

ปัญหาพิเศษ  
เรื่อง

ผลของความเค็มต่อประสิทธิภาพของโพรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ  
Effect of Salinity on Probiotic in Black Tiger Shrimp  
(*Penaeus monodon*) Culture

โดย

นางสาวบุญยงษ์ น้าไชควิริยะ

ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

กรุงเทพมหานคร 10520

Department of Fisheries Science Faculty of Agricultural Technology

King Mongkut's Institute of Technology Lardkrabang

Bangkok 10520

ใบรับรองปัญหาพิเศษ  
ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง

เรื่อง ผลของความเค็มต่อประสิทธิภาพของโพรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ  
Effect of Salinity on Probiotic in Black Tiger Shrimp  
(*Penaeus monodon*) Culture

ชื่อนักศึกษา นางสาวนุชนนุช นำโชควิริยะ

ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ดร.นงนุช เลาหะวิสุทธิ

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษา.....*นงนุช เลาหะวิสุทธิ*.....  
(ดร.นงนุช เลาหะวิสุทธิ)

ภาควิชารับรองแล้ว

*นงนุช ทงวิ*  
.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สมชาย หวังวิบูลย์กิจ)

หัวหน้าภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง

วันที่ 24 เดือน พ.ย. พ.ศ. 2545

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง  
ปัญหาพิเศษ

เรื่อง

ผลของความเค็มต่อประสิทธิภาพของโพรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ  
Effect of Salinity on Probiotic in Black Tiger Shrimp  
(*Penaeus monodon*) Culture



T099212

โดย

นางสาวบุญนุช นำโชควิริยะ

ร.พ.  
ร.บ. 624 ค  
2545

เลขหมู่.....  
เลขทะเบียน..... 99212  
วันเดือนปี..... 11 5 2545

ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง  
คณะเทคโนโลยีการเกษตร  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
กรุงเทพมหานคร 10520  
พ.ศ. 2545

## บทคัดย่อปัญหาพิเศษ

### เรื่อง

ผลของความเค็มต่อประสิทธิภาพของโพรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

Effect of Salinity on Probiotic in Black Tiger Shrimp

(*Penaeus monodon*) Culture

การทดสอบประสิทธิภาพของโพรไบโอติกกลุ่ม Lactic acid bacteria โดยการทดลองเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus* L. *panthalam* *Pediococcus* sp. *L. pentosus* และ *Vibrio harveyi* ในน้ำที่มีความเค็ม 15 และ 30 ppt พบว่า *Lactobacillus acidophilus* ที่ 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง เชื้อแบคทีเรียมีปริมาณลดลงเรื่อยๆ จนกระทั่งที่ 72 ชั่วโมง มีปริมาณแบคทีเรีย ( $2.75 \times 10^2$  CFUs/mL) มากกว่า *L. panthalam* *Pediococcus* sp. *L. pentosus* และ *Vibrio harveyi* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) และเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้สามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่าแบคทีเรียชนิดอื่น ในน้ำที่มีความเค็ม 15 และ 30 ppt และแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิดสามารถเจริญเติบโตในความเค็มที่ 15 ppt ได้ดีกว่า 30 ppt ในขณะที่การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกในน้ำที่เลี้ยงกุ้งกุลาดำระยะโพสลาวา ที่ความเข้มข้นของแบคทีเรียที่  $10^5$  และ  $10^6$  CFUs/mL พบว่าปริมาณของแบคทีเรียลดลงเรื่อยๆ หลังจาก ภายหลังจากใส่เชื้อแบคทีเรียลงไปในน้ำ ซึ่งปริมาณที่พบในชั่วโมงที่ 48 ไม่มีความแตกต่างกัน แบคทีเรียมีปริมาณลดลง ( $5.77 \times 10$  และ  $1.77 \times 10^2$  CFUs/mL) ในชั่วโมงที่ 72 ชนิดของแบคทีเรียที่ลดลงน้อยที่สุด คือ *Pediococcus* sp. ( $2.38 \times 10^2$  CFUs/mL) และ *L. acidophilus* ( $1.57 \times 10^2$  CFUs/mL) ส่วนการเลี้ยงกุ้งกุลาดำโดยเสริมแบคทีเรียโพรไบโอติกในน้ำที่ความเค็ม 5 15 และ 30 ppt พบว่าภายหลังจากที่ใส่เชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกลงไป 6 ชั่วโมง ค่า pH ลดลงทันที (6.67) หลังจากนั้นจึงเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนกระทั่งที่ 48 ชั่วโมง จึงมีค่าใกล้เคียงกับค่า pH เริ่มต้น ส่วนปริมาณของ *L. acidophilus* ซึ่งใช้เป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกลดปริมาณลงเรื่อยๆ จากปริมาณเริ่มต้น แต่ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างความเค็มทั้ง 3 ระดับ ส่วนปริมาณเชื้ออิวริโอโคไลนีสีเหลืองเพิ่มขึ้นเล็กน้อยที่ 6 ชั่วโมง จากนั้นจึงมีปริมาณลดลงไม่มากนักจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลองที่ 72 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบเชื้อยีสต์ด้วย และปริมาณเชื้อแบคทีเรียในลำไส้ของกุ้งพบว่า เป็นแบคทีเรียชนิดเดียวกันกับที่พบในน้ำ และปริมาณเชื้อแต่ละชนิดไม่มีความแตกต่างกันตลอดการทดลอง

## คำนิยม

การทำปัญหาพิเศษครั้งนี้ไม่ได้เกิดจากความสามารถของข้าพเจ้าเพียงผู้เดียว หากแต่ยังมีบุคคลอีกกลุ่มหนึ่งซึ่งเปรียบเสมือนชิ้นส่วนที่มาต่อเติมความตั้งใจจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ดร.นงนุช เลหาะวิสุทธิ อาจารย์ผู้ให้คำปรึกษาและแนะนำสิ่งที่ดีแก่ข้าพเจ้าในทุกๆ เรื่อง รวมทั้งจุดประกายความคิดและความหวัง ดร.พิบูล จิรวาณิชไพศาล แห่งหน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล ผู้ให้โอกาสและสอนเทคนิคต่างๆ ในการทดลอง

ขอขอบคุณคุณคุณชนิษฐา แสงงาม คุณชัยชาญ ไตรศรีศิลป์ แห่งคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย คุณจตุพงษ์ คุณจีรวัดณ์ คุณชัยวัฒน์ และคุณศิริรัตน์ จากคณะสัตวแพทยศาสตร์สำหรับประสบการณ์และคำแนะนำที่ดี หน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเลที่เชื่อเพื่อสถานที่ทำการทดลอง และรถประจำทางสาย ปอ.141 สำหรับการบริการที่นำประทับใจในทุกๆ วันตลอดการทดลอง

ขอขอบคุณคุณศรีสุภาพ พูนลาภเดชาและรัฐพล เอนกผดลิน ผู้ร่วมโครงการ สำหรับความช่วยเหลือต่างๆ อย่างในการทดลองเรียนรู้สิ่งใหม่ๆ ร่วมกัน

ขอขอบคุณเพื่อนๆ ปลาหางนกยูงทุกคนที่ได้มอบกำลังใจและความรู้สึกดีๆ ของความเป็นเพื่อนตลอดช่วง 4 ปีในชีวิตนักศึกษา

ขอขอบคุณญาติสนิทมิตรสหายที่มีกำลังใจให้มาตลอด โดยเฉพาะพลอยและพันธ์

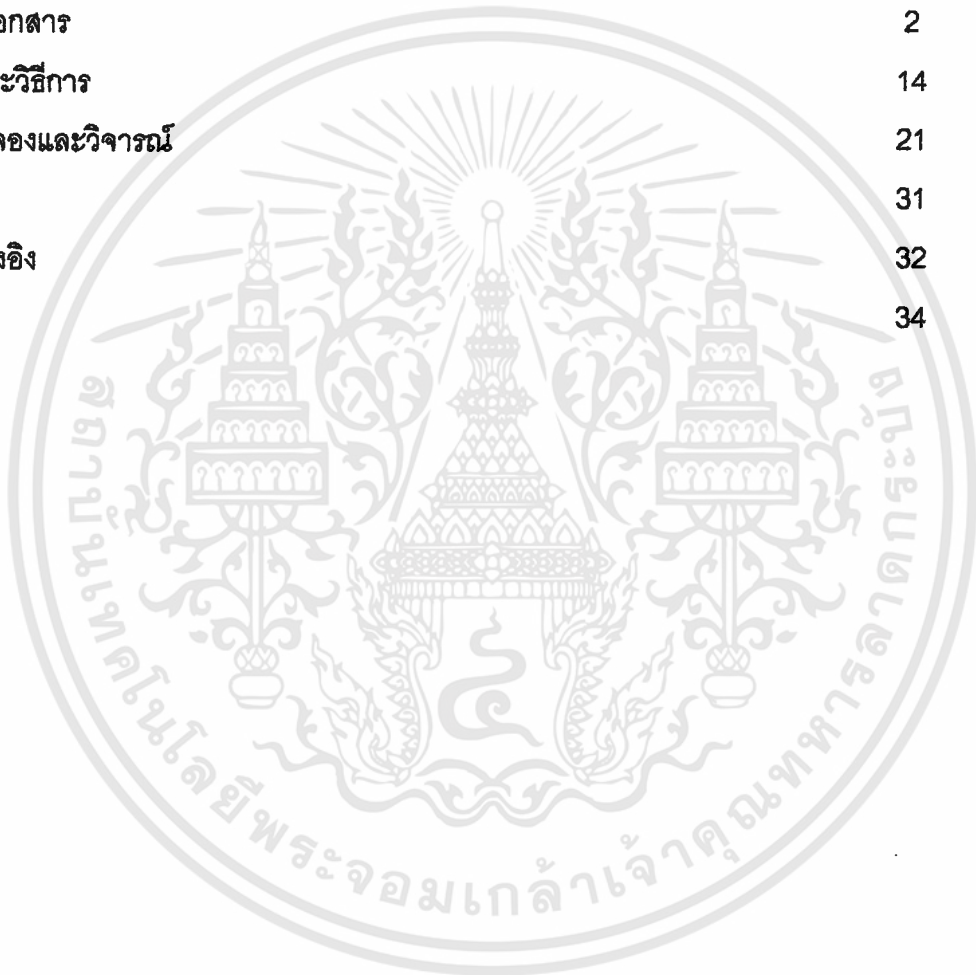
สุดท้ายนี้ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณบิดาและมารดาผู้ให้กำเนิดข้าพเจ้า ได้มอบโอกาสในการเจริญเติบโต การศึกษา และเป็นกำลังใจที่สำคัญที่สุดของชีวิต

นางสาวนุณนุช นำโชควิริยะ

มีนาคม 2545

## สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	I
สารบัญตาราง	II
สารบัญภาพ	III
คำนำ	1
การตรวจเอกสาร	2
อุปกรณ์และวิธีการ	14
ผลการทดลองและวิจารณ์	21
สรุป	31
เอกสารอ้างอิง	32
ภาคผนวก	34



## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	อัตราการรอด (%) ของตัวอ่อนกุ้งในชั่วโมงที่ 48 หลังจากได้รับเชื้อ <i>V. harveyi</i> BPO4 ที่เพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรดเป็นด่างต่างกัน	5
2	ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย (CFUs/mL) แต่ละชนิดที่เลี้ยงในน้ำที่ความเค็ม 15 และ 30 ppt ที่เวลา 0 24 48 72 และ 96 ชั่วโมง	22
3	ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย (CFUs/mL) แต่ละชนิดที่เลี้ยงในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ระยะโพสลาว่าที่มีความเข้มข้นของเชื้อ $10^5$ และ $10^6$ (CFUs/mL) ที่เวลา 0 24 48 และ 72 ชั่วโมง	25
4	ค่าเฉลี่ยปริมาณเชื้อแต่ละชนิด (CFUs/mL) ในน้ำที่เลี้ยงกุ้งกุลาดำเสริม โพรไบโอติกที่เวลาก่อนใส่เชื้อ 0 24 48 และ 72 ชั่วโมง	27
5	ค่าเฉลี่ยปริมาณเชื้อแต่ละชนิด (CFUs/mL) ในลำไส้กุ้งกุลาดำเสริม โพรไบโอติกที่เวลาก่อนใส่เชื้อ 0 24 48 และ 72 ชั่วโมง	29
6	ค่าเฉลี่ย pH ในน้ำที่เลี้ยงกุ้งกุลาดำเสริมโพรไบโอติกที่เวลาก่อนใส่เชื้อ 0 24 48 72 และ 96 ชั่วโมง	30

## สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	เชื้อไวรัสโอที่เรืองแสงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ	4
2	เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโพรไบโอติก	11
3	อัตราการรอดของกุ้งกุลาดำในสภาวะที่ต่างกัน	12
4	อัตราการรอดของกุ้งกุลาดำที่ได้รับโพรไบโอติก 3 ชนิด เป็นเวลา 10 วัน	13
5	แผนผังการทดลองเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในน้ำ	15
6	แผนผังการทดลองเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกในน้ำที่เลี้ยงกุ้งกุลาดำ ระยะโพลลวากา	17
7	แผนผังการทดลองเลี้ยงกุ้งกุลาดำโดยเสริมแบคทีเรียโพรไบโอติก	19
8	ปริมาณเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ ในแต่ละช่วงเวลาที่ความเค็ม (ก) 15 ppt และ (ข) 30 ppt	23
9	ปริมาณเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ ในแต่ละช่วงเวลาที่ความเข้มข้น (ก) $10^5$ CFUs/mL และ (ข) $10^6$ CFUs/mL	26
10	ค่า pH ของน้ำที่เลี้ยงกุ้งกุลาดำที่เปลี่ยนแปลงในแต่ละช่วงเวลา	30

## คำนำ

โรคแบคทีเรียเรืองแสงในกุ้งกุลาดำ นับว่าเป็นปัญหาใหญ่ในฟาร์มเลี้ยงกุ้งทั้งในและต่างประเทศ โดยเฉพาะแถบภูมิภาคอาเซียน (ลีลา, 2541) จึงมีผู้ทำการศึกษาหาวิธีการที่ดีที่สุดในการป้องกันและควบคุมโรค เช่น การใช้ยาปฏิชีวนะ การใช้ยาฆ่าเชื้อในน้ำ การใช้น้ำตาลทราย เป็นต้น วิธีการเหล่านี้เป็นวิธีที่ใช้กันมานานซึ่งมีทั้งข้อดีและข้อเสียแตกต่างกันไป และต่อมาเริ่มมีการนำจุลินทรีย์กลุ่มที่สร้างกรด (Lactic acid bacteria) ซึ่งมีการใช้เป็นโพรไบโอติกในคน สัตว์ใหญ่ รวมทั้งสัตว์ปีกมาเป็นเวลานาน (พิกุล, 2543) เพื่อเป็นโพรไบโอติกในกุ้งก็เป็นอีกวิธีหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการแพร่ระบาดของโรคและมีการใช้ในบ่อเลี้ยงกุ้งกันมากขึ้น (กิจการ, 2540) แต่เนื่องจากโพรไบโอติกเป็นสิ่งมีชีวิต ดังนั้นปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อมจึงเป็นสิ่งสำคัญที่ควรคำนึงถึง เพราะมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ เช่น อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) และความเค็ม เป็นต้น

การเลี้ยงสัตว์น้ำโดยเฉพาะกุ้งนั้นมียุคภัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตมากมาย ประกอบกับในปัจจุบันมีการเลี้ยงกุ้งที่ความเค็มต่างๆ กันตั้งแต่ 3-35 ส่วนในพัน (ppt) ในแต่ละพื้นที่ ดังนั้น การศึกษาผลกระทบของความเค็มต่อประสิทธิภาพของ Lactic acid bacteria ที่ใช้จึงมีความสำคัญมาก เพราะหากเราสามารถทราบถึงระดับความเค็มที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อโพรไบโอติกและเชื้อที่ก่อโรคได้ ก็จะช่วยให้การควบคุมโรคและการจัดการบ่อได้ผลดี

### วัตถุประสงค์

1. ศึกษาระยะเวลาที่เชื้อ Lactic acid bacteria ชนิดต่างๆ และเชื้อ *Vibrio harveyi* ที่สามารถเจริญเติบโตอยู่ในน้ำที่ระดับความเค็ม 15 และ 30 ส่วนในพัน
2. ศึกษาปริมาณเชื้อ Lactic acid bacteria ชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น  $10^5$  และ  $10^6$  โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในน้ำที่เลี้ยงลูกกุ้งกุลาดำที่ระดับความเค็ม 30 ส่วนในพัน
3. ศึกษาปริมาณเชื้อ Lactic acid bacteria และเชื้อไวรัส ในลำไส้กุ้งและในน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งกุลาดำ ที่ระดับความเค็ม 5 15 และ 30 ส่วนในพัน

