1}	7.13 $\pm$ 1.50 ^{b,2}	7.43 $\pm$ 1.52 ^{b,3}
6	13.20 $\pm$ 0.95 ^{c,5}	4.33 $\pm$ 0.65 ^{a,1}	4.07 $\pm$ 0.61 ^{a,12}	7.33 $\pm$ 0.96 ^{b,2}	8.97 $\pm$ 2.72 ^{b,2}	2.17 $\pm$ 0.57 ^{a,2}
9	7.93 $\pm$ 0.67 ^{b,34}	6.32 $\pm$ 0.96 ^{b,1}	8.50 $\pm$ 0.31 ^{b,3}	10.5 $\pm$ 0.92 ^{c,2}	2.23 $\pm$ 0.61 ^{a,1}	0 $\pm$ 0 ^{a,1}
12	4.02 $\pm$ 0.62 ^{c,1}	7.31 $\pm$ 0.4 ^{d,1}	4.63 $\pm$ 0.71 ^{c,2}	9.17 $\pm$ 1.21 ^{e,2}	1.73 $\pm$ 0.12 ^{b,1}	0 $\pm$ 0 ^{a,1}
15	9.51 $\pm$ 0.72 ^{d,4}	6.37 $\pm$ 0.95 ^{c,1}	2.33 $\pm$ 0.41 ^{b,1}	3.3 $\pm$ 0.4 ^{b,1}	2.50 $\pm$ 0.28 ^{b,1}	0 $\pm$ 0 ^{a,1}

^{a,b,c}Different superscript letters indicate significant difference ($P<0.05$) in the number of *Pseudomonas* spp. of the third phase between five treatments and the control.^{1,2,3}Different superscript numbers indicate significant difference ($P<0.05$) in the number of *Pseudomonas* spp. in different time of the third phase.

3.2. Effect of different shrimp pond bottom soil treatments on the change of total heterotrophic bacteria, *Vibrio* and *Pseudomonas* in the first and third phase

Total heterotrophic bacteria (THB) of the control and treated groups during the first phase of the experiment ranged from $(1.01 \pm 0.28) \times 10^6$ CFU/g to $(13.05 \pm 0.07) \times 10^6$ CFU/g (Table 5). A significant decline in THB over time was found only in soil dried in sunlight, tilled with probiotics added (treatment 5). During the third phase, a significant decline in THB was observed in both treated and control groups, with an average value on day 15 less than $(0.58 \pm 0.07) \times 10^6$ CFU/g (Table 6).

Vibrio numbers in the treated and control groups at the beginning of the first phase were not significantly different ($P>0.05$), with average values in a range of $(1.47 \pm 0.57) \times 10^2$ to $(2.15 \pm 0.15) \times 10^2$ CFU/g (Table 7). However, *Vibrio* were not detected in any group on day 6 or after. In the third phase, no colonies of *Vibrio* spp. were detected in any group during the 15-day trials. The isolated colonies on TCBS were further identified by biochemical tests. *V. parahaemolyticus* was the only species found in this study which showed positive results with oxidase, lysine decarboxylase, ornithine decarboxylase, motility, arabinose fermentation, mannitol fermentation, growth in 3, 6, or 8% NaCl and growth at 42 °C, and negative results with VP, urea, ONPG, sucrose fermentation, lactose fermentation and growth in 10% NaCl.

Pseudomonas levels in the treated groups at the beginning of the first phase ranged from $(7.25 \pm 0.67) \times 10^3$ CFU/g to $(9.45 \pm 2.05) \times 10^3$ CFU/g, not significantly different ($P>0.05$) from those of the controls $(6.53 \pm 0.78) \times 10^3$ CFU/g (Table 8). A significant decrease ($P<0.05$) in *Pseudomonas* counts was observed over time in all groups. However, the greatest decrease in *Pseudomonas* occurred in soil dried in sunlight, tilled with probiotics added (treatment 5) with numbers of $(0.60 \pm 0.02) \times 10^3$ CFU/g at day 15. The number of *Pseudomonas* in the treated and control groups during the beginning of third phase did not differ significantly ($P>0.05$) and ranged from $(6.80 \pm 2.07) \times 10^3$ CFU/g to $(11.03 \pm 1.27) \times 10^3$ CFU/g (Table 9). However, soil dried in sunlight, tilled with probiotics added (treatment 5) showed the greatest decline ($P<0.05$) in the number of *Pseudomonas*. There was no detectable colony of *Pseudomonas* after day 9 in treatment 5, while in the other treatments the number of *Pseudomonas* ranged from $(2.33 \pm 0.41) \times 10^3$ CFU/g to $(9.51 \pm 0.72) \times 10^3$ CFU/g at the end of experiment (day 15).