## การตรวจเอกสาร

### แบคทีเรียในลำไส้กึ่งอุตสาหกรรม

แบคทีเรียประจำถิ่นมีความสำคัญต่อทางเดินภายในลำไส้และสุขภาพที่ดี การที่สัตว์น้ำต้องสัมผัสกับน้ำอยู่ตลอดเวลา ความหลากหลายของชนิดและจำนวนของแบคทีเรียภายในลำไส้จึงขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของแบคทีเรียในแหล่งน้ำที่สัตว์น้ำนั้นอาศัยอยู่ (พิกุล, 2543) ความสมดุลระหว่างแบคทีเรียประจำถิ่นที่เป็นประโยชน์และแบคทีเรียที่ก่อโรค เป็นสิ่งที่มีความสำคัญ มีการแข่งขันระหว่างแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในทางเดินอาหาร แต่ส่วนใหญ่เชื้อโรคจะเพิ่มจำนวนได้เร็วกว่า ตัวอย่างเช่น เชื้อ *E. coli* สามารถเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่า ทุกๆ 15 นาทีภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ในขณะที่ *Lactobacillus* ต้องใช้เวลา 20 นาที (Shivappa, 1997) สำหรับแบคทีเรียที่พบมากภายในลำไส้กึ่งอุตสาหกรรมนั้นส่วนใหญ่เป็นไวรัส โดยจะพบมากในลำไส้ช่วงต่อจากกระเพาะจนถึงปล้องที่ 5 จะมีแบคทีเรียไวรัสอยู่  $10^5 - 10^6$  โคโลนีต่อ ลำไส้ 1 กรัม ส่วนลำไส้ช่วงปล้องที่ 6 จนถึงช่องทวารพบว่ามีไวรัสอยู่เป็นจำนวนมาก ประมาณ  $10^6 - 10^7$  โคโลนีต่อ ลำไส้ 1 กรัม แต่ลำไส้ของปล้องที่ 6 นี้ที่ผนังลำไส้จะมีคิวติเคิลที่ไม่มีแคลเซียมเป็นองค์ประกอบเคลือบอยู่ซึ่งจะมีการลอกหลุดไประหว่างที่มีการลอกคราบ จึงเป็นการลดจำนวนแบคทีเรียในส่วนนี้ได้ชื่อระดับหนึ่ง ซึ่งไวรัสจะเป็นแบคทีเรียกลุ่มหนึ่งที่ทำหน้าที่เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นภายในลำไส้กึ่งอุตสาหกรรมที่แข็งแรงดี แต่เมื่อใดก็ตามที่กุ้งมีความเครียดหรืออ่อนแอ แบคทีเรียกลุ่มไวรัสเหล่านี้ อาจมีการเพิ่มจำนวนและความรุนแรงก่อให้เกิดโรคขึ้นได้ หรืออาจมีส่วนไปช่วยเสริมไวรัสในกลุ่มที่ก่อโรคให้มีความรุนแรงยิ่งขึ้น (พิกุล, 2543)

### สาเหตุของโรคเรืองแสงในกุ้งอุตสาหกรรม

แบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคเรืองแสงพบได้ทั่วไปในน้ำทะเลตามชายฝั่งตลอดจนบริเวณปากแม่น้ำ และแม้กระทั่งในน้ำและดินก้นบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำทั้งกุ้งทะเลและปลาน้ำจืด เนื่องจากมีสภาพที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโต (ลีลา, 2541) แบคทีเรียที่ก่อโรคที่พบได้ทั่วไปในน้ำทะเลทั้งในประเทศและต่างประเทศ แบ่งได้เป็น 2 สกุล คือ *Vibrio* และ *Photobacterium* (ไม่ปรากฏชื่อผู้แต่ง ก, 2541) ในกลุ่ม *Vibrio* มีหลายชนิดที่พบ คือ *V. harveyi*, *V. fisheri*, *V. orientalis*, *V. splendidus*, *V. logei*, *V. mediterranei*. และ *V. albensis* ส่วนกลุ่ม *Photobacterium* ประกอบด้วย *P. leiognathai* และ *P. phosphoreum* ซึ่งแบคทีเรียทั้ง 2 กลุ่มนี้ที่พบในแหล่งเลี้ยงกุ้งอุตสาหกรรมของประเทศไทยมี 4 ชนิด โดยชนิดที่พบมากที่สุดคือ *V. harveyi* รองลงมาได้แก่ *V. fisheri*, *V. cholerae*, biotype *albensis* และ *P. leiognathai* (ลีลา, 2541) *V. harveyi* เป็นแบคทีเรียชนิดแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อนโค้งสั้นๆ ขนาดเซลล์ 1.5-4.0  $\mu\text{m}$ . เคลื่อนที่ได้ด้วยหาง

(Flagella) ไม่สร้างสปอร์ และไม่สร้างซีสต์ (Cyst) เจริญเติบโตได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 20-30 องศาเซลเซียส (°C) ค่า pH อยู่ในช่วง 7-9 ในน้ำที่มีความเค็มระหว่าง 10-40 ppt ต้องการสารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอน (Carbon source) สามารถเจริญได้ทั้งสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน นอกจากนี้ยังมีลักษณะเด่น คือ เชื้อนี้สามารถให้แสงสีเขียวแกมเหลืองออกมา โดยปฏิกิริยาทางเคมีที่เกิดจากเอนไซม์ลูซิเฟอเรสทำให้เรืองแสงได้ในที่มืด (ฝ่ายวิชาการและพัฒนาผลิตภัณฑ์ บ. เกรทเทอร์ เวท จก., 2542)

ในธรรมชาติหรือโรงเพาะฟัก จะพบไวรัสโรคอาศัยปะปนในลำไส้ของแม่กุ้งและเกิดการแพร่กระจายเมื่อแม่กุ้งปลดปล่อยไข่ออกมาเชื้อจึงติดออกมากับไข่ด้วย การติดเชื้อจะเกิดขึ้นได้ในลูกกุ้งวัยอ่อนทุกระยะ เริ่มตั้งแต่ระยะซูลเลีย (Zoea) ไมซีส (Mysis) และโพสลาวา (Postlarvae) (Prayitno and Latchford, 1995)

### การเรืองแสงในแบคทีเรีย

การเรืองแสงในแบคทีเรียเกิดจากการเร่งปฏิกิริยาเรืองแสงทางชีวภาพ โดยมีเอนไซม์ลูซิเฟอเรสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาออกซิไดซ์ของการรีดิวซ์ flavin mononucleotide (FMNH<sub>2</sub>) และ long chain aldehyde โดยโมเลกุลของ O<sub>2</sub> โดยมีปัจจัยที่สำคัญและจำเป็นต่อการเรืองแสงของแบคทีเรียคือ FMNH<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> aldehyde และเอนไซม์ลูซิเฟอเรส (Luciferase) (ฝ่ายวิชาการและพัฒนาผลิตภัณฑ์ บ. เกรทเทอร์ เวท จก., 2542)

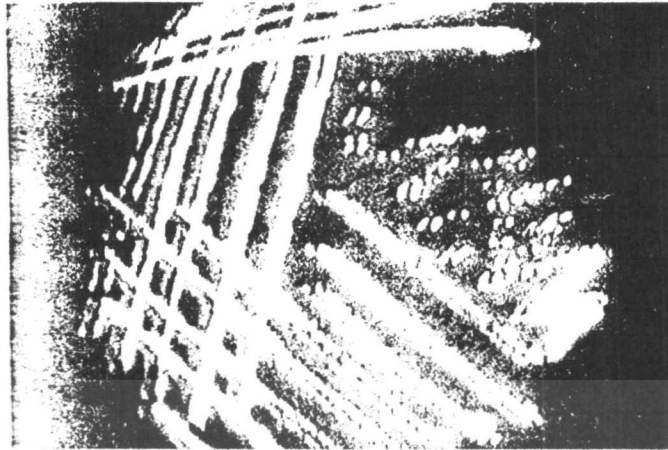
ปฏิกิริยาการเรืองแสงโดยวิธีการทางเคมี สามารถเขียนเป็นโคอะแกรมได้ดังนี้



จะไม่มี การเปลี่ยนแปลงรูปแบบปฏิกิริยาเนื่องจากเป็นปฏิกิริยาแบบทั่วไปของการเรืองแสง ในด้านรวมนี้มีส่วนคล้ายกับปฏิกิริยาการเรืองแสงของเอนไซม์ลูซิเฟอเรสในหิ่งห้อย (ฝ่ายวิชาการและพัฒนาผลิตภัณฑ์ บ. เกรทเทอร์ เวท จก., 2542) ดังนั้น ถ้าน้ำหรือตัวกุ้งมีแบคทีเรียชนิดนี้อยู่มาก ก็ จะเห็นการเรืองแสงในน้ำหรือพรายน้ำในเวลาากลางคืน และจะเห็นกุ้งที่ว่ายน้ำอยู่มีแสงเรืองๆ อยู่บริเวณหัวกุ้ง ซึ่งเกิดจากการเรืองแสงของเชื้อ *Vibrio* ในตับ (Hepatopancreas)

### การเกิดโรคเรืองแสงในกุ้งกุลาดำ

กุ้งที่แข็งแรง เชื้อ *V. harveyi* ที่เข้าสู่ตัวกุ้งจะถูกทำลาย เพราะกุ้งมีกลไกป้องกันตัวเองในระดับหนึ่ง โดยกุ้งจะมีการหดตัวของกล้ามเนื้อลำไส้เป็นลักษณะลูกคลื่น (Peristalsis) เพื่อขจัด



ภาพที่ 1 เชื้อไวรัสที่เรียงแสงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ที่มา : ฝ่ายวิชาการและพัฒนาผลิตภัณฑ์ บ. เกรทเทอร์ เวท จก. (2542)

แบคทีเรียออกจากทางเดินอาหาร ทำให้ลดโอกาสการเกาะติดของเชื้อโรคต่อเซลล์ผนังลำไส้ได้อีกวิธีหนึ่ง หรืออาจถูกพาออกจากลำไส้พร้อมกับเยื่อต่างๆ ที่หุ้มผนังลำไส้ (Peritrophic membrane) หรือขณะที่เชื้อกำลังทำลายเซลล์ผนังลำไส้อยู่นั้น ฮีโมไซต์หรือเม็ดเลือดจากกระแสเลือดจะมาเรียงรายเป็นชั้นๆ ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่อยู่ภายใต้เซลล์ผนังลำไส้ เพื่อคอยจับกินเชื้อโรคและกันไม่ให้เชื้อบุกรุกเข้าสู่กระแสเลือดได้ ถ้าหากเชืโรคนั้นทำลายเฉพาะเซลล์เยื่อผนังลำไส้ ก็อาจเพียงทำให้ลำไส้สูญเสียหน้าที่ในการดูดซึมอาหารและทำให้กุ้งไม่โตเท่าที่ควร แต่ถ้าเชื้อในน้ำมีปริมาณมากขึ้นหรือกุ้งไม่แข็งแรง เชื้อก็จะรอดพ้นจากกระบวนการป้องกันตัวเองของกุ้ง และไปแบ่งตัวเพิ่มจำนวนในตับ (บุญเสริม, 2542)

เนื่องจากตับกุ้งเป็นอวัยวะที่สร้างน้ำย่อยสำหรับย่อยอาหาร และสะสมอาหารที่ย่อยแล้ว เมื่อตับอักเสบก็จะทำให้การย่อยอาหารไม่เป็นปกติและอาหารที่สะสมไว้ก็จะน้อยลง โดยจะพบว่าทางเดินอาหารและเนื้อเยื่อมีความผิดปกติ (Rengpipat et al., 1998) เนื่องจากเชื้อที่ตับจะแพร่กระจายออกไปตามช่องลำตัวและในกระแสเลือด เป็นผลให้เกิดการติดเชื้อในเลือด (Septicemia) อาการที่พบเห็นได้ คือ กุ้งที่ป่วยจะว่ายน้ำขึ้นมาเกยตามขอบบ่อหรือว่ายน้ำที่ผิวน้ำ โดยไม่มีทิศทางหรือว่ายน้ำผิดปกติ ลักษณะที่พบจะเห็นเปลือกและลำตัวจะมีสีเข้ม สกปรก กล้ามเนื้อชून ตับฝ่อเล็กลง และเรียงแสงในเวลากลางคืน จากนั้นกุ้งก็จะเริ่มอ่อนแอและตายในที่สุด

### ปัจจัยที่มีผลต่อการระบาดและความรุนแรงของโรค

เนื่องจากกุ้งเป็นสัตว์ที่ดำรงชีวิตในน้ำและเชื้อไวรัสโอกัแพร่ระบาดทางน้ำเช่นกัน ปัจจัยที่มีผลต่อความรุนแรงของโรคจึงขึ้นอยู่กับปัจจัยภายในตัวกุ้งและปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม คือ คุณภาพ

น้ำไม่เค็ม สารพิษ การติดเชื้อ สิ่งเหล่านี้จะทำให้กุ้งเกิดความเครียดและทำให้ภูมิคุ้มกันในกุ้งลดลง (กิจการ, 2542) ดังนั้นคุณภาพน้ำจึงเป็นสิ่งที่มีความสำคัญต่อสุขภาพของกุ้งมาก ได้แก่

### 1. อุณหภูมิ

เชื้อไวรัสโธสามารถเจริญได้ดีในน้ำที่มีอุณหภูมิช่วงกว้าง 20-30 °C และจะแบ่งตัวได้รวดเร็วเมื่ออุณหภูมิของน้ำสูงขึ้น ซึ่งทำให้สารอินทรีย์มีความเข้มข้นมากขึ้นด้วย จึงมักพบการระบาดของโรคนี้ในฤดูแล้ง (ลิลลา, 2541) ทั้งฤดูร้อน (บุญเสริม, 2542) และฤดูหนาว แต่จากการทดลองของ Shivappa (1997) พบว่าปัจจัยด้านอุณหภูมิมิมีผลน้อยมากต่อความรุนแรงของเชื้อ *V. harveyi*

### 2. ความเค็ม

เชื้อไวรัสโธสามารถอยู่ในน้ำที่มีความเค็มได้เป็นช่วงกว้าง (10-40 ppt) แต่พบว่าในน้ำที่มีความเค็มต่ำจะทำให้โรคมีความรุนแรงลดลง (ไม่ปรากฏชื่อผู้แต่ง ก, 2541) โดยที่ความเค็ม 5 ppt เชื้อจะตายหมดภายในเวลา 18 ชั่วโมง ส่วนความเค็ม 10 ppt แบคทีเรียจะมีปริมาณลดต่ำลงจากปริมาณที่มีอยู่ในน้ำเค็ม 25 ppt 3-4 เท่า ภายในเวลา 3-4 ชั่วโมง แต่หลังจากนั้นก็จะมีปริมาณขึ้นมาเท่าเดิม และที่ความเค็ม 0 ppt เชื้อจะตายหมดภายในเวลา 1 ชั่วโมง

### 3. ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH)

Prayitno and Latchford (1995) ทำการทดลอง ให้กุ้งในระยะต่างๆ ได้รับเชื้อ *V. harveyi* พบว่า อายุของตัวอ่อนเป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งที่มีผลต่ออัตราการรอดชีวิตของกุ้ง โดยกุ้งที่ระยะ zoea-1 มีเพียง 25% เท่านั้นที่มีชีวิตรอดจนถึง 48 ชั่วโมง ในขณะที่ระยะ postlavae 4-5 มีอัตราการรอด 55% ผลที่ได้นี้อาจเป็นการบอกถึงการที่กุ้งที่อายุมากกว่า จะมีการพัฒนาความสามารถในการต้านทานโรคได้มากขึ้น

ตารางที่ 1 อัตรารอด (%) ของตัวอ่อนกุ้งในชั่วโมงที่ 48 หลังจากได้รับเชื้อ *V. harveyi* BP04 ที่เพาะ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรดเป็นด่างต่างกัน

ระยะของตัวอ่อน	ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง			
	5.5	6.0	7.2	9.0
Zoea 1-2	56.00	33.00	33.25	33.50
Zoea 2-3	55.75	33.25	40.80	41.75
Mysis 2	58.75	43.75	37.50	53.13
Mysis 3	55.63	40.00	43.75	45.63

ที่มา : Prayitno, S. B. and Latchford, J. W. (1995)

ปกติเชื้อไวรัสจะเติบโตได้ดีที่ pH 7-9 ซึ่งเป็นช่วงที่พบในบ่อเลี้ยงทั่วไป แต่เมื่อ pH ลดลงถึง 5.5 เชื้อจะมีการระบาดเพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับที่ pH 6.0 โดยที่ยังไม่อาจทราบถึงกลไกที่เพิ่มความรุนแรงของเชื้อได้ (Prayitno and Latchford, 1995)

#### 4. สารอินทรีย์

การสะสมสารอินทรีย์ในบ่อกึ่งเกิดจากสาเหตุ เช่น การตายของสิ่งมีชีวิตในน้ำ อาหารกุ้งที่เหลือ ของเสียที่กึ่งปล่อยออกมาโดยเฉพาะที่พื้นก้นบ่อ (Shivappa, 1997) หากในบ่อมีปริมาณสารอินทรีย์มากก็จะทำให้เชื้อไวรัสเจริญดีเนื่องมาจากการใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอน จึงมักพบว่าโรคนี้จะระบาดในช่วงเดือนที่ 3 หรือ 4 ของการเลี้ยง ซึ่งเป็นช่วงที่มีตะกอนสะสมที่ก้นบ่อมาก (บุญเสริม, 2542)

#### การป้องกันและควบคุมโรคเรืองแสง

เนื่องจากการเกิดโรคมีสาเหตุจากการติดเชื้อแบคทีเรียในน้ำ การควบคุมเชื้อและคุณภาพน้ำจึงเป็นวิธีจัดการกับปัญหาที่สาเหตุ ซึ่งการป้องกันไว้ก่อนย่อมดีกว่ามาแก้ไขหรือรักษากันภายหลังจากเกิดปัญหาแล้ว การจัดการสามารถทำได้หลายวิธี ดังนี้

##### 1. การปรับความเค็ม

การเลี้ยงเชื้อ *V. harveyi* ที่ความเค็มต่างๆ ตั้งแต่ 0-40 ppt พบว่า ที่ความเค็มต่ำประมาณ 0-2 ppt เชื้อไม่สามารถเจริญได้เลย โดยช่วงที่เชื้อเจริญได้ดีที่สุดอยู่ระหว่าง 20-30 ppt และนอกจากนี้ยังพบว่า pH ก็มีผลต่อความรุนแรงของเชื้อเช่นกัน (ไม่ปรากฏชื่อผู้แต่ง ก, 2541) แต่ในบางพื้นที่ที่ไม่มีแหล่งน้ำความเค็มต่ำ วิธีนี้ก็อาจไม่เกิดประโยชน์ นอกจากจะมีบ่อพักน้ำที่เก็บกักน้ำจืดไว้ที่สามารถเติมลงในบ่อเลี้ยงได้ ในบางแห่งอาจใช้วิธีชูดบ่อน้ำบาดาลที่เป็นน้ำจืด เติรมไว้สำหรับเติมลงในบ่อเลี้ยง ซึ่งวิธีนี้ก็ใช้ได้เช่นกัน (บุญเสริม, 2542)

##### 2. การใช้สารเคมีฆ่าเชื้อที่ปะปนมากับน้ำ

การใช้ยาฆ่าเชื้อกันทั่วไปเพื่อลดจำนวนเชื้อไวรัสในน้ำ ซึ่งสารเคมีที่เป็นที่ยอมรับว่าใช้ได้ดี ได้แก่ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ คลอรีนทั้งแบบผงและน้ำ ฟอรัมาลิน 25-50 ส่วนในล้าน (ppm) แต่ต้องระวังเรื่องปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (DO) ที่จะลดลง ส่วนสารเคมีอื่นที่สามารถใช้ได้คือ ได้แก่ เบนซิลโคเนียมคลอไรด์ (Benzalkonium chloride, BKC) 1-2 ppm และต่างหับทิม 4-5 ppm แต่ทั้งหมดจะใช้ได้ผลในระยะสั้นเท่านั้น เมื่อหมดฤทธิ์ยาเชื้อก็จะกลับมาเจริญเพิ่มจำนวนอีก และอาจทำให้เกิดการพัฒนาของเชื้อสายพันธุ์ใหม่ๆ อีกด้วย ดังนั้น หลังจากใช้สารเคมีฆ่าเชื้อแล้วควรตามด้วยน้ำตาลทรายและจุลินทรีย์ที่ดี (ไม่ปรากฏชื่อผู้แต่ง ก, 2541)

### 3. การใช้น้ำตาลทราย

มีการพบโคไลนัสของแบคทีเรีย *V. harveyi* จากการเพาะเชื้อบนอาหาร Thiosulphate-Citrate-Bile-Sucrose Agar (TCBS) โดยโคไลนัสแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ สีเขียว และ สีเหลือง เป็นที่ยอมรับกันว่าโคไลนัสสีเหลืองเป็นไวรัสที่ก่อโทษต่อกุ้งน้อยกว่าไวรัสสีเขียว การเติมน้ำตาลทรายจึงเป็นการเพิ่มอาหารให้ ไวรัสสีเหลืองนำไปใช้มากขึ้น เมื่อโคไลนัสสีเหลืองเพิ่มจำนวนก็จะแย่งพื้นที่ แย่งอาหารทำให้โคไลนัสสีเขียวลดลง เมื่อจุลินทรีย์ย่อยสลายน้ำตาลทรายก็จะปล่อยกรดออกมา ทำให้ pH ลดลง แต่ต้องระวังค่า DO ที่จะลดลงอันเนื่องมาจากจุลินทรีย์ใช้ออกซิเจนมากขึ้นด้วย (ฝ่ายวิชาการและพัฒนาผลิตภัณฑ์ บ. เกรทเทอร์ เวท จก., 2542; ไม่ปรากฏชื่อผู้แต่ง ก, 2541)

### 4. การใช้จุลินทรีย์บำบัดน้ำและพื้นบ่อ

การใช้จุลินทรีย์พวก nitrobacter และ nitrosomonas ในการเตรียมน้ำ บำบัดน้ำและพื้นบ่อสม่ำเสมอ จะช่วยลดของเสียที่เป็นพวกสารอินทรีย์ในน้ำ เช่น อาหารกุ้งที่เหลือ เชลล์สาหร่ายที่ตายและที่กุ้ง เป็นต้น ซึ่งในบ่อที่มีของเสียมากจะทำให้มีปัญหาตามมา เช่น ไวรัสเพิ่มขึ้น ค่าแอมเนีย ( $\text{NH}_3$ ) สูงขึ้น ค่าไนไตรท์ ( $\text{NO}_2$ ) สูงขึ้น (ไม่ปรากฏชื่อผู้แต่ง ข, 2541) การใช้จุลินทรีย์จึงเป็นการช่วยย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำ ช่วยลดจำนวนไวรัส และช่วยให้คุณภาพน้ำดีขึ้นด้วย

### 5. การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติก

การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกเมื่อผสมกับอาหารให้กุ้งกินเข้าไป จะมีบทบาทในการช่วยย่อยอาหารและแย่งอาหารกับไวรัสที่ก่อโรคไม่ให้เกาะในลำไส้กุ้งได้ นอกจากนี้ยังมีความสามารถสร้างสารยับยั้งการทำงานของ *V. harveyi* ได้อีกด้วย (ฝ่ายวิชาการและพัฒนาผลิตภัณฑ์ บ. เกรทเทอร์ เวท จก., 2542)

### 6. การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันโดยใช้วัคซีน

การใช้วัคซีนเป็นอีกหนึ่งวิธีที่มีการนำมาใช้มากขึ้น วัคซีนคือการนำเอาเชื้อโรคหรือบางส่วนของเชื้อโรคมาปรับแต่งให้หมดสภาพการทำให้เกิดโรค และเมื่อนำกลับมาใส่ในตัวสิ่งมีชีวิตแล้วสามารถกระตุ้นให้เกิดความต้านทานโรค (ไม่ปรากฏชื่อผู้แต่ง ข, 2541) ส่วนความเป็นไปได้ของการนำมาใช้ในกุ้งกุลาดำ เนื่องจากกุ้งจะไม่มีระบบภูมิคุ้มกันแบบแอนติบอดี (Antibody) แต่มีกลไกการต่อต้านเชื้อโรคได้โดยที่เซลล์เม็ดเลือด (Haematocyte) จะมีกระบวนการกินและทำลาย (Phagocytosis) สิ่งแปลกปลอมได้โดยตรง เมื่อกุ้งเป็นโรคโดยการติดเชื้อแบคทีเรีย ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดจะสูงขึ้นซึ่งแสดงถึงการเพิ่มกลไกในการต่อสู้ (บุญเดริม, 2542)

มีการทดลองให้กุ้งได้รับเชื้อ *V. harveyi* ที่ตายแล้ว ปริมาณของเซลล์เม็ดเลือดเพิ่มขึ้นเป็น 3 เท่าของระดับปกติโดยที่กุ้งไม่ต้องเสี่ยงกับการติดเชื้อเลย เพราะเป็นเชื้อที่ตายแล้ว และยังสามารถต่อต้านเชื้อ *V. harveyi* ที่มารุกรานภายหลังได้อีกด้วย เชื้อแบคทีเรียในตับจะน้อยลง 4-8

เท่า ของกุ้งที่ไม่ได้รับวัคซีน นอกจากนี้ยังพบว่า กุ้งที่ได้รับการฉีดวัคซีนเป็นเวลา 1 เดือนและนำไปแช่ในเชื้อ *V. harveyi* ที่เรียกว่าการทดสอบด้วยวิธีท้าทาย (Challenge) มีจำนวนกุ้งที่เหลือรอดชีวิตในแต่ละวันมากกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้น (บุญเสริม, 2542)

#### 7. การใช้อาหารเสริมและ/หรือวิตามินเสริม

การเสริมวิตามินในช่วงที่กุ้งเครียด โดยผสมอาหารให้กุ้งกินเป็นประจำจะช่วยให้กุ้งมีสุขภาพดี ไม่อ่อนแอ แข็งแรง ลอกคราบได้ดี การเสริมวิตามินซี และวิตามินอี มีส่วนช่วยให้สัตว์น้ำมีภูมิคุ้มกันสูงขึ้น การใช้สารภูมิคุ้มกันจะกระตุ้นให้กุ้งสร้างภูมิคุ้มกันได้มากขึ้นในขบวนการ phagocytosis แต่เนื่องจากระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งมีแคระยะสั้น ดังนั้นจึงต้องมีการใช้สารกระตุ้นเป็นประจำจึงจะได้ผลดี (ไม่ปรากฏชื่อผู้แต่ง ก, 2541)

#### 8. การให้ยาปฏิชีวนะ

การให้ยาปฏิชีวนะเพื่อป้องกัน (Prophylaxis) หรือรักษา (Treatment) เมื่อเกิดการติดเชื้อต้องเลือกยาที่ให้ผลดีที่สุดเพียงชนิดเดียว และต้องตรวจสอบความไวของเชื้อกับยาชนิดต่างๆ ก่อน เนื่องจากการให้ยาแบบไม่ถูกวิธีหรือไม่ถูกขนาดจะทำให้เชื้อดื้อยา และทำให้มีความรุนแรงมากขึ้น ซึ่งยากต่อการควบคุม ถึงแม้ว่าในทางทฤษฎี การให้ยาปฏิชีวนะจะช่วยรักษาได้ แต่เมื่อกุ้งในบ่อติดเชื้อแล้ว ก็เป็นการบ่งบอกว่าจะต้องมีแหล่งเพาะเชื้อในบ่อนั้นแล้ว และเชื้อจะแบ่งตัวเพิ่มจำนวนตลอดเวลา ดังนั้น การให้ยาปฏิชีวนะจะได้ผลก็ต่อเมื่อแหล่งของการเพาะเชื้อถูกกำจัดออกไปด้วย (บุญเสริม, 2542)

#### 9. ควบคุมปริมาณแพลงก์ตอนพืชในบ่อกุ้งให้พอเหมาะ

แพลงก์ตอนจำพวกสาหร่ายสีเขียวชนิดคลอเรลลา (*Chlorella* sp.) สามารถสร้างสารที่ทำลายแบคทีเรีย *V. harveyi* ได้ (ไม่ปรากฏชื่อผู้แต่ง ก, 2541) ถ้าในบ่อกุ้งเกิดคลอเรลลาได้ตลอดเวลาโอกาสที่จะเกิดโรคเรืองแสงก็จะน้อยลง นอกจากนี้ยังมีการใช้สารสกัดจากสาหร่าย *Skeletonema* สำหรับใช้ฆ่าเชื้อแบคทีเรียในโรงเพาะฟัก (พิกุล, 2543) แต่การควบคุมปริมาณและชนิดของแพลงก์ตอนมีองค์ประกอบมากมายและสลับซับซ้อนในระบบนิเวศที่เกี่ยวข้องกับการเกิดและตายของแพลงก์ตอน ซึ่งปัจจุบันมีทั้งการใช้สารเคมีและการใช้ระบบชีวภาพในการควบคุม

#### 10. การจัดการบ่อที่ดีและการปล่อยกุ้งให้บางลง

การปล่อยกุ้งหนาแน่นเกินไป (>60 ตัว/ตารางเมตร) ก็มักจะเกิดการให้อาหารมากเกินไป ดังนั้นของเสียจึงเพิ่มขึ้นมาก ส่งผลทำให้แพลงก์ตอนหนาแน่น ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (DO) ต่ำ อาจทำให้น้ำเสีย ก้นบ่อเน่า กุ้งไม่แข็งแรง จึงง่ายต่อการติดเชื้อโรคต่างๆ ดังนั้นจึงควรปล่อยกุ้งให้บางลง (25-30 ตัว/ตารางเมตร) (ไม่ปรากฏชื่อผู้แต่ง ก, 2541) นอกจากนี้ยังต้องมีการตรวจสอบคุณภาพน้ำและสุขภาพกุ้ง โดยเช็คเชื้อในน้ำและดับกุ้งเป็นประจำ

## ความหมายของโพรไบโอติก (Probiotic)

ก่อนที่จะมีการนำโพรไบโอติกมาใช้ในสัตว์น้ำนั้น ได้มีการใช้ในคน สัตว์ใหญ่ รวมทั้งสัตว์ปีกมาก่อน ส่วนคำจำกัดความของคำว่า โพรไบโอติก มีผู้กล่าวไว้มากมาย โดยเริ่มจาก Lilly และ Stillwell ในปี 1965 ได้หมายถึง สารที่ผลิตขึ้นจากจุลินทรีย์และส่งเสริมให้สัตว์มีการเจริญเติบโตที่ดี ต่อมา ในปี 1974 Parker ได้ให้ความหมายว่า เป็นสิ่งมีชีวิตหรือสารใดก็ตามที่มีประโยชน์ต่อสัตว์ โดยไปมีผลกับจุลินทรีย์ที่พบตามปกติในลำไส้ จากนั้น ปี 1985 Fuller ได้จำกัดความหมายเฉพาะลงไปว่า เป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่เติมลงไปในอาหาร แล้วไปปรับสมดุลของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ภายในลำไส้ของเจ้าบ้าน หลังจากนั้น ในปี 1992 Havenaar และ Veid ได้ขยายคำจำกัดความของโพรไบโอติกว่า จะต้องประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่มีชีวิต ซึ่งอาจมีเพียงชนิดเดียว หรือเป็นส่วนผสมของจุลินทรีย์หลายชนิด ที่สามารถไปปรับปรุงคุณสมบัติของจุลินทรีย์ดั้งเดิมที่อาศัยอยู่ในลำไส้ของสัตว์นั้น ต่อมาในปี 1998 Moriarty ได้ให้ความหมายไว้ว่า เป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่เติมลงในน้ำ (water additives) แล้วสามารถที่จะไปปรับสภาพของสิ่งแวดล้อมในบ่อให้ดีขึ้นด้วย แต่ Gatesoupe (1999) ได้เสนอว่าความหมายนี้ไม่ตรงกับที่มีผู้กล่าวเอาไว้ก่อนหน้านี้ จึงได้เสนอว่า โพรไบโอติก ควรเป็นเซลล์ของจุลินทรีย์ที่เติมลงไปโดยวิธีใดๆ แล้วสามารถเข้าไปอยู่ในลำไส้ของเจ้าบ้านและสิ่งมีชีวิตได้ เพื่อพร้อมที่จะไปปรับปรุงสุขภาพของเจ้าบ้านนั้นให้ดีขึ้น (พิบูล, 2543; Gatesoupe, 1999)

## แบคทีเรียที่ใช้เป็นโพรไบโอติกในสัตว์น้ำ

การจะเลือกแบคทีเรียมาใช้เป็นโพรไบโอติกนั้น จำเป็นต้องทราบคุณสมบัติและชนิดที่เหมาะสมก่อนจะนำมาใช้ ดังนี้

1. คุณสมบัติของแบคทีเรียที่เหมาะสม Gatesoupe (1999) ได้รวบรวมไว้ดังนี้

1.1 มีความสามารถในการต่อต้านแบคทีเรียก่อโรคในหลอดทดลอง

1.2 มีความสามารถในการยึดเกาะลำไส้ได้ หรือสามารถอยู่ในลำไส้ได้ชั่วระยะเวลาหนึ่ง

1.3 มีความสามารถในการเพิ่มความต้านทานโรคให้กับเจ้าบ้าน โดยยืนยันทดสอบการ

ต้านทานโรคด้วยวิธีท้าทาย (Challenge test)

1.4 มีความสามารถในการแข่งขันหรือแย่งพื้นที่กับแบคทีเรียก่อโรคและสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้

อย่างไรก็ตาม สำหรับคุณสมบัติในการผลิตหรือไม่ผลิตสารยับยั้งในหลอดทดลองนั้น ไม่ใช่คุณสมบัติที่จะนำมาใช้ในการคัดเลือกแบคทีเรียเพื่อเป็นโพรไบโอติกได้เสมอไป เพราะสารยับยั้งเหล่านี้มีหลายประเภท ซึ่งการสร้างสารยับยั้งแต่ละชนิด จะขึ้นอยู่กับสภาวะที่แตกต่างกันไป ทั้งในสภาพหลอดทดลองและในตัวสัตว์ทดลอง