4. Discussion

The decline of pH over time in the first and third phase suggested that drying of soil with sunlight is a major factor controlling the decrease in pH. Drying also enhances soil aeration that along with an optimum temperature range accelerates nitrification as nitrifying bacteria are almost exclusively aerobic microorganisms (Avnimelech and Ritvo, 2003). As a consequence, nitrification releases H^+ to the soil, causing a decrease in pH (Hargreaves, 1998).

In the second phase, an increase in pH occurred which was related with the waterlogged condition, inhibiting nitrification (Charman and Roper, 2000; Avnimelech and Ritvo, 2003). Denitrification of nitrate in the pond soil may also increase pH (Charman and Roper, 2000; Fenton and Helyar, 2000). In the third phase, a decline of soil pH in all groups

was similar to those in the first phase and indicated a reoccurrence of nitrification. When lime was added to soil containing organic sludge and dried (treatment 3) or dried and tilled (treatment 2), pH of treated soils was neutral. This indicated that liming maintained pH in treated soils containing organic sludge, in accord with earlier observations (Martikainen et al., 1993; Rudebeck and Persson, 1998; Bckman and Klemetsson, 2003). As a result, lime has been routinely applied to correct acidification (Golez, 1995) and is considered as one of the most important procedures for maintaining soil at a satisfactory pH (Charman and Roper, 2000).

Organic matter used in the present study refers to the stable humus, which is considered beneficial for shrimp culture (Shang et al., 1998). In contrast, organic sludge contains a high amount of toxic materials such as hydrogen sulfide, ammonia gas as well as pathogenic microorganisms (Bergheim and Asgard, 1996; Avnimelech and Ritvo, 2003). An increase of organic matter in all groups during the first and third phase over time indicated the importance of its decomposition by drying in sunlight. Drying enhanced microbial oxidation of organic matter (Arenas and De La Lanza, 1981. Campbell et al. (1994) reported that moisture and temperature are the main factors controlling mineralization of nitrogen and carbon. Soil temperature in the present study during drying was about 30–36 °C, resulting in an increase in organic sludge decomposition. This result is in agreement with Boyd (1995) who reported that soil temperature and soil water greatly influences the rates of biological, physical, and the chemical processes in soil. Future experiment regarding water content in sediment needs to be investigated as bacterial viability, bacterial cultivability, bacterial activity and mineralization process, pH and organic content are affected by water content.

The observed THB levels found during the first phase was slightly higher than those found in other shrimp culture ponds (Devaraja et al., 2002; Tendencia et al., 2006). Devaraja et al. (2002) reported that the THB levels were 3.75×10^5 CFU/g in pond bottom soil collected from black tiger shrimp ponds. Tendencia et al. (2006) reported levels of THB in shrimp pond bottom soil, ranging from 5.4×10^5 CFU/g to 6.8×10^5 CFU/g. However, in tilapia pond bottom soil the number of THB was much higher, ranging from $1.2 \pm 3.1 \times 10^6$ CFU/g to $7.3 \pm 1.1 \times 10^7$ CFU/g (Al-Harbi and Uddin, 2005). Low values of THB of under $0.58 \pm 0.07 \times 10^6$ CFU/g at the end of experiment in the third phase indicated that drying of soil in sunlight reduced the number of heterotrophic bacteria.