2. แบคทีเรียที่มีการผลิตและใช้เป็นโพรไบโอติกมีหลายชนิด สามารถแบ่งกลุ่มได้ดังนี้

2.1 กลุ่มแบคทีเรียสร้างสปอร์ (Spore forming bacteria) ได้แก่ กลุ่มบาซิลลัส (*Bacillus*) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่เจริญเติบโตแบบใช้ออกซิเจน (aerobes) แต่ก็สามารถเจริญเติบโตได้ในภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ และบางชนิดสามารถสร้างกรดอินทรีย์ได้ในภาวะนี้ ข้อดีของกลุ่มนี้คือ สร้างเอนไซม์หลายชนิด ทั้งโปรติเอส (Protease) อไมเลส (Amylase) ไลเปส (Lipase) และบางชนิดยังสร้างสารแอนติไบโอติก (Antibiotic) ได้ด้วย สามารถเก็บในรูปสปอร์ ทำให้สะดวกต่อการใช้งานและเก็บรักษาได้นาน โดยจำนวนเชื้อที่ทำงานได้จริงไม่ลดลง ตัวอย่างแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้แก่ *Bacillus cereus*, *B. coagulans* และ *B. subtilis* (ไม่ปรากฏชื่อผู้แต่ง, 2543)

2.2 กลุ่มแบคทีเรียสร้างกรด (Lactic acid bacteria) แบคทีเรียกลุ่มนี้ส่วนใหญ่เจริญเติบโตในภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ และสร้างกรดแลคติก (Lactic acid) ที่ทำให้ค่า pH ในทางเดินอาหารต่ำลง จึงมีสภาพไม่เหมาะสมที่เชื้อโรคต่างๆจะเจริญเติบโต แต่มีข้อเสียคือ ไม่สามารถเก็บในรูปสปอร์ ทำให้อายุการเก็บรักษาลั้น และจำนวนแบคทีเรียมีชีวิตและทำงานได้จริงลดต่ำลงเรื่อยๆ ตามระยะเวลาการเก็บและสภาพแวดล้อม แต่ได้รับการพิจารณาว่าเป็น GRAS (generally recognized as safe organism) คือ มีความปลอดภัยสูงต่อคนและสัตว์ ดังนั้นการที่จะนำแบคทีเรียชนิดนี้มาเป็นโพรไบโอติกในสัตว์น้ำจึงมีความปลอดภัยและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม แม้ว่าจะยังไม่มีรายงานว่าสามารถแยกแบคทีเรียชนิดนี้ได้จากตัวกุ้งก็ตาม (พิกุล, 2543) ตัวอย่างแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้แก่

2.2.1 *Bifidobacterium thermophilum* และ *B. pseudologum*

2.2.2 *Lactobacillus* เช่น *L. acidophilus*, *L. bifidus*, *L. brevis*, *L. bulgarius* และ *L. lactis*

2.2.3 *Streptococcus* เช่น *S. faecium*, *S. Isctis* และ *S. cremoris*

2.3. โพรไบโอติกที่ได้จากพวกยีสต์ เช่น *Saccharomyces* การเสริมยีสต์ในอาหารสัตว์มีเป้าหมายหลักในการเสริมคุณค่าทางอาหาร มากกว่าที่จะมีคุณสมบัติของโพรไบโอติก โดยเฉพาะในกุ้ง เพราะยีสต์เจริญเติบโตช้ากว่าแบคทีเรีย การแย่งที่จึงค่อนข้างเสียเปรียบ อีกทั้งยังสร้างเอนไซม์น้อยกว่าแบคทีเรีย และมีปัญหาเรื่องอายุการเก็บรักษาลั้น เนื่องจากไม่สามารถเก็บในรูปสปอร์ได้เช่นเดียวกับกรดแลคติก (ไม่ปรากฏชื่อผู้แต่ง, 2543)

โดยทั่วไป วิบริโอโคโลนีสีเหลือง เช่น *V. alginolyticus* ซึ่งทำหน้าที่ต่อต้าน *V. harveyi* ได้เป็นอย่างดี ก็น่าจะเป็นโพรไบโอติกที่ดีได้ แต่ข้อที่น่าเป็นห่วงของการนำมาใช้ก็คือ วิบริโอโคโลนีสีเหลืองเป็นแบคทีเรียที่อยู่ในตระกูลเดียวกันกับ *V. harveyi* ในบางโอกาสอาจถ่ายทอดสารพันธุกรรมไปสู่ *V. harveyi* ได้โดยกลไกที่เรียกว่า คอนจูเกชัน (conjugation) และถ้าสารพันธุกรรมที่ถ่ายทอดไปนั้นเป็นสิ่งที่ใช้ต่อต้านยาปฏิชีวนะ การถ่ายทอดสารพันธุกรรมนี้ก็จะทำให้เชื้อ



ภาพที่ 2 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโพรไบโอติก  
ที่มา : ไม่ปรากฏชื่อผู้แต่ง (2543)

*V. harveyi* นั้นดีอย่าไปด้วย ดังนั้นนักวิจัยจึงเลือกใช้โพรไบโอติกชนิดอื่นที่ดีกว่า เช่น *Bacillus* sp. และ *Lactobacillus* sp. (ลิลลา, 2541)

### กลไกการทำงานของโพรไบโอติก

แม้ว่าโพรไบโอติกจะเป็นที่รู้จักมาหลายปีแล้วก็ตาม แต่นักวิทยาศาสตร์ก็ยังสรุปการทำงานที่แท้จริงของมันไม่ได้ มีเพียงทฤษฎีที่ตั้งขึ้นมาเพื่ออธิบายแนวความคิดของโพรไบโอติกโดยมีการทำงาน (ไม่ปรากฏชื่อผู้แต่ง, 2543) ดังนี้

#### 1. การลดปริมาณเชื้อโรคในทางเดินอาหาร

1.1 การผลิตสารต่อต้านเชื้อ เช่น การสร้างกรดแลคติก โดยกลุ่ม lactic acid bacteria ทำให้ pH ในทางเดินอาหารกึ่งต่ำลง แบคทีเรียที่มีโทษจึงอยู่ไม่ได้ หรือการสร้างสารบางชนิดที่ออกฤทธิ์ทำลายแบคทีเรียก่อโรคโดยตรง โดยที่ยังไม่มีผู้ใดทราบนัยสำคัญของโพรไบโอติกในช่องทางเดินของ mature GL ในการเปลี่ยนแปลงค่า pH ในกระเพาะ

1.2 การแข่งขันกับเชื้อก่อโรค การยึดเกาะหรือการพยายามอยู่ร่วมกันของโพรไบโอติกบริเวณทางเดินอาหาร จะมีบทบาทในการขัดขวางเชื้อก่อโรค (Pathogens) ไม่ให้มีพื้นที่ในการเกาะ ทำให้เชื้อโรคถูกขับออกจากร่างกายได้ง่ายขึ้น

#### 2. การกระตุ้นการเจริญเติบโต

2.1 การสร้างสารที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น กรดไขมัน กรดอะมิโน และวิตามิน โดยที่โพรไบโอติกบางชนิดสามารถสังเคราะห์วิตามินบี ซึ่งจำเป็นต่อกึ่งได้

2.2 การสร้างเอนไซม์ เช่น ในกลุ่ม *Lactobacillus* สามารถสร้างน้ำย่อยแลคเตสได้ดี และทำงานในฐานะที่เอื้อประโยชน์ซึ่งกันและกันกับน้ำย่อยในระบบทางเดินอาหาร (Brush

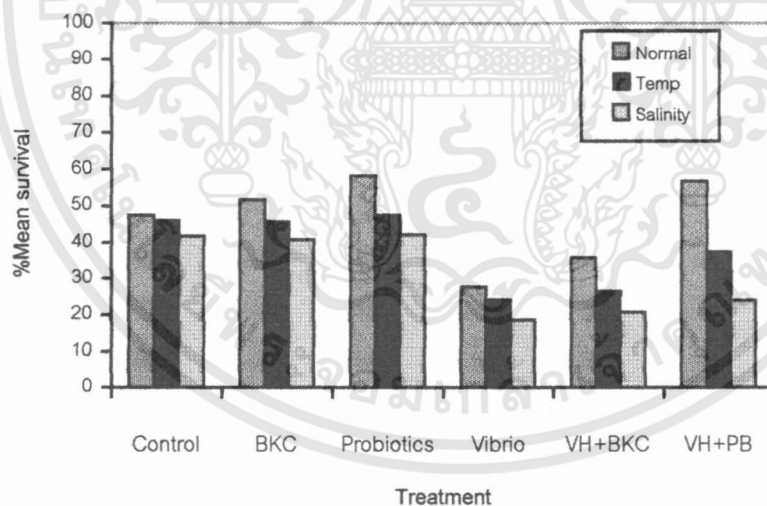
border enterocyte enzymes) ในขบวนการย่อย ช่วยให้สารอาหารอยู่ในรูปที่กุ้งสามารถดูดซึมไปใช้ได้ทันที

### 3. การกระตุ้นภูมิคุ้มกันทางโรค

เมื่อแบคทีเรียโพรไบโอติกเข้าไปเพิ่มจำนวนในทางเดินอาหารกุ้ง จะมีคุณสมบัติเหมือนสิ่งแปลกปลอม ระบบภูมิคุ้มกันทางโรคแบบไม่เจาะจง (Non-specific) ของกุ้งจะได้รับสัญญาณเตือน จากนั้นก็จะมีกระบวนการกระตุ้นให้เม็ดเลือดขาวมีความไวต่อการทำลายเชื้อโรคมมากขึ้น เมื่อมีเชื้อโรคเข้าสู่ทางเดินอาหารกุ้งก็就会被ทำลาย นอกจากนี้ปริมาณเม็ดเลือดขาวจะถูกสร้างเพิ่มขึ้นและกระจายไปทั่วร่างกาย พร้อมทั้งทำลายเชื้อโรคได้ทุกเมื่อ ไม่ว่าจะเข้ามาทางใดก็ตาม

### การใช้โพรไบโอติกในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

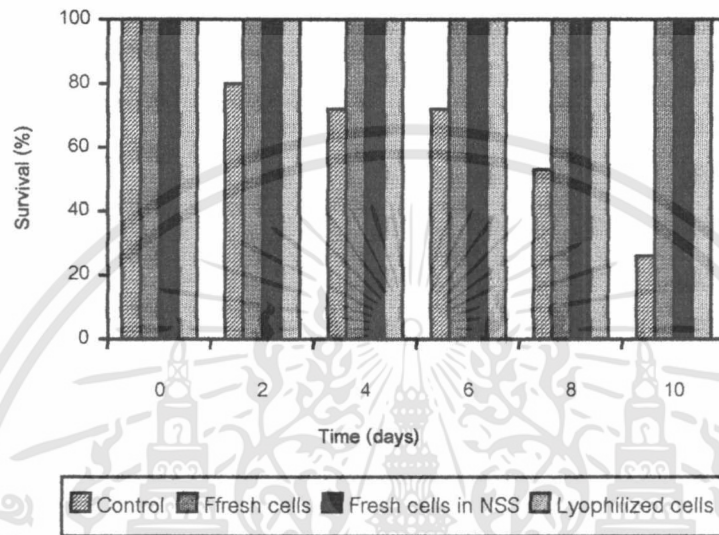
Shivappa (1997) ศึกษาถึงผลกระทบของสภาวะที่ก่อให้เกิดความเครียดในกุ้งต่อประสิทธิภาพของโพรไบโอติกและยาฆ่าเชื้อ พบว่าในสภาวะปกติ กุ้งจะมีอัตราการสูงที่สุดในสภาวะที่มีความเครียดอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งผลที่ได้บ่งบอกถึงความแปรปรวนของความเค็มและอุณหภูมิทำให้กุ้งและเชื้อ *Bacillus* sp. อ่อนแอ ดังนั้นความรุนแรงของเชื้อ *V. harveyi* จึงเพิ่มมากขึ้น (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 อัตรารอดของกุ้งกุลาดำในสภาวะที่ต่างกัน

ที่มา : Shivappa, R. B. (1997)

Rengpipat et al. (1998) ได้ทดลอง challenge เชื้อ *V. harveyi* เข้าสู่ตัวกุ้ง พบว่ากุ้งที่ได้รับโพรไบโอติก *Bacillus* sp. มีอัตราการรอด (100%) มากกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับโพรไบโอติก (26%) อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังพบว่า ขนาด สี และเนื้อเยื่อมีความผิดปกติ ผลที่ได้นี้เป็น การบอกรว่า การสร้างโคไลนินของ *Bacillus* sp. ในทางเดินอาหารกุ้ง เป็นการต่อต้านเชื้อ *V. harveyi* โดยอาจสร้างสารต้านจุลชีพ หรือผลิตสิ่งที่เป็นผลลบต่อ *V. harveyi* (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 อัตรารอดของกุ้งกุลาดำที่ได้รับโพรไบโอติก 3 ชนิด เป็นเวลา 10 วัน  
ที่มา : Rengpipat et al. (1998)

ปัจจุบัน การใช้โพรไบโอติกในสัตว์น้ำได้ผลดีที่ระดับหนึ่งในห้องปฏิบัติการหรือในถังทดลองขนาดเล็ก แต่การนำไปใช้จริงในบ่อเลี้ยงที่มีขนาดใหญ่ก็มีปัจจัยอื่นๆ อีกมากที่เกี่ยวข้อง (พิกุล, 2543) และมักมีจุดประสงค์เพื่อต่อสู้กับผลที่เกิดจากความเครียดที่เกี่ยวข้องเนื่องกับปัจจัย เช่น ระบบการเลี้ยงแบบหนาแน่นหรือการเลี้ยงในระบบปิด การเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมจากการเปลี่ยนถ่ายน้ำหรือการเปลี่ยนแปลงสภาพอาหาร เป็นต้น ดังนั้น การนำโพรไบโอติกไปใช้เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดจึงต้องเป็นวิธีที่ง่าย ประหยัด สะดวก และควรมีการเก็บข้อมูลในการใช้ให้มากพอ

## อุปกรณ์และวิธีการ

### อุปกรณ์

1. เชื้อแบคทีเรีย 5 ชนิด ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantalum*, *L. pentosus*, *Pediococcus* sp. และ *Vibrio harveyi* (D 1526)
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ Man, Rogosa, Sharpe (MRS), Marine agar (MA) และ Thiosulphate-Citrate-Bile-Sucrose Agar (TCBS)
3. กุ้งกุลาดำวัยรุ่น น้ำหนัก 5-12 กรัม
4. กุ้งกุลาดำระยะโพสลาวา 2 (Postlarvae 2)
5. ขวดแก้วใสปากกว้าง
6. ถังพลาสติกกลม ความจุ 50 ลิตร

### วิธีการ

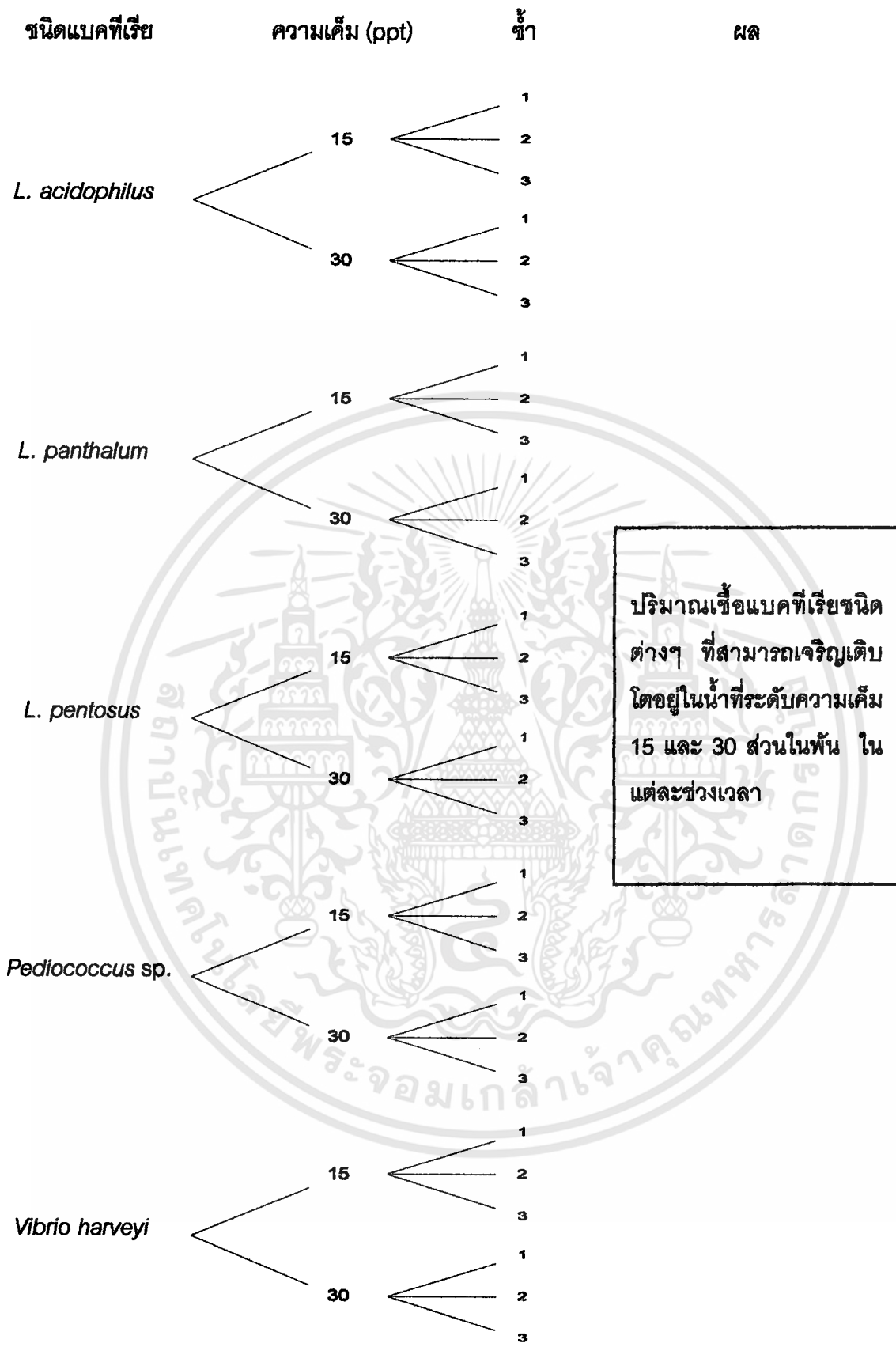
ผลของความเค็มต่อประสิทธิภาพของโพรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ประกอบด้วย 3 การทดลองคือ

1. การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในน้ำ เพื่อศึกษาระยะเวลาที่เชื้อ Lactic acid bacteria ชนิดต่างๆ และเชื้อ *Vibrio harveyi* ที่สามารถเจริญเติบโตอยู่ในน้ำที่ระดับความเค็ม 15 และ 30 ส่วนในพัน
2. การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกในน้ำที่เลี้ยงกุ้งกุลาดำระยะโพสลาวา เพื่อศึกษาปริมาณเชื้อ Lactic acid bacteria ชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น  $10^5$  และ  $10^6$  โคโลนีต่อมิลลิลิตร (CFUs/ml.) ในน้ำที่เลี้ยงลูกกุ้งกุลาดำที่ระดับความเค็ม 30 ส่วนในพัน
3. การเลี้ยงกุ้งกุลาดำเสริมแบคทีเรียโพรไบโอติก เพื่อศึกษาปริมาณเชื้อ Lactic acid bacteria และเชื้อไวรัสในลำไส้กุ้งและน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งกุลาดำ ที่ระดับความเค็ม 5 15 และ 30 ส่วนในพัน

### การทดลองที่ 1 การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในน้ำ

#### แผนการทดลอง

จัดแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียล (Factorial experiment design) โดยกำหนดให้เชื้อแบคทีเรียเป็นปัจจัยที่ 1 คือ Lactic acid bacteria 4 ชนิด ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus*, *L. panthalam*, *L. pentosus*, *Pediococcus* sp. และเชื้อแบคทีเรียก่อโรค 1 ชนิด คือ *Vibrio harveyi* (D 1526) และความเค็ม 2 ระดับเป็นปัจจัยที่ 2 ได้แก่ 15 และ 30 ส่วนในพัน ซึ่งแต่ละชุดการทดลองมี 3 ซ้ำ (ภาพที่ 5)



ปริมาณเชื้อแบคทีเรียชนิด  
ต่างๆ ที่สามารถเจริญเติบโต  
ได้อยู่ในน้ำที่ระดับความเค็ม  
15 และ 30 ส่วนในพัน ใน  
แต่ละช่วงเวลา

ภาพที่ 5 แผนผังการทดลองเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในน้ำ

## วิธีการทดลอง

1. การเตรียมน้ำทะเล ทำการฆ่าเชื้อในน้ำทะเลที่ความเค็ม 30 ส่วนในพัน โดยใช้คลอรีนผง ( $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ ) 60% ในระดับความเข้มข้น 30 ส่วนในล้าน (ppm) ให้อากาศผ่านตลอดเวลา เมื่อคลอรีนในน้ำสลายตัวหมดใช้ระยะเวลาประมาณ 2-3 วัน จึงนำน้ำนั้นมาใช้ได้ โดยผ่านถุงกรองขนาดตา 300 ไมโครเมตร เก็บไว้ในบ่อพัก ควบคุมด้วยผ้าดำและให้อากาศผ่านตลอดเวลา
2. เตรียมขวดโหลแก้วจำนวน 30 ขวด แบ่งเป็น 5 ชุดๆ ละ 6 ขวดและเติมน้ำทะเลความเค็ม 15 และ 30 ส่วนในพันลงในขวดให้มีปริมาตรน้ำ 600 มิลลิลิตร ชุดละ 3 ขวด
3. การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย นำเชื้อจาก stock มาปั่นแยกด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที จากนั้นนำส่วนตะกอนมาละลายในน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85 % เพื่อทำการวัดค่า Optical density (O.D.) แล้วปรับความเข้มข้นให้เป็น  $10^8$  CFUs/mL
4. นำเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดมาใส่ในน้ำแต่ละชุดที่เตรียมไว้ และให้อากาศอย่างสม่ำเสมอตลอดเวลา
5. เก็บตัวอย่างน้ำ 1 มิลลิลิตร จากทุกขวดทดลองตั้งแต่เริ่มใส่จนกระทั่งเชื้อแบคทีเรียหมดจากน้ำในเวลาเดียวกันทุกๆ วัน
6. นำตัวอย่างน้ำที่เก็บมาเจือจางในน้ำเกลือความเข้มข้น 2 % จนได้เชื้อแบคทีเรียที่มีความเข้มข้นเหมาะสมต่อการนับ แล้วนำมาเพาะบนอาหารร่วนโดยใช้วิธีการ drop plate โดยกลุ่ม Lactic acid bacteria จะเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ส่วน *Vibrio harveyi* เพาะบนอาหาร MA

## การบันทึกข้อมูล

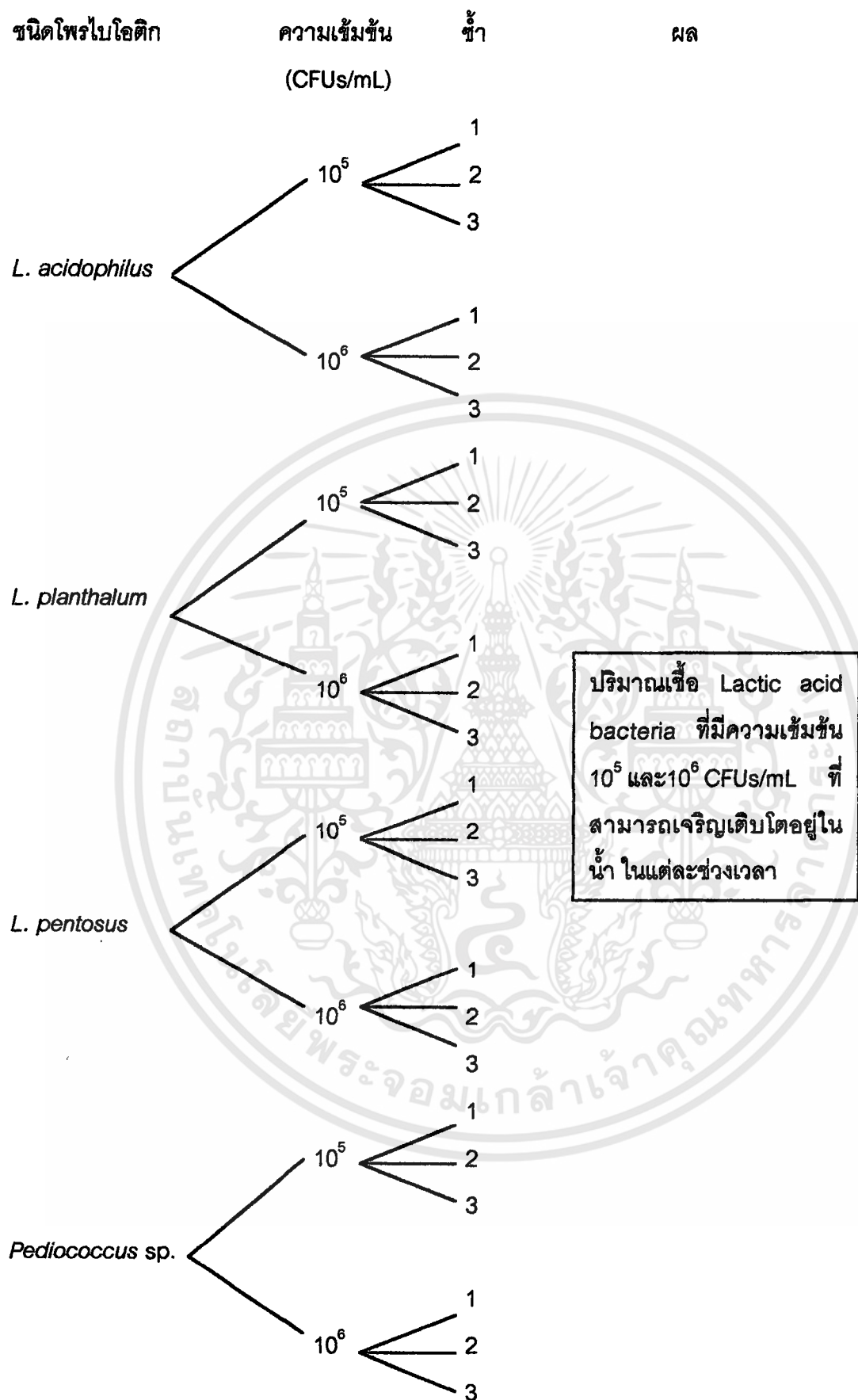
ทำการนับและบันทึกปริมาณเชื้อ Lactic acid bacteria และ *Vibrio harveyi* ที่พบในน้ำในทุกชุดการทดลองและทุกเช้า ตลอดการทดลอง

## การทดลองที่ 2 การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกในน้ำที่เลี้ยงกุ้งกุลาดำระยะโพสลาวา แผนการทดลอง

จัดแผนการทดลองแบบ แฟคทอเรียล (Factorial experimental design) โดยกำหนดให้เชื้อ Lactic acid bacteria 4 ชนิด เป็นปัจจัยที่ 1 ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus*, *L. panthalum*, *L. pentosus* และ *Pediococcus* sp. และความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียเป็นปัจจัยที่ 2 มี 2 ระดับ ได้แก่  $10^5$  และ  $10^6$  CFUs/mL ในแต่ละชุดการทดลองมี 3 ซ้ำ (ภาพที่ 7)

## วิธีการทดลอง

1. การเตรียมน้ำทะเลและเชื้อ Lactic acid bacteria เช่นเดียวกันกับการทดลองที่ 1



ภาพที่ 6 แผนผังการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกในน้ำที่เลี้ยงกึ่งกูลาดำระยะโพลลาภา

2. เตรียมขวดโหลแก้วจำนวน 30 ขวด โดยแบ่งเป็น 4 ชุด และเติมน้ำทะเลความเค็ม 30 ส่วนในพัน ลงในขวดโหลแก้วให้มีปริมาตรน้ำ 600 มิลลิลิตร ชุดละ 3 ขวด
3. นำลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสลาวา 2 มาเลี้ยงให้มีความหนาแน่น 100 ตัวต่อขวดโหล เป็นระยะเวลา 2 วัน เพื่อปรับสภาพลูกกุ้ง
4. นำเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดมาใส่ในน้ำแต่ละชุดที่มีลูกกุ้งเตรียมไว้ โดยแต่ละชุดจะแบ่งเป็น 2 กลุ่มความเข้มข้น คือ  $10^5$  และ  $10^6$  CFUs/mL และให้อากาศอย่างสม่ำเสมอตลอดเวลา
5. ทำการเลี้ยงกุ้งเป็นเวลา 3 วัน โดยให้อาหารเป็นไรสน้ำตาลหรืออาร์ทีเมีย (Artemia) ทุกวัน
5. ระหว่างที่ทำการเลี้ยง จะทำการเก็บตัวอย่างน้ำ 1 มิลลิลิตร จากทุกขวดโหลในเวลาเดียวกันทุกวัน โดยเริ่มตั้งแต่หลังใส่เชื้อแบคทีเรียจนถึงวันที่ 4 ของการเลี้ยง เพื่อนำมาหาปริมาณเชื้อ Lactic acid bacteria ในน้ำ โดยใช้วิธีการเดียวกับการทดลองที่ 1

#### การบันทึกข้อมูล

ทำการนับและบันทึกปริมาณเชื้อ Lactic acid bacteria ที่พบในน้ำ ในทุกชุดการทดลอง และทุกเช้า ตลอดการทดลอง

#### การทดลองที่ 3 การเลี้ยงกุ้งกุลาดำโดยเสริมแบคทีเรียโพรไบโอติก แผนการทดลอง

จัดแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design, CRD) โดยแต่ละชุดการทดลอง มี 3 ซ้ำ แบ่งความเค็มออกเป็น 3 ระดับ ได้แก่ 5 15 และ 30 ส่วนในพัน (ภาพที่ 7)

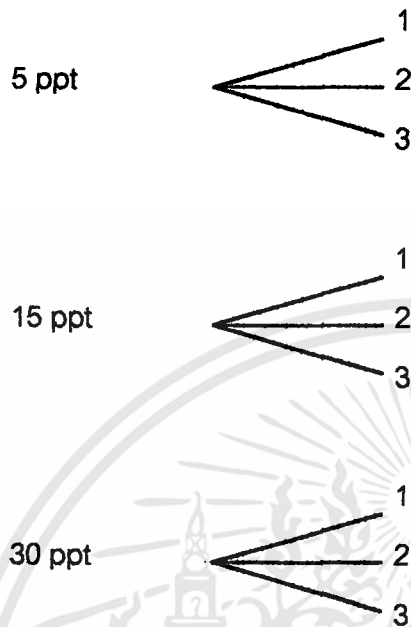
#### วิธีการทดลอง

1. การเตรียมน้ำทะเลเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1
2. นำกุ้งกุลาดำ 60 ตัว มาปรับสภาพในน้ำที่ระดับความเค็ม 15 ส่วนในพัน เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นสุ่มคัดกุ้งที่แข็งแรงมาเลี้ยงในถังทดลองที่บรรจุน้ำเค็ม 50 ลิตร ถึงละ 15 ตัว เป็นเวลา 3 วัน โดยค่อย ๆ ปรับความเค็มให้เท่ากับ 5 15 และ 30 ส่วนในพัน ตามชุดการทดลอง
3. ใส่เชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติก *Lactobacillus acidophilus* (L450) ที่หมักในสูตรอาหารราคาต่ำ (นมสด 25%+รำ 5%+กากน้ำตาล 8%) ที่มีความเข้มข้นของเชื้อ  $3 \times 10^9$  CFUs/mL ในอัตราส่วนของเชื้อ 1 มิลลิลิตร/น้ำ 1 ลิตร ในแต่ละถังทดลอง
4. ทำการเลี้ยงกุ้งเป็นเวลา 5 วัน โดยให้อาหาร 15% ของน้ำหนักตัว และวัดค่า pH ทุกวัน

กึ่งกุลาดำเสริมโพรไบโอติก  
ที่ความเค็มต่างๆ

ซ้ำ

ผล



- ปริมาณเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติก  
และไวรัสโอบีในน้ำที่ความเค็ม 5 15  
และ 30 ส่วนในพัน

- ปริมาณเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติก  
และไวรัสโอบีในลำไส้กึ่งกุลาดำที่  
ความเค็ม 5 15 และ 30 ส่วนในพัน

- ค่า pH ในน้ำแต่ละชุด

#### ภาพที่ 7 แผนผังการทดลองการเลี้ยงกึ่งกุลาดำโดยเสริมแบคทีเรียโพรไบโอติก

5. ระหว่างที่ทำการเลี้ยง จะทำการเก็บตัวอย่างน้ำ 1 มิลลิลิตร จากทุกถังทดลองในเวลาเดียวกันทุกวัน ตั้งแต่ก่อนใส่เชื้อโพรไบโอติกจนถึงวันที่ 5 ของการเลี้ยง เพื่อนำมาหาปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus acidophilus* (L450) ในน้ำ โดยใช้อาหาร MRS และเชื้อไวรัสโอบีจะใช้อาหาร TCBS

6. สุ่มเก็บตัวอย่างกึ่งถึงละ 3 ตัว ทุกวัน เพื่อนำมาหาปริมาณเชื้อแบคทีเรียในลำไส้ โดยเริ่มเก็บตั้งแต่หลังใส่เชื้อ 6 ชั่วโมง จนถึงวันที่ 5 แล้วชั่งน้ำหนักกึ่งแต่ละตัว