For the *Vibrio* count, it appears that the major factor regulating the removal of *Vibrio* spp. from the pond bottom soil was drying. *Vibrio* spp. were reported to grow well in a seawater base (Costa et al., 1998). Several authors also reported that drying of pond soil between cycles of production caused a decline of pathogenic bacteria accumulated from the previous crop, elimination of toxic gases such as ammonia, hydrogen sulfide and methane, oxidation of FeS, increase in pH and redox potential and mineralization of organic C, organic N and organic P (Boyd, 1992; De Groot and Van Wijck, 1993; Kongkeo, 1997). Interestingly, *V. parahaemolyticus* was the dominant *Vibrio* species found in all the pond soils, in agreement with the findings of Cruz dela et al. (1990), Leangphibul et al. (1986) and Pradeep and Lakshmanperumalseamy (1984). Moreover, Bhaskar and Setty (1994) proposed

that pond soil, water and shrimp feed were the main sources of *V. parahaemolyticus*. The level of *Vibrio* during the beginning of experiment in first phase of the present study was within the same range reported by Gopal et al. (2005) and Tendencia and dela Peña (2002).

Pseudomonas is one of the indigenous microflora in aquatic habitats in which some of them have an important role in the environment stability (Hongxiang et al., 2008). However, some of *Pseudomonas* species (e.g. *P. anguilliseptica*) are the potential causative agents for diseases in the culture of aquatic animals (Costa et al., 1998; Nimrat et al., 2005; Colakoglu et al., 2006; Nimrat and Vuthiphandchai, 2008). Little information is available on safe concentrations of *Pseudomonas* in the aquaculture environment, particularly, pond bottom soils. Observed levels of *Pseudomonas* at the beginning of the first phase in the present study was higher than those reported in tilapia ponds in Saudi Arabia (Al-Harbi and Uddin, 2005). A combination of drying with sunlight and tilling with probiotics (treatment 5) was the most effective treatment to eliminate *Pseudomonas* in pond soil. Control of potential pathogenic bacteria number is needed for aquaculture success since outbreaks of disease are usually associated with increases in the proportions of some *Vibrio* and *Pseudomonas* species (Sung et al., 1999). *Vibrio* have been reported to be the most numerous of the reported bacterial agents of penaeid shrimp and the majority of bacteria present in the normal microflora of cultured and wild penaeid shrimp (Mohney et al., 1994; Gomez-Gill et al., 1998; Leano et al., 1998; Moriarty, 1998). Rapid disappearance of *Vibrio* spp., compared to slow disappearance of *Pseudomonas*, in the present study indicated that it was more resistant to drying with sunlight than *Vibrio* spp.

A combination of drying with sunlight and tilling with probiotics (treatment 5) was the most effective treatment to eliminate *Pseudomonas* in pond soil. Although *Vibrio* and *Pseudomonas* are a component of the indigenous microflora in aquatic habitats, they are the major causative agents for most serious diseases in the culture of aquatic animals (Thune et al., 1993; Toranzo and Barja, 1993; Costa et al., 1998; Nimrat et al., 2005; Colakoglu et al., 2006; Nimrat and Vuthiphandchai, 2008). Control of potential pathogenic bacteria number is needed for aquaculture success since outbreaks of disease are usually associated with increases in the proportions of some *Vibrio* and *Pseudomonas* species (Sung et al., 1999). Rapid disappearance of *Vibrio* spp., compared to slow disappearance of *Pseudomonas*, in the present study indicated that it was more resistant to drying with sunlight than *Vibrio* spp. Future experiment on molecular identification of some representative isolates (*Vibrio* and *Pseudomonas*) would be useful for detection of these microorganisms.