7. แยกลำไส้ออกจากตัวกึ่งโดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ (Aseptic technique) แล้วนำมาชั่งน้ำหนักลำไส้ หลังจากนั้นบดให้ละเอียดในน้ำเกลือ 2 % ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำมาเพาะลงบนจานเพาะเชื้อตามวิธีการเดียวกันกับการทดลองที่ 1

#### การบันทึกข้อมูล

ทำการนับและบันทึกปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus acidophilus* (L 450) และไวรัสโอบีที่พบทั้งในน้ำและในลำไส้กึ่งกุลาดำ ในทุกชุดการทดลองและทุกซ้ำ พร้อมทั้งค่า pH ที่เปลี่ยนแปลงทุกวัน ตลอดการทดลอง

## การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของชุดการทดลองของข้อมูล ภายใต้แผนการทดลองแบบ Factorial experimental design โดยใช้โปรแกรม Statgraphic Version 7.0 และแผนการทดลองแบบ CRD โดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel

## สถานที่ทำการทดลอง

หน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ณ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ

## ระยะเวลาในการทำการทดลอง

เริ่มทำการทดลองตั้งแต่เดือนเมษายน และสิ้นสุดการทดลองเดือน มิถุนายน 2543



## ผลการทดลอง

### การทดลองที่ 1 การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในน้ำ

จากการทดลองเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในน้ำ เมื่อตรวจนับปริมาณหลังจากใส่เชื้อแบคทีเรียทันที พบว่าปริมาณเชื้อแบคทีเรียไม่มีความแตกต่างกันของเชื้อแต่ละชนิด เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง เชื้อ *L. panthalum* ( $2.92 \times 10^2$  CFUs/mL) ลดลงอย่างรวดเร็ว และมีความแตกต่างกันกับเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) เมื่อถึง 48 ชั่วโมง เชื้อ *Pediococcus* sp. มีปริมาณน้อยที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ( $6.67 \times 10$  CFUs/mL) โดยปริมาณลดลงจากชั่วโมงที่ 24 อย่างรวดเร็ว ต่อมาที่ 72 ชั่วโมง ปริมาณเชื้อ *L. acidophilus* มีมากที่สุด ( $2.75 \times 10^2$  CFUs/mL) ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับเชื้อ *L. panthalum* *Pediococcus* sp. *L. pentosus* และ *Vibrio harveyi* จนกระทั่งชั่วโมงที่ 96 พบ *L. acidophilus* ชนิดเดียว แต่ไม่แตกต่างกับเชื้อชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 2)

จากการเปรียบเทียบความเค็ม 2 ระดับ ที่ 15 ppt และ 30 ppt พบว่าหลังจากใส่เชื้อแบคทีเรียลงในน้ำแล้วนับปริมาณเชื้อ พบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ระดับไม่มีความแตกต่างกัน ที่เวลา 24 ชั่วโมง และเชื้อแบคทีเรียที่ 15 ppt ( $3.09 \times 10^5$  CFUs/mL) มีปริมาณมากกว่าเชื้อแบคทีเรียที่ 30 ppt ( $1.42 \times 10^5$  CFUs/mL) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) แต่ที่ 48 และ 96 ชั่วโมง พบว่าปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่ความเค็ม 15 ppt และ 30 ppt ไม่มีความแตกต่างกัน ส่วนที่ 72 ชั่วโมง มีความแตกต่างเช่นเดียวกันกับที่ 24 ชั่วโมง

### การทดลองที่ 2 การเลี้ยงแบคทีเรียโพรไบโอติกในน้ำที่เลี้ยงกุ้งกุลาดำระยะโพสลาวา

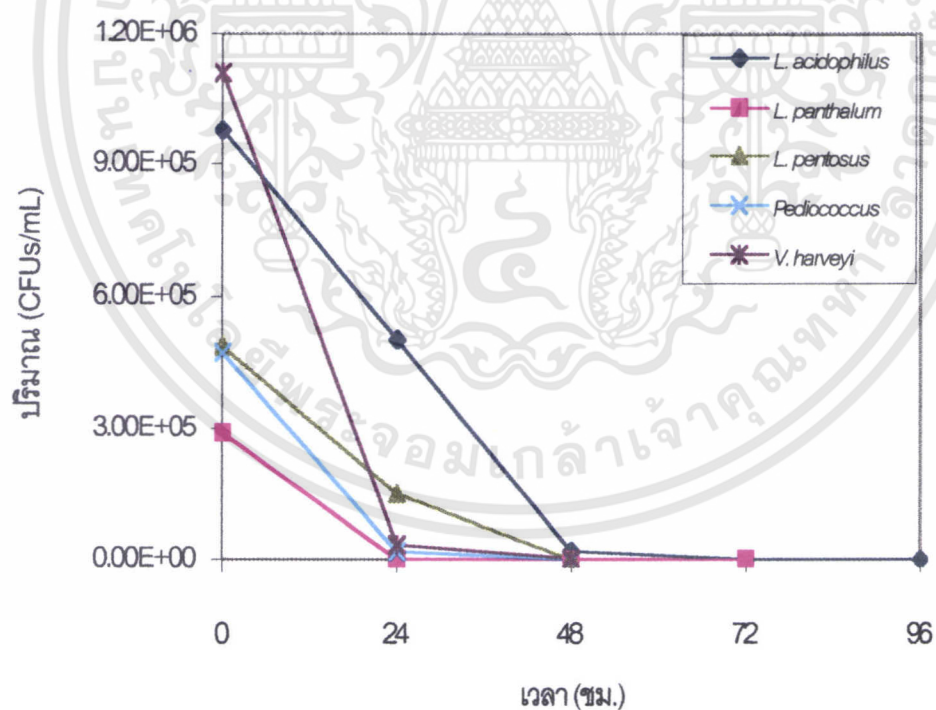
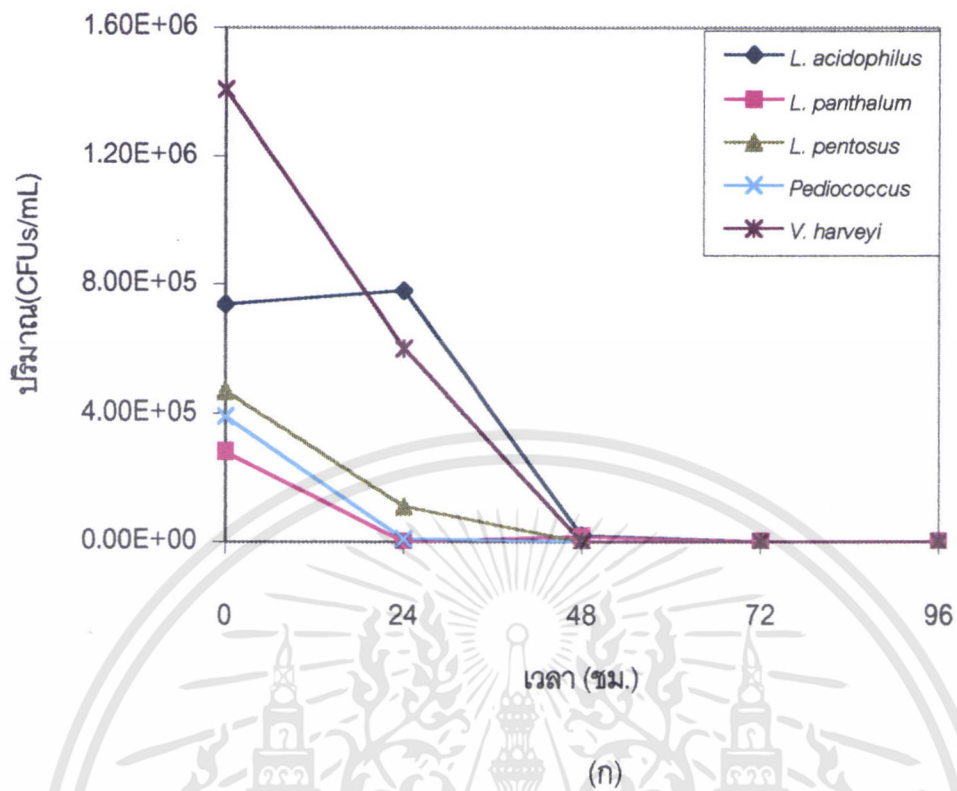
การเลี้ยงแบคทีเรียในน้ำที่เลี้ยงกุ้งกุลาดำระยะโพสลาวา เมื่อตรวจนับเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกหลังจากใส่เชื้อแบคทีเรียทันที พบว่าปริมาณเชื้อแบคทีเรียมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) โดยที่เชื้อ *L. acidophilus* ( $1.79 \times 10^5$  CFUs/mL) และ *Pediococcus* sp. ( $2.66 \times 10^6$  CFUs/mL) มีปริมาณมากกว่า *L. panthalum* ( $1.11 \times 10^6$  CFUs/mL) และ *L. pentosus* ( $8.25 \times 10^5$  CFUs/mL) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) และเช่นเดียวกันกับชั่วโมงที่ 24 แต่ที่ 48 ชั่วโมง เชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดไม่มีความแตกต่างกัน ส่วนชั่วโมงที่ 72 ก็พบว่าเชื้อแต่ละชนิดลดปริมาณลงมากโดยไม่พบ *L. panthalum* แต่พบ *Pediococcus* sp. มีปริมาณมากที่สุด ( $2.38 \times 10^2$  CFUs/mL) (ตารางที่ 2)

ความเข้มข้นของแบคทีเรียก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลทำให้ปริมาณของเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน เมื่อตรวจนับเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกหลังจากใส่เชื้อแบคทีเรียทันทีพบว่าปริมาณเชื้อแบคทีเรียมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) โดยเชื้อแบคทีเรียที่ความ

ตารางที่ 2 ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย (CFUs/mL) แต่ละชนิดที่เลี้ยงในน้ำที่ความเค็ม 15 และ 30 ppt ที่เวลา 0 24 48 72 และ 96 ชั่วโมง

ชั่วโมง	ความเค็ม (ppt)	ชนิดแบคทีเรีย									
		<i>L. acidophilus</i>	ค่าเฉลี่ย	<i>L. parthalum</i>	ค่าเฉลี่ย	<i>L. pentosus</i>	ค่าเฉลี่ย	<i>Pedlococcus</i> sp.	ค่าเฉลี่ย	<i>Vibrio harveyi</i>	ค่าเฉลี่ย
0	15	$7.36 \cdot 10^5 \pm 6.80 \cdot 10^4$		$2.83 \cdot 10^6 \pm 6.63 \cdot 10^5$		$4.68 \cdot 10^5 \pm 2.61 \cdot 10^4$		$3.91 \cdot 10^3 \pm 3.90 \cdot 10^3$		$1.41 \cdot 10^5 \pm 7.01 \cdot 10^2$	
	30	$9.78 \cdot 10^5 \pm 1.50 \cdot 10^4$	$8.57 \cdot 10^6 \pm 6.24 \cdot 10^4^a$	$2.90 \cdot 10^5 \pm 4.44 \cdot 10^4$	$2.86 \cdot 10^6 \pm 3.57 \cdot 10^5^a$	$4.87 \cdot 10^5 \pm 9.71 \cdot 10^3$	$4.52 \cdot 10^5 \pm 3.38 \cdot 10^4^a$	$4.73 \cdot 10^4 \pm 1.69 \cdot 10^3$	$4.32 \cdot 10^5 \pm 4.04 \cdot 10^4^a$	$1.11 \cdot 10^5 \pm 3.01 \cdot 10^2$	$2.34 \cdot 10^6 \pm 9.74 \cdot 10^5$
24	15	$7.78 \cdot 10^5 \pm 5.51 \cdot 10^4$		$1.47 \cdot 10^2 \pm 2.91 \cdot 10^4$		$1.12 \cdot 10^6 \pm 2.31 \cdot 10^4$		$8.77 \cdot 10^3 \pm 1.61 \cdot 10^3$		$5.99 \cdot 10^5 \pm 1.86 \cdot 10^5$	
	30	$5.02 \cdot 10^5 \pm 8.09 \cdot 10^4$	$6.40 \cdot 10^6 \pm 7.57 \cdot 10^4^a$	$4.37 \cdot 10^2 \pm 3.12 \cdot 10^2$	$2.92 \cdot 10^2 \pm 1.54 \cdot 10^4^b$	$1.50 \cdot 10^5 \pm 4.63 \cdot 10^3$	$2.56 \cdot 10^5 \pm 1.13 \cdot 10^6^{cd}$	$1.82 \cdot 10^4 \pm 9.59 \cdot 10^3$	$1.35 \cdot 10^4 \pm 4.84 \cdot 10^3^{bd}$	$3.35 \cdot 10^4 \pm 1.36 \cdot 10^4$	$2.18 \cdot 10^5 \pm 1.17 \cdot 10^5$
48	15	$1.97 \cdot 10^4 \pm 8.97 \cdot 10^3$		$1.77 \cdot 10^4 \pm 1.76 \cdot 10^4$		$1.25 \cdot 10^2 \pm 2.50 \cdot 10$		$2.00 \cdot 10^2 \pm 6.67 \cdot 10$		$1.91 \cdot 10^3 \pm 5.45 \cdot 10^2$	
	30	$1.96 \cdot 10^4 \pm 8.22 \cdot 10^3$	$1.97 \cdot 10^4 \pm 5.44 \cdot 10^3^a$	$6.67 \cdot 10^3 \pm 3.33 \cdot 10$	$8.90 \cdot 10^3 \pm 8.82 \cdot 10^3^{ab}$	$5.68 \cdot 10^2 \pm 1.43 \cdot 10$	$3.56 \cdot 10^2 \pm 1.22 \cdot 10^2^b$	$1.00 \cdot 10^2 \pm 3.33 \cdot 10$	$6.67 \cdot 10^3 \pm 3.33 \cdot 10^b$	$1.22 \cdot 10^3 \pm 5.23 \cdot 10^2$	$1.27 \cdot 10^3 \pm 4.44 \cdot 10^2$
72	15	$4.50 \cdot 10^2 \pm 1.45 \cdot 10^2$		0.00		0.00		$1.00 \cdot 10^2 \pm 3.33 \cdot 10$		0.00	
	30	$1.00 \cdot 10^2 \pm 0.00$	$2.75 \cdot 10^2 \pm 1.02 \cdot 10^2^a$	$3.33 \cdot 10^3 \pm 3.33 \cdot 10$	$1.67 \cdot 10^3 \pm 1.67 \cdot 10^b$	0.00	0.00 <sup>b</sup>	0.00	$1.67 \cdot 10^3 \pm 1.67 \cdot 10^b$	0.00	0.00 <sup>b</sup>
96	15	$1.33 \cdot 10^2 \pm 1.33 \cdot 10^2$		0.00		0.00		0.00		0.00	
	30	$33.3 \cdot 10^3 \pm 33.3 \cdot 10$	$8.33 \cdot 10^3 \pm 6.54 \cdot 10^a$	0.00	0.00 <sup>a</sup>	0.00	0.00 <sup>a</sup>	0.00	0.00 <sup>a</sup>	0.00	0.00 <sup>a</sup>

หมายเหตุ ค่าที่ตัวอักษรต่างกันและอยู่ในแถวเดียวกันหมายถึงปริมาณเชื้อมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)



(๑)

ภาพที่ 8 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ ในแต่ละช่วงเวลา ที่ความเค็ม (n) 15 ppt และ (๑) 30 ppt

เข้มข้น  $10^6$  CFUs/mL ( $2.91 \times 10^6$  CFUs/mL) มีปริมาณมากกว่าเชื้อแบคทีเรียที่ความเข้มข้น  $10^5$  CFUs/mL ( $2.86 \times 10^5$  CFUs/mL) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ต่อมาที่เวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเชื้อแบคทีเรียมีปริมาณลดลงทั้งที่ความเข้มข้น  $10^5$  CFUs/mL ( $6.98 \times 10^4$  CFUs/mL) และ  $10^6$  CFUs/mL ( $8.35 \times 10^5$  CFUs/mL) และแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่ที่ 48 ชั่วโมงไม่พบความแตกต่างของเชื้อแบคทีเรียระหว่างความเข้มข้นทั้ง 2 ระดับ จนกระทั่งที่ 72 ชั่วโมง พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ระหว่างเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ระดับ โดยที่เชื้อแบคทีเรียมีปริมาณลดลงมากทั้งที่ความเข้มข้น  $10^5$  CFUs/mL ( $5.77 \times 10^4$  CFUs/mL) และ  $10^6$  CFUs/mL ( $1.77 \times 10^2$  CFUs/mL) (ตารางที่ 3)

### การทดลองที่ 3 การเลี้ยงกึ่งกลาดำโดยเสริมแบคทีเรียโพรไบโอติก

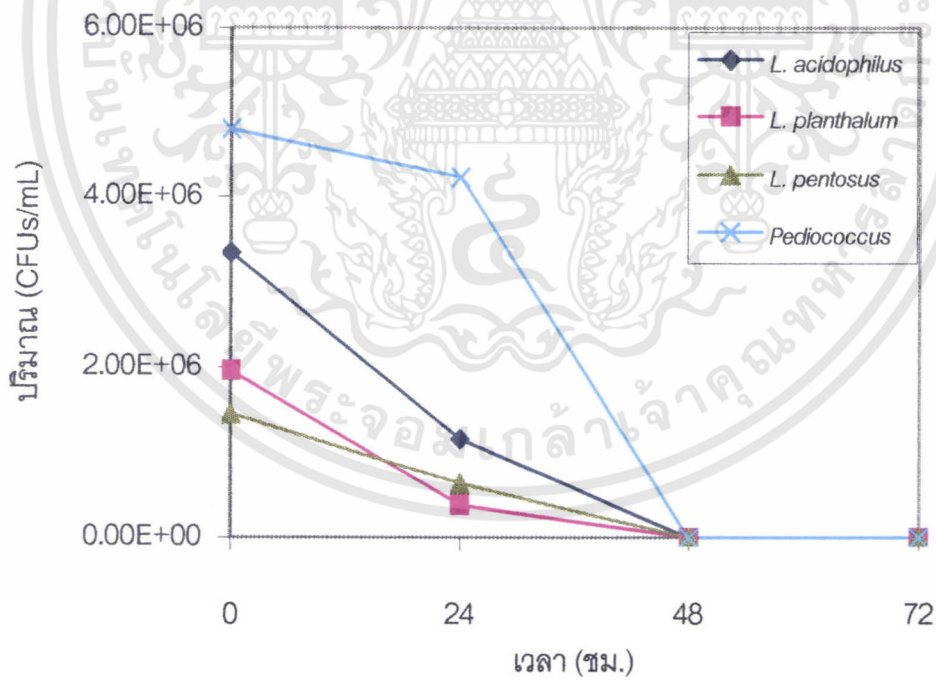
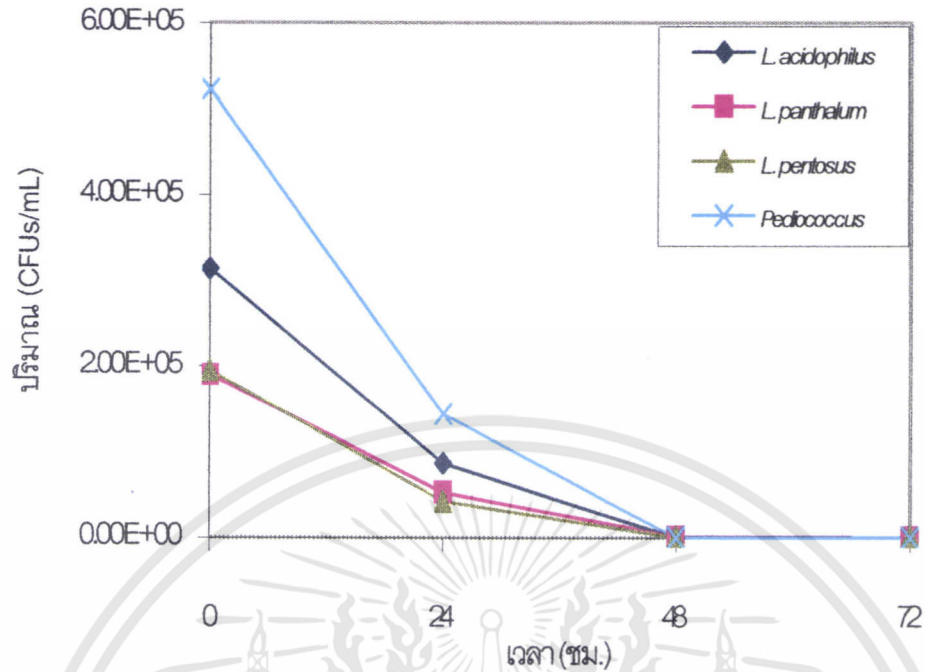
การตรวจหาปริมาณเชื้อแบคทีเรียในน้ำที่เลี้ยงกึ่งกลาดำโดยเสริมแบคทีเรียโพรไบโอติก พบแบคทีเรีย 3 ชนิด คือ *L. acidophilus* ซึ่งใช้เป็นแบคทีเรียโพรไบโอติก *V. harveyi* และไวรัสโคโคไลนัสเหลือง นอกจากนี้ยังพบเชื้อยีสต์ด้วย เมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างความเค็มทั้ง 3 ระดับ คือ 5 15 และ 30 ppt แล้วตรวจนับทันทีหลังจากใส่เชื้อ พบว่าปริมาณเชื้อ *L. acidophilus* ไม่มีความแตกต่างกัน และเช่นเดียวกันกับที่ 6 24 และ 48 ชั่วโมง แต่ที่ 72 ชั่วโมง พบความแตกต่างระหว่างเชื้อ *L. acidophilus* ที่ความเค็ม 5 ppt ( $5.73 \times 10^2$  CFUs/mL) ซึ่งมีปริมาณมากกว่าที่ 15 ppt ( $1.00 \times 10^2$  CFUs/mL) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) พบ *V. harveyi* ที่เวลา 24 ชั่วโมง โดยที่ความเค็ม 5 ppt. มีปริมาณมากที่สุด ( $5.33 \times 10^4$  CFUs/mL) และมีความแตกต่างกับความเค็มที่ 15 ( $1.33 \times 10^4$  CFUs/mL) และ 30 ppt ( $9.33 \times 10^3$  CFUs/mL) อย่างมีนัยสำคัญ แต่ต่อมาที่ 48 และ 72 ชั่วโมง ไม่พบความแตกต่างระหว่างความเค็มทั้ง 3 ระดับ ส่วนปริมาณเชื้อไวรัสโคโคไลนัสเหลืองไม่มีความแตกต่างกันระหว่างความเค็มทั้ง 3 ระดับ ตั้งแต่ก่อนใส่แบคทีเรียโพรไบโอติกและมีปริมาณเพิ่มขึ้นเล็กน้อยที่ 6 ชั่วโมง จากนั้นจึงมีปริมาณลดลงไม่มากจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลองที่ 72 ชั่วโมง ยีสต์ที่เริ่มพบเมื่อชั่วโมงที่ 6 ( $6.67 \times 10^3$  CFUs/mL) มีปริมาณที่ไม่แตกต่างกันทั้ง 3 ความเค็ม จากนั้นปริมาณยีสต์ลดลงไม่มากนักทั้งที่ 24 48 ชั่วโมง จนสิ้นสุดการทดลองที่ 72 ชั่วโมง ( $5.00 \times 10^2$  CFUs/mL) โดยไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญตลอดการทดลอง (ตารางที่ 4)

เมื่อทำการนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียในลำไส้ของกึ่งพบว่าเป็นแบคทีเรียชนิดเดียวกันกับที่พบในน้ำ รวมทั้งพบยีสต์ด้วย โดยพบว่าที่ 6 ชั่วโมง ปริมาณเชื้อ *L. acidophilus* ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างความเค็มทั้ง 3 ระดับ ที่ 5 ppt ( $3.09 \times 10^6$  CFUs/mL) 15 ppt ( $4.42 \times 10^6$  CFUs/mL) และ 30 ppt ( $4.48 \times 10^6$  CFUs/mL) และมีปริมาณลดลงเรื่อยๆ ที่ 24 48 และ 72 ชั่วโมง โดยไม่พบความแตกต่างกันของปริมาณเชื้อโพรไบโอติกตลอดการทดลอง พบปริมาณเชื้อ *V. harveyi* ที่

ตารางที่ 3 ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย (CFUs/ml.) แต่ละชนิดที่เลี้ยงในน้ำเลี้ยงกึ่งระยะโพลลาว่าที่มีความเข้มข้นของเชื้อ  $10^5$  และ  $10^6$  CFUs/mL ที่เวลา 0 24 48 และ 72 ชั่วโมง

เวลา (ชม.)	ความเข้มข้น		ชนิดแบคทีเรีย						
	CFUs/ml.	<i>L. acidophilus</i>	ค่าเฉลี่ย	<i>L. panthalum</i>	ค่าเฉลี่ย	<i>L. pentosus</i>	ค่าเฉลี่ย	<i>Pediococcus</i> sp.	ค่าเฉลี่ย
0	$10^5$	$3.13 \cdot 10^5 \pm 1.07 \cdot 10^5$		$1.89 \cdot 10^5 \pm 1.23 \cdot 10^4$		$1.94 \cdot 10^5 \pm 1.15 \cdot 10^4$		$5.23 \cdot 10^5 \pm 3.56 \cdot 10^3$	
	$10^6$	$3.34 \cdot 10^6 \pm 1.90 \cdot 10^4$	$1.79 \cdot 10^6 \pm 7.00 \cdot 10^5$ <sup>a</sup>	$1.96 \cdot 10^6 \pm 1.04 \cdot 10^5$	$1.11 \cdot 10^6 \pm 4.14 \cdot 10^5$ <sup>b</sup>	$1.46 \cdot 10^6 \pm 6.25 \cdot 10^5$	$8.25 \cdot 10^5 \pm 3.97 \cdot 10^4$ <sup>b</sup>	$4.80 \cdot 10^6 \pm 2.00 \cdot 10^5$	$2.66 \cdot 10^6 \pm 9.61 \cdot 10^5$ <sup>c</sup>
24	$10^5$	$8.59 \cdot 10^4 \pm 4.14 \cdot 10^5$		$5.25 \cdot 10^4 \pm 2.77 \cdot 10^4$		$4.19 \cdot 10^4 \pm 4.74 \cdot 10^3$		$1.43 \cdot 10^5 \pm 2.18 \cdot 10^4$	
	$10^6$	$1.06 \cdot 10^6 \pm 7.57 \cdot 10^4$	$6.13 \cdot 10^5 \pm 2.47 \cdot 10^5$ <sup>a</sup>	$3.91 \cdot 10^5 \pm 1.30 \cdot 10^5$	$2.22 \cdot 10^5 \pm 9.62 \cdot 10^4$ <sup>b</sup>	$6.34 \cdot 10^5 \pm 1.34 \cdot 10^5$	$1.85 \cdot 10^5 \pm 9.60 \cdot 10^4$ <sup>b</sup>	$4.23 \cdot 10^6 \pm 2.68 \cdot 10^5$	$7.90 \cdot 10^5 \pm 3.13 \cdot 10^5$ <sup>a</sup>
48	$10^5$	$2.17 \cdot 10^2 \pm 6.01 \cdot 10$		$4.80 \cdot 10^2 \pm 4.26 \cdot 10^2$		$1.33 \cdot 10^2 \pm 3.33 \cdot 10$		$2.73 \cdot 10^2 \pm 9.82 \cdot 10$	
	$10^6$	$3.33 \cdot 10^2 \pm 5.10 \cdot 10$	$2.75 \cdot 10^2 \pm 4.79 \cdot 10$ <sup>a</sup>	$1.37 \cdot 10^2 \pm 5.07 \cdot 10$	$2.86 \cdot 10^2 \pm 2.11 \cdot 10^2$ <sup>a</sup>	$3.07 \cdot 10^2 \pm 2.86 \cdot 10^2$	$4.12 \cdot 10^2 \pm 1.79 \cdot 10^2$ <sup>a</sup>	$1.14 \cdot 10^3 \pm 1.38 \cdot 10^2$	$3.28 \cdot 10^2 \pm 7.97 \cdot 10$ <sup>a</sup>
72	$10^5$	$1.71 \cdot 10^2 \pm 5.70 \cdot 10$		0.00		0.00		$1.75 \cdot 10^2 \pm 6.01 \cdot 10$	
	$10^6$	$2.00 \cdot 10^2 \pm 5.10 \cdot 10$	$1.57 \cdot 10^2 \pm 3.92 \cdot 10$ <sup>a</sup>	0.00	0.00 <sup>b</sup>	$1.50 \cdot 10^2 \pm 2.89 \cdot 10$	$7.50 \cdot 10 \pm 3.59 \cdot 10$ <sup>b</sup>	$2.58 \cdot 10^2 \pm 3.00 \cdot 10$	$2.38 \cdot 10^2 \pm 6.18 \cdot 10$ <sup>c</sup>

หมายเหตุ ตัวอักษรที่ต่างกันและอยู่ในแถวเดียวกันหมายถึงปริมาณเชื้อมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ )



(ข)

ภาพที่ 9 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ ในแต่ละช่วงเวลา ที่ความเข้มข้น (ก)  $10^5$  CFUs/mL และ (ข)  $10^6$  CFUs/mL

ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ยปริมาณเชื้อแต่ละชนิด (CFUs/mL) ในน้ำที่เลี้ยงกุ้งกุลาดำเสริมโพรไบโอติกที่  
เวลาก่อนใส่เชื้อ 0 24 48 72 ชั่วโมง

ชนิดของเชื้อ	เวลา (ชม.)	ความเค็ม (ppt)		
		5	15	30
<i>L. acidophilus</i>				
	0	$1.38 \cdot 10^6 \pm 5.96 \cdot 10^5$ <sup>a</sup>	$1.73 \cdot 10^6 \pm 6.20 \cdot 10^5$ <sup>a</sup>	$1.76 \cdot 10^6 \pm 5.43 \cdot 10^5$ <sup>a</sup>
	6	$7.83 \cdot 10^5 \pm 2.92 \cdot 10^5$ <sup>a</sup>	$2.85 \cdot 10^6 \pm 1.98 \cdot 10^6$ <sup>a</sup>	$1.53 \cdot 10^5 \pm 2.40 \cdot 10^4$ <sup>a</sup>
	24	$7.78 \cdot 10^3 \pm 4.29 \cdot 10^3$ <sup>a</sup>	$8.80 \cdot 10^3 \pm 7.02 \cdot 10^2$ <sup>a</sup>	$3.27 \cdot 10^3 \pm 1.16 \cdot 10^3$ <sup>a</sup>
	48	$1.91 \cdot 10^3 \pm 1.07 \cdot 10^3$ <sup>a</sup>	$4.20 \cdot 10^2 \pm 9.17 \cdot 10^1$ <sup>a</sup>	$3.11 \cdot 10^2 \pm 8.46 \cdot 10^1$ <sup>a</sup>
	72	$5.73 \cdot 10^2 \pm 9.40 \cdot 10^1$ <sup>a</sup>	$1.00 \cdot 10^2 \pm 5.77 \cdot 10^1$ <sup>a</sup>	$1.44 \cdot 10^2 \pm 2.94 \cdot 10^1$ <sup>ab</sup>
<i>Vibrio harveyi</i>				
	24	$5.33 \cdot 10^4 \pm 4.06 \cdot 10^3$ <sup>a</sup>	$1.33 \cdot 10^4 \pm 8.11 \cdot 10^3$ <sup>b</sup>	$9.33 \cdot 10^3 \pm 9.33 \cdot 10^3$ <sup>b</sup>
	48	$1.77 \cdot 10^5 \pm 1.53 \cdot 10^5$ <sup>a</sup>	$4.07 \cdot 10^4 \pm 2.71 \cdot 10^4$ <sup>a</sup>	$2.53 \cdot 10^4 \pm 1.86 \cdot 10^4$ <sup>a</sup>
	72	$5.63 \cdot 10^3 \pm 3.33 \cdot 10^3$ <sup>a</sup>	$2.07 \cdot 10^4 \pm 1.86 \cdot 10^4$ <sup>a</sup>	$4.08 \cdot 10^4 \pm 3.47 \cdot 10^3$ <sup>a</sup>
วibriโคโคไลนีสี่เหลี่ยม				
	ก่อนใส่เชื้อ	$5.20 \cdot 10^3 \pm 1.70 \cdot 10^3$ <sup>a</sup>	$1.93 \cdot 10^4 \pm 6.76 \cdot 10^3$ <sup>a</sup>	$3.67 \cdot 10^3 \pm 1.09 \cdot 10^3$ <sup>a</sup>
	0	$6.67 \cdot 10^3 \pm 2.91 \cdot 10^3$ <sup>a</sup>	$1.55 \cdot 10^4 \pm 3.23 \cdot 10^3$ <sup>a</sup>	$5.73 \cdot 10^3 \pm 1.51 \cdot 10^3$ <sup>a</sup>
	6	$1.82 \cdot 10^6 \pm 9.03 \cdot 10^5$ <sup>a</sup>	$1.97 \cdot 10^6 \pm 2.07 \cdot 10^5$ <sup>a</sup>	$3.47 \cdot 10^5 \pm 1.27 \cdot 10^5$ <sup>a</sup>
	24	$2.00 \cdot 10^4 \pm 3.46 \cdot 10^3$ <sup>a</sup>	$2.53 \cdot 10^5 \pm 1.66 \cdot 10^5$ <sup>a</sup>	$4.00 \cdot 10^4 \pm 9.24 \cdot 10^3$ <sup>a</sup>
	48	$2.25 \cdot 10^4 \pm 1.38 \cdot 10^4$ <sup>a</sup>	$1.01 \cdot 10^5 \pm 4.68 \cdot 10^4$ <sup>a</sup>	$5.49 \cdot 10^4 \pm 2.11 \cdot 10^4$ <sup>a</sup>
	72	$8.20 \cdot 10^3 \pm 1.15 \cdot 10^2$ <sup>a</sup>	$7.33 \cdot 10^4 \pm 1.44 \cdot 10^4$ <sup>a</sup>	$4.96 \cdot 10^4 \pm 4.02 \cdot 10^4$ <sup>a</sup>
ยีสต์				
	6	$6.67 \cdot 10^3 \pm 6.67 \cdot 10^3$ <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>
	24	$3.30 \cdot 10^3 \pm 2.38 \cdot 10^3$ <sup>a</sup>	$1.07 \cdot 10^3 \pm 1.33 \cdot 10^2$ <sup>a</sup>	$1.20 \cdot 10^3 \pm 6.43 \cdot 10^2$ <sup>a</sup>
	48	$1.36 \cdot 10^3 \pm 4.39 \cdot 10^2$ <sup>a</sup>	$1.69 \cdot 10^3 \pm 1.15 \cdot 10^3$ <sup>a</sup>	$9.58 \cdot 10^2 \pm 3.04 \cdot 10^2$ <sup>a</sup>
	72	$5.00 \cdot 10^2 \pm 1.68 \cdot 10^2$ <sup>a</sup>	$2.13 \cdot 10^2 \pm 1.69 \cdot 10^2$ <sup>a</sup>	$4.03 \cdot 10^2 \pm 7.30 \cdot 10^1$ <sup>a</sup>