Addition of probiotic combined with drying and tilling gave the best reduction in *Vibrio* spp., and *Pseudomonas* spp. counts, compared to other treatments. Drying of soils facilitates aeration, enhances decomposition and changes the microbial population (Sonnenholzner and Boyd, 2000b). For example, metabolism of oxidizing bacteria increased significantly in dried pond soil within a few hours following drying (Avnimelech and Ritvo, 2003). The disappearance of *Pseudomonas* after day 9 in the third phase of the group treated with drying and tilling with probiotics (treatment 5) might be related to the combined effect of tilling and probiotic applications. Tilling would also increase pond soil respiration, which favors conditions for probiotic growth (Avnimelech and Ritvo, 2003). Probiotics may also reduce the number of *Vibrio* spp. and *Pseudomonas* spp. via production of antimicrobial substances or enzyme excretions or by competition for space and nutrients (Moriarty, 1998; Gram et al., 1999; Balcázar and Rojas-Luna, 2007; Balcázar et al., 2007). Probiotic utilization, sometimes called bioaugmentation or bioremediation, has been proposed as an alternate environmentally approach for treatment of aquaculture system to control and compete with pathogenic bacteria (Moriarty, 1997, 1998; Anderson and Pempkowiak, 1999; Sonnenholzner and Boyd, 2000a; Vaseeharan et al., 2004). Boyd (1995) reported several advantages for the use of probiotics in aquaculture such as

accelerated degradation of organic matter, increase dissolved oxygen, biodegradation of accumulated waste products (nitrite, ammonia, carbon dioxide and sulfide) as well as reducing feed conversion ratios. As a consequence, the combination of drying, tilling and addition of probiotic could be the effective way to treat and condition pond soil as well as reducing the incidence of disease in shrimp culture. In the present study, *Bacillus* spp. were the majority group of probiotics. Moriarty (1998) reported that there are several mechanisms involved in *Bacillus* controlled *Vibrio* species. *Bacillus* produces an exoenzyme which degrades slime and biofilms and allowing it to penetrate slime layers around Gram negative bacteria, including *Vibrio*. Further, *Bacillus* grows more rapidly than *Vibrio*; competing favorably with pathogens for nutrients leading to pathogenic starvation. Finally, *Bacillus* can produce antibiotics to inhibit *Vibrio* growth. Moriarty (1998) demonstrated that probiotics containing *Bacillus* can completely eliminate the luminescent *Vibrio* in pond bottom soil. Vaseeharan et al. (2004) reported that probiotic-treated ponds contained lower pathogenic *Vibrio anguillarum*-like bacteria densities than those in the untreated (control) ponds.

5. Conclusion

Drying of soil with sunlight reduced soil pH while tilling (and drying) tended to increase pH. Pond bottom soils containing black and glutinous organic sludge are required to be treated before the next shrimp culture crop because it accumulated the toxic materials and high numbers of shrimp pathogens (*Vibrio* and *Pseudomonas*), which are harmful to shrimp culture productivity and sustainability. A combination on the use of soil drying in sunlight and tilling with the addition of probiotics (treatment 5) was effective in significantly maintaining the soil physical characteristics (pH and organic matter) and degradation of toxic organic sludge into stabilized organic matter as well as removal of shrimp pathogenic bacteria (*Vibrio* and *Pseudomonas*). Liming would be the suitable management procedure to maintain pH in treated soils containing organic sludge.

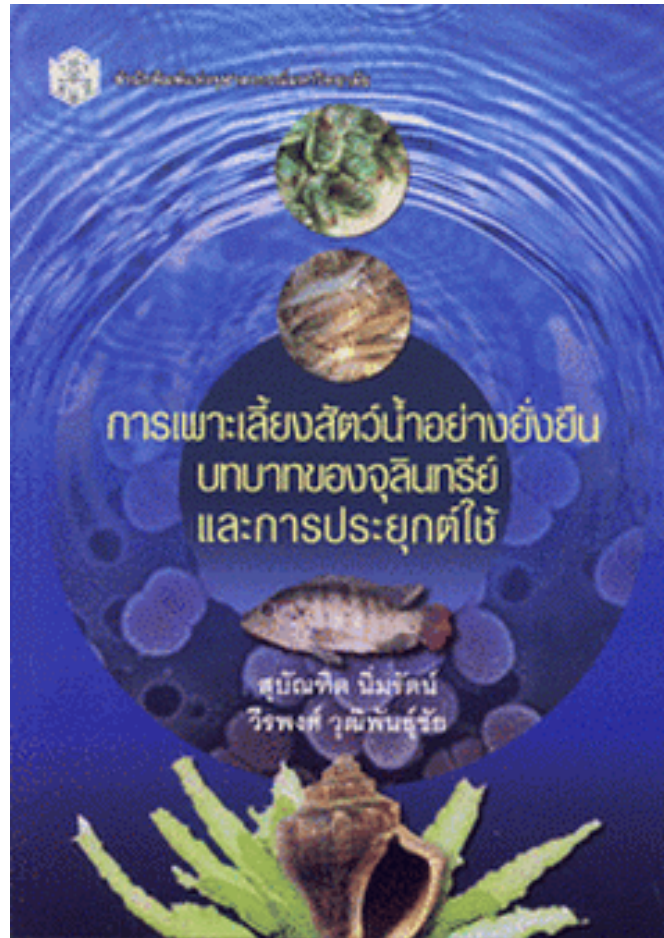
Acknowledgements

This project was supported in part by a grant RMU5080020 of the Thailand Research Fund (TRF) to Dr. Subuntith Nimrat, principal investigator. The authors are grateful to the Department of Microbiology and Department of Aquatic Science, Faculty of Science, Burapha University, for providing equipments and Dr. F.W.H. Beamish for proofreading the manuscript.

References

- Abraham, T.J., Ghosh, S., Nagesh, T.S., Sasmal, D., 2004. Distribution of bacteria involved in nitrogen and sulphur cycles in shrimp culture systems of West Bengal, India. *Aquaculture* 239, 275–288.
- Al-Harbi, A.H., Uddin, N., 2005. Bacterial diversity of tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in brackish water in Saudi Arabia. *Aquaculture* 250, 566–572.
- Anderson, D.O., Pempkowiak, J., 1999. Sediment content of metals before and after lake water liming. *Sci. Total Environ.* 243, 107–118.
- Arenas, V., De La Lanza, G., 1981. Effect of dried and cracked sediment on the availability of phosphorus in a coastal lagoon. *Estuaries* 4, 206–212.
- Avnimelech, Y., Ritvo, G., 2003. Shrimp and fish pond soils: processes and management. *Aquaculture* 220, 549–567.
- Balcázar, J.L., Rojas-Luna, T., 2007. Inhibitory activity of probiotic *Bacillus subtilis* UTM 126 against *Vibrio* species confers protection against vibriosis in juvenile shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Curr. Microbiol.* 5, 409–412.
- Balcázar, J.L., Rojas-Luna, T., Cunningham, D.P., 2007. Effect of the addition of four potential probiotic strains on the survival of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following immersion challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Invertebr. Pathol.* 96, 147–150.
- Bäckman, J.S.K., Klemetsson, A.K., 2003. Increased nitrification in acid coniferous forest soil due to high nitrogen deposition and liming. *Scand. J. For. Res.* 18, 514–524.
- Bergheim, A., Asgard, T., 1996. Waste production from aquaculture. In: Baird, D.J., Beveridge, M.C.M., Kelly, L.A., Muir, J.F. (Eds.), *Aquaculture and Water Resource Management*. Blackwell, Oxford, pp. 50–80.
- Bhaskar, N., Setty, T.M.R., 1994. Incidence of vibrios of public health significance in the farming phase of tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *J. Sci. Food Agric.* 66, 225–231.

- Boyd, C.E., 1992. Shrimp pond bottom soil and sediment management. In: Wyban, J. (Ed.), Proceedings Special Session on Shrimp Farming. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, pp. 166–181.
- Boyd, C.E., 1995. Bottom Soil, Sediments and Pond Aquaculture. Chapman and Hall, New York, USA. 350 pp.
- Boyd, C.E., Teichert-Coddington, D., 1994. Pond bottom soil respiration during fallow and culture periods in heavily fertilized tropical fish ponds. *J. World Aquac. Soc.* 25, 417–424.
- Campbell, C.A., Jame, Y.M., Akinremi, O.O., Beckie, H., 1994. Evaluating potential nitrogen mineralization for predicting fertilizer nitrogen requirements of long-term field experiments. In: Havlin, J.L., Jacobson, J.S. (Eds.), Soil Testing: Prospects for Improving Nutrient Recommendations. Soil Science Society of America, Madison, pp. 81–100.
- Charman, P.E.V., Roper, M.M., 2000. Soil organic matter. In: Charman, P.E.V., Murphy, B.W. (Eds.), Soil: Their Properties and Management. Oxford University Press, Melbourne, pp. 260–270.
- Colakoglu, F.A., Sarmasik, A., Koseoglu, B., 2006. Occurrence of *Vibrio* spp. and *Aeromonas* spp. in shellfish harvested off Dardanelles coast of Turkey. *Food Control* 17, 648–652.
- Costa, R., Mermod, I., Koblav, S., Morlet, B., Haffner, P., Berthe, F., Legromellec, M., Grimont, P., 1998. Isolation and characterization of bacteria associated with a *Penaeus stylirostris* disease (Syndrome 93) in New Caledonia. *Aquaculture* 164, 297–309.
- Cruz dela, A.R.G., Santos, L.M., Agudo, F., Dangla, E., 1990. Microbiology of prawn processing. *FAO Fish. Rep.* 401, 86–98 (Suppl.).
- De Groot, C.J., Van Wijck, C.V., 1993. The impact of desiccation of a freshwater marsh (Garcines Nord, Camargue, France) on sediment–water–vegetation interactions. Part 1: the sediment chemistry. *Hydrobiologia* 252, 83–94.
- Devaraja, T.N., Yusoff, F.M., Shariff, M., 2002. Changes in bacterial populations and shrimp production in ponds treated with commercial microbial products. *Aquaculture* 206, 245–256.
- Duncan, D.B., 1955. Multiple-range and multiple *F* test. *Biometrics* 11, 1–42.
- Fenton, G., Helyar, K.R., 2000. Soil acidification. In: Charman, P.E.V., Murphy, B.W. (Eds.), Soil: Their Properties and Management. Oxford University Press, Melbourne, pp. 223–237.
- Gatesoupe, F.J., 1999. The use of probiotics in aquaculture—a review. *Aquaculture* 180, 147–165.
- Gerhardt, P.R., Murray, G.E., Wood, W.A., Krieg, N.R., 1994. Methods for General and Molecular Microbiology. American Society for Microbiology, ASM Press, Washington, D.C. 791 pp.
- Geysen, S., Geeraerd, A.H., Verlinden, B.E., Michiels, C.W., Van Impe, J.F., Nicolai, B.M., 2005. Predictive modelling and validation of *Pseudomonas fluorescens* growth at superatmospheric oxygen and carbon dioxide concentrations. *Food Microbiol.* 22, 149–158.
- Golez, N.V., 1995. Formation of acid sulfate soil and its implications to brackishwater ponds. *Aquac. Eng.* 14, 297–316.
- Gomez-Gill, B.L., Roque, A., Turnbull, J.F., Inglis, V., Guerra-Flores, A.L., 1998. Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 163, 1–9.
- González-Miret, M.L., Escudero-Gilete, M.L., Heredia, F.J., 2006. The establishment of critical control points as the washing and air chilling stages in poultry meat production using multivariate statistics. *Food Control* 17, 935–941.
- Gopal, S., Ottas, K., Kumar, S., Karunasagar, I., Nishibuchi, M., Karunasagar, I., 2005. The occurrence of *Vibrio* species in tropical shrimp culture environments; implications for food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 102, 151–159.
- Gram, L., Melchiorson, J., Spanggaard, B., Huber, I., Nielsen, T.F., 1999. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 969–973.
- Gross, A., Nemirovsky, A., Zilberg, D., Khaimov, A., Brenner, A., Snir, E., Ronen, Z., Nejdat, A., 2003. Soil nitrifying enrichments as biofilter starters in intensive recirculating saline water aquaculture. *Aquaculture* 223, 51–62.
- Guerra-Flores, A.L., Abreu-Grobois, A., Gomez-Gil, B., 1997. A comparison between total viable count by spread plating and AquaPlak® for enumeration of bacteria in water from a shrimp farm. *J. Microbiol. Methods* 30, 217–220.
- Hargreaves, J.A., 1998. Review: nitrogen biogeochemistry of aquaculture ponds. *Aquaculture* 166, 181–212.
- Hoi, L., Larsen, J.L., Dalsgaard, I., Dalsgaard, A., 1998. Occurrence of *Vibrio vulnificus* biotypes in Danish marine environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 7–13.
- Hongxiang, X., Min, W., Xiaogu, W., Junyi, Y., Chunsheng, W., 2008. Bacterial diversity in deep-sea sediment from northeastern Pacific Ocean. *Acta Ecol. Sinica* 28, 479–485.
- Hopkins, J.S., Sandifer, P.A., Browdy, C.L., 1994. Sludge management in intensive pond culture of shrimp: effects of management regime on water quality, sludge characteristics, nitrogen extinction, and shrimp production. *Aquac. Eng.* 13, 11–30.
- Islam, S., Sarker, J., Yamamoto, T., Wahab, A., Tanaka, M., 2004. Water and sediment quality, particle mass budget and effluent N loading in coastal brackishwater shrimp farms in Bangladesh. *Mar. Pollut. Bull.* 48, 471–485.
- Jiravanichpaisal, P., Miyazaki, T., Limsuwan, C., Somjetlerdchalern, A., 1993. Comparative histopathology of vibriosis in black tiger prawn, *Penaeus monodon*. In: Asian Fisheries Society (Ed.), 2nd Symposium on Diseases in Asian Aquaculture. Asian Fisheries Society, p. 14.
- Kongkeo, H., 1997. Comparison of intensive shrimp farming systems in Indonesia, Philippines, Taiwan and Thailand. *Aquac. Res.* 28, 789–796.
- Krieg, N.R., Holt, J.G., 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 1. Williams and Wilkins Co, Baltimore, Maryland, USA. 1599 pp.
- Leangphibul, P., Nilakul, C., Soranchai, C., Tantimavanich, S., Dasemsuksakul, K., 1986. Investigation of pathogenic from shrimp farms. *Kasetsart J.* 20, 333–337.
- Leano, E.M., Lavilla-Pitogo, C.R., Paner, M.G., 1998. Bacterial flora in the hepatopancreas of pond-reared *Penaeus monodon* juveniles with luminous vibriosis. *Aquaculture* 164, 367–374.
- Lightner, D.V., 1993. Diseases of cultured penaeid shrimps. In: Mc Vey, J.P. (Ed.), CRC Handbook of Mariculture, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, USA, pp. 393–486.
- Lin, C.K., Nash, G., 1996. Asian Shrimp News, Collected Columns, 1989–1995. Asian Shrimp Culture Council, Bangkok, Thailand.
- Martikainen, P.J., Lehtonen, M., Lang, K., Boer, W.D., Ferm, A., 1993. Nitrification and nitrous oxide production potentials in aerobic soil samples from the soil profile of a Finnish coniferous site receiving high ammonium deposition. *FEMS Microbiol. Ecol.* 13, 113–121.
- Masuda, K., Boyd, C.E., 1994. Effects of aeration, alum treatment, liming and organic matter application on phosphorus exchange between soil and water in aquaculture ponds at Auburn, Alabama. *J. World Aquac. Soc.* 25, 405–416.
- Mohney, L.L., Lightner, D.V., Bell, T.A., 1994. An epizootic of vibriosis in Ecuadorian pond-reared *Penaeus vannamei* Bonne (Crustacea: Decapoda). *J. World Aquac. Soc.* 25, 116–125.
- Moriarty, D.J.M., 1997. The role of microorganisms in aquaculture ponds. *Aquaculture* 151, 333–349.
- Moriarty, D.J.M., 1998. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture* 164, 351–358.
- Nimrat, S., Vuthiphandchai, V., 2008. Role of bacteria in the chilled storage and cryopreservation of sperm in aquatic animals: A review. In: Schwartz, S.H. (Ed.), Aquaculture Research Trends. Nova Science Publishers, Inc., USA, pp. 149–184.
- Nimrat, S., Sangnawakij, T., Vuthiphandchai, V., 2005. Preservation of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) Spermatozoa by chilled storage. *J. World Aquac. Soc.* 36, 76–86.
- Norrish, K., Hutton, J.T., 1969. An accurate X-ray spectrographic method for the analysis of a wide range of geological samples. *Geochim. Cosmochim. Acta* 33, 431–453.
- Pradeep, R., Lakshmanperumalseamy, P., 1984. Seasonal variation of *Vibrio parahaemolyticus* in Cochlin backwaters. *Indian J. Mar. Sci.* 13, 113–115.
- Rosenberry, B., 1993. World Shrimp Farming. Aquaculture Digest, San Diego, California, USA, pp. 1–19.
- Ruangpan, L., Kitao, T., 1991. *Vibrio* bacteria isolated from black tiger shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius. *J. Fish Dis.* 14, 383–388.
- Rudebeck, A., Persson, T., 1998. Nitrification in organic and mineral soil layers in coniferous forests in response to acidity. *Environ. Pollut.* 102, 377–383.
- Shang, Y.C., Leung, P., Ling, B.H., 1998. Comparative economics of shrimp farming in Asia. *Aquaculture* 164, 183–200.
- Smith, P.T., 1993. Prawn farming in Australia — sediment is a major issue. *Aust. Fish.* 52, 29–32.
- Smith, P.T., 1996. Physical and chemical characteristics of sediments from prawn farms and mangrove habitats on the Clarence River, Australia. *Aquaculture* 146, 47–83.
- Sonnenholzner, S., Boyd, C.E., 2000a. Managing the accumulation of organic matter deposited on the bottom of shrimp ponds. Do chemical and biological probiotics really work? *World Aquac.* 31, 24–28.
- Sonnenholzner, S., Boyd, C.E., 2000b. Chemical and physical properties of shrimp pond bottom soils in Ecuador. *J. World Aquac. Soc.* 31, 358–375.
- Sung, H.H., Li, H.C., Tsai, F.M., Ting, Y.Y., Chao, W.L., 1999. Change in the composition of *Vibrio* communities in pond water during tiger shrimp (*Penaeus monodon*) cultivation and in the hepatopancreas of healthy and disease shrimp. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 236, 261–271.
- Tendencia, E.A., dela Peña, L.D., 2002. Level and percentage recovery of resistance to oxytetracycline and oxolinic acid of bacteria from shrimp ponds. *Aquaculture* 213, 1–13.
- Tendencia, E.A., dela Peña, M.R., Choresca Jr., C.H., 2006. Effect of shrimp biomass and feeding on the anti-*Vibrio harveyi* activity of *Tilapia* sp. in a simulated shrimp–tilapia polyculture system. *Aquaculture* 253, 154–162.
- Thomas, L.V., Wimpenny, J.W.T., 1996. Competition between *Salmonella* and *Pseudomonas* species growing in and on agar, as affected by pH, sodium chloride concentration and temperature. *Int. J. Food Microbiol.* 29, 361–370.
- Thune, R.L., Stanley, L.A., Cooper, R.K., 1993. Pathogenesis of gram-negative bacterial infections in warmwater fish. *Annu. Rev. Fish Dis.* 3, 37–68.
- Toranzo, A.E., Barja, J.L., 1993. Virulence factors of bacteria pathogenic for coldwater fish. *Annu. Rev. Fish Dis.* 3, 5–36.
- Vaseeharan, B., Lin, J., Ramasamy, P., 2004. Effect of probiotics, antibiotic sensitivity, pathogenicity, and plasmid profiles of *Listonella anguillarum*-like bacteria isolated from *Penaeus monodon* culture systems. *Aquaculture* 241, 77–91.
- Wang, Y.B., Han, J.Z., 2007. The role of probiotic cell wall hydrophobicity in bioremediation of aquaculture. *Aquaculture* 269, 349–354.



การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอย่างยั่งยืน: บทบาทของจุลินทรีย์และการประยุกต์ใช้

ผู้แต่ง : สุภัณฑิต นิ่มรัตน์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย

สำนักพิมพ์ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รหัสหนังสือ : 9789740324980

ISBN : 9789740324980

ปีพิมพ์ : 1/2552

ขนาด (กว้าง x สูง) : 190 x 260 มิลลิเมตร

ปก/จำนวนหน้า : ปกอ่อน/ 308 หน้า

หมวดหนังสือ : สัตวบาล