หมายเหตุ ตัวอักษรที่ต่างกันและอยู่ในแถวเดียวกันหมายถึงปริมาณเชื้อมีความแตกต่างกัน  
อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ )

เวลา 48 ชั่วโมงและลดปริมาณลงประมาณ 10-100 เท่า ที่ 72 ชั่วโมง โดยไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างปริมาณเชื้อที่ความเค็มทั้ง 3 ระดับ พบไวรัสโอโคโลนีสีเหลืองที่ชั่วโมงที่ 6 ในปริมาณที่ใกล้เคียงกันทั้ง 3 ความเค็ม ( $3.54 \times 10^8$ ,  $2.86 \times 10^8$  และ  $7.05 \times 10^8$  CFUs/mL) และมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมากโดยมีปริมาณค่อนข้างคงที่โดยไม่มี ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างความเค็มทั้ง 3 ระดับตลอดการทดลองที่สิ้นสุดเมื่อ 72 ชั่วโมง ( $1.02 \times 10^8$ ,  $1.02 \times 10^7$  และ  $1.55 \times 10^8$  CFUs/mL) นอกจากนี้ยังพบเชื้อยีสต์ที่ 6 ชั่วโมง โดยมีปริมาณลดลงเรื่อยๆ ไม่มากนักที่ 24 48 และเมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 72 ชั่วโมง โดยไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญตลอดการทดลอง (ตารางที่ 5)

ค่า pH ที่วัดจากน้ำที่เลี้ยงกุ้งกุลาดำโดยเสริมแบคทีเรียโพรไบโอติกทั้ง 3 ระดับความเค็ม มีค่าเริ่มต้นไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่ภายหลังจากที่ใส่เชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกลงไปปรากฏว่าค่า pH ลดลงทันที รวมทั้งมีความแตกต่างกันระหว่างความเค็มทั้ง 3 ระดับ โดยค่า pH ที่ 5 ppt (7.04) มีค่ามากกว่าที่ 15 (6.88) และ 30 ppt (6.85) และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วย ( $P < 0.05$ ) และลดลงต่ำสุดที่ 6 ชั่วโมง (6.61, 6.71 และ 6.69) โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ หลังจากนั้น ค่า pH เริ่มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลองเมื่อ 72 ชั่วโมง จึงมีค่าใกล้เคียงกับค่า pH เริ่มต้นโดยไม่พบความแตกต่าง (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 5 ค่าเฉลี่ยปริมาณเชื้อแต่ละชนิด (CFUs/g) ในลำไส้กุ้งกุลาดำเสริมโพรไบโอติกที่  
เวลาก่อนใส่เชื้อ 0 24 48 72 ชั่วโมง

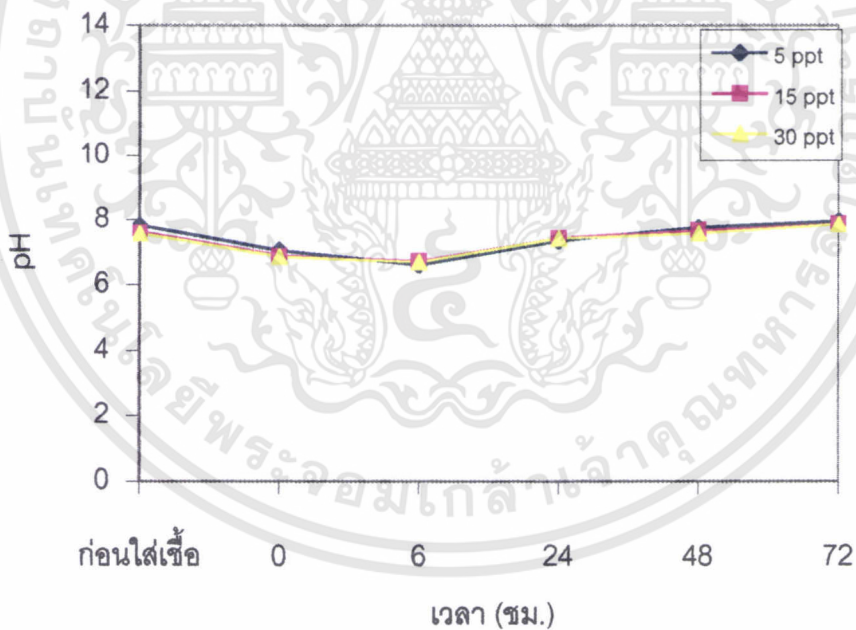
ชนิดของเชื้อ	เวลา (ชม.)	ความเค็ม (ppt)		
		5	15	30
<i>L. acidophilus</i>				
	6	$3.09 \cdot 10^6 \pm 6.14 \cdot 10^5$ <sup>a</sup>	$4.42 \cdot 10^6 \pm 7.52 \cdot 10^5$ <sup>a</sup>	$4.48 \cdot 10^6 \pm 8.54 \cdot 10^5$ <sup>a</sup>
	24	$1.84 \cdot 10^6 \pm 1.25 \cdot 10^6$ <sup>a</sup>	$2.49 \cdot 10^6 \pm 1.48 \cdot 10^6$ <sup>a</sup>	$8.18 \cdot 10^5 \pm 1.31 \cdot 10^5$ <sup>a</sup>
	48	$6.27 \cdot 10^4 \pm 2.52 \cdot 10^4$ <sup>a</sup>	$2.59 \cdot 10^5 \pm 1.17 \cdot 10^5$ <sup>a</sup>	$3.39 \cdot 10^5 \pm 1.35 \cdot 10^5$ <sup>a</sup>
	72	$1.03 \cdot 10^5 \pm 5.01 \cdot 10^4$ <sup>a</sup>	$8.10 \cdot 10^3 \pm 4.20 \cdot 10^3$ <sup>a</sup>	$2.64 \cdot 10^4 \pm 1.08 \cdot 10^4$ <sup>a</sup>
<i>Vibrio harveyi</i>				
	48	$4.29 \cdot 10^9 \pm 3.76 \cdot 10^9$ <sup>a</sup>	$4.59 \cdot 10^8 \pm 1.65 \cdot 10^8$ <sup>a</sup>	$5.67 \cdot 10^8 \pm 5.35 \cdot 10^7$ <sup>a</sup>
	72	$1.98 \cdot 10^7 \pm 1.68 \cdot 10^7$ <sup>a</sup>	$6.85 \cdot 10^6 \pm 1.42 \cdot 10^6$ <sup>a</sup>	$1.11 \cdot 10^8 \pm 3.77 \cdot 10^7$ <sup>a</sup>
ไวรัสโคโรนาไวรัสเหลือง				
	6	$3.54 \cdot 10^8 \pm 1.94 \cdot 10^8$ <sup>a</sup>	$2.86 \cdot 10^8 \pm 1.84 \cdot 10^8$ <sup>a</sup>	$7.05 \cdot 10^8 \pm 3.73 \cdot 10^7$ <sup>a</sup>
	24	$6.02 \cdot 10^8 \pm 3.35 \cdot 10^8$ <sup>a</sup>	$4.36 \cdot 10^8 \pm 2.43 \cdot 10^8$ <sup>a</sup>	$1.43 \cdot 10^9 \pm 1.90 \cdot 10^8$ <sup>a</sup>
	48	$6.76 \cdot 10^8 \pm 3.15 \cdot 10^8$ <sup>a</sup>	$4.32 \cdot 10^8 \pm 1.55 \cdot 10^8$ <sup>a</sup>	$1.76 \cdot 10^9 \pm 5.13 \cdot 10^8$ <sup>a</sup>
	72	$1.02 \cdot 10^8 \pm 5.10 \cdot 10^7$ <sup>a</sup>	$1.02 \cdot 10^7 \pm 4.86 \cdot 10^7$ <sup>a</sup>	$1.55 \cdot 10^8 \pm 3.02 \cdot 10^7$ <sup>a</sup>
ยีสต์				
	6	$1.90 \cdot 10^6 \pm 9.22 \cdot 10^5$ <sup>a</sup>	$3.22 \cdot 10^5 \pm 6.70 \cdot 10^4$ <sup>a</sup>	$1.74 \cdot 10^5 \pm 2.14 \cdot 10^4$ <sup>a</sup>
	24	$2.49 \cdot 10^5 \pm 6.74 \cdot 10^4$ <sup>a</sup>	$5.90 \cdot 10^5 \pm 4.67 \cdot 10^5$ <sup>a</sup>	$6.99 \cdot 10^4 \pm 2.87 \cdot 10^4$ <sup>a</sup>
	48	$3.48 \cdot 10^4 \pm 1.48 \cdot 10^4$ <sup>a</sup>	$5.48 \cdot 10^4 \pm 1.55 \cdot 10^4$ <sup>a</sup>	$5.53 \cdot 10^4 \pm 2.16 \cdot 10^4$ <sup>a</sup>
	72	$8.26 \cdot 10^4 \pm 4.42 \cdot 10^4$ <sup>a</sup>	$7.64 \cdot 10^4 \pm 5.14 \cdot 10^4$ <sup>a</sup>	$3.29 \cdot 10^4 \pm 3.29 \cdot 10^3$ <sup>a</sup>

หมายเหตุ ตัวอักษรที่ต่างกันและอยู่ในแถวเดียวกันหมายถึงปริมาณเชื้อมีความแตกต่างกัน  
อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ )

ตารางที่ 6 pH ในน้ำที่เลี้ยงกุ้งกุลาดำเสริมโพสไบโอติก

เวลา (ชม.)	ความเค็ม (ppt)		
	5	15	30
ก่อนใส่เชื้อ	7.81±0.02 <sup>a</sup>	7.59±0.06 <sup>a</sup>	7.57±0.03 <sup>a</sup>
0	7.04±0.02 <sup>a</sup>	6.88±0.02 <sup>b</sup>	6.85±0.04 <sup>b</sup>
24	6.61±0.01 <sup>a</sup>	6.71±0.03 <sup>a</sup>	6.69±0.01 <sup>a</sup>
48	7.34±0.02 <sup>a</sup>	7.39±0.00 <sup>a</sup>	7.41±0.00 <sup>a</sup>
72	7.74±0.05 <sup>a</sup>	7.66±0.03 <sup>a</sup>	7.56±0.03 <sup>a</sup>
96	7.49±0.04 <sup>a</sup>	7.86±0.02 <sup>a</sup>	7.84±0.02 <sup>a</sup>

หมายเหตุ ตัวอักษรที่ต่างกันและอยู่ในแถวเดียวกันหมายถึงปริมาณเชื้อมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ )



ภาพที่ 6 ค่า pH ของน้ำที่เลี้ยงกุ้งกุลาดำที่เปลี่ยนแปลงในแต่ละช่วงเวลา

## สรุป

1. เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง คือ *Lactobacillus acidophilus* ,*L. plantalum* , *L. pentosus* , *Pediococcus* sp. และ *Vibrio hareyi* ( D 1526 ) สามารถอยู่ในน้ำที่มีความเค็ม 15 ppt ได้ดีกว่าที่ 30 ppt
2. เชื้อแบคทีเรีย *L. acidophilus* สามารถเจริญเติบโตอยู่ในน้ำได้นานกว่าแบคทีเรียชนิดอื่น โดยมีปริมาณลดลงจากขณะใส่เชื้อประมาณ 1000 เท่า
3. เชื้อแบคทีเรียที่ความเข้มข้น  $10^5$  และ  $10^6$  CFUs/mL ที่เวลา 48 ชั่วโมง มีปริมาณที่ไม่มีความแตกต่างกัน การใช้แบคทีเรียที่ความเข้มข้น  $10^5$  CFUs/mL จึงเป็นการลดต้นทุนในการนำไปใช้ในบ่อเลี้ยง
4. เชื้อแบคทีเรีย *L. acidophilus* สามารถเจริญเติบโตอยู่ในน้ำที่เลี้ยงกุ้งกุลาดำและในลำไส้กุ้งกุลาดำได้นานถึง 72 ชั่วโมง โดยมีปริมาณลดลงจากเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นประมาณ 100 – 1000 เท่า
5. พบไวรัสโอโคโลนิสสีเหลืองซึ่งเป็นแบคทีเรียชนิดที่ไม่ก่อโรคในน้ำที่เลี้ยงกุ้งกุลาดำและในลำไส้กุ้งกุลาดำตลอดการทดลอง โดยแบคทีเรียมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วที่ 6 ชั่วโมง และลดลงเรื่อยๆ จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลองที่ 72 ชั่วโมง
7. ค่า pH ในน้ำที่เลี้ยงกุ้งกุลาดำลดต่ำลงหลังจากที่ใส่เชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกในชั่วโมงที่ 6 นั้นจึงเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนถึงที่ 48 ชั่วโมงจึงมีค่าใกล้เคียงกับค่า pH เริ่มต้น ซึ่งค่า pH ตลอดการทดลองเป็นค่าที่ไม่เป็นอันตรายต่อกุ้งกุลาดำ

เชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus acidophilus* เหมาะที่จะนำมาใช้เป็นโพรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ เนื่องจากไม่พบความแตกต่างของปริมาณเชื้อแบคทีเรียระหว่างความเค็มในระดับต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับการเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่มีความเค็มที่ระดับต่าง ๆ ในปัจจุบัน และสามารถใช้แบคทีเรียที่มีความเข้มข้นในน้ำที่ใช้เลี้ยง  $10^5$ CFU/mL เพื่อเป็นการประหยัดต้นทุนเนื่องจากเชื้อสามารถคงอยู่ในลำไส้ได้เป็นเวลานานและมีปริมาณลดลงไม่มากนัก

### เอกสารอ้างอิง

กิจการ ศุภมาตย์. 2540. โพรไบโอติกกับอนาคตการเลี้ยงกุ้งไทย. *วารสารสัตว์น้ำ*. 8(90) : 28-30.

บุญเสริม วิทย์ชำนานุกุล. ความรู้ใหม่ๆเกี่ยวกับโรคเรืองแสงในกุ้งกุลาดำ. 2542. *วารสารข่าวกุ้ง*. 10(130) : 2-3.

ฝ่ายวิชาการและพัฒนาผลิตภัณฑ์ บริษัท เกรทเทอร์ เวท จำกัด. 2542. แบบคดีเรียเรื่องแสงกับการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. *วารสารเพื่อนชาวกุ้ง*. 1(4) : 20-21.

พิทูล จิรวาณิชไพศาล. 2543. โพรไบโอติกคืออะไร ทำไมต้องเป็นโพรไบโอติกด้วย. *วารสารข่าวสารรมบ่อ*. (พฤษภาคม) : 21-24.

ไม่ปรากฏชื่อผู้แต่ง. 2543. โพรไบโอติกกับการเลี้ยงกุ้งปี 2000. *วารสารกุ้งอาเซียน*. 5(9) : 15-19.

ไม่ปรากฏชื่อผู้แต่ง ก. 2541. ปัญหาโรคไวรัสโรเรืองแสงและการควบคุม. *วารสารข่าวกุ้ง*. 9(118) : 2-3.

ไม่ปรากฏชื่อผู้แต่ง ข. 2541. ไอโซน จุลินทรีย์ สมุนไพร สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันและวัคซีนไฮเทคโนโลยีที่มาแรง. *วารสารสัตว์น้ำ*. 9(108) : 57-64.

ไม่ปรากฏชื่อผู้แต่ง. 2541. ระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ. *วารสารสัตว์น้ำ*. 10(117) : 37-40.

ลิลลา เรืองบ้าน. 2541. แบบคดีเรียเรื่องแสงกับการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. *วารสารสัตว์น้ำ*. 10(112) : 21-24.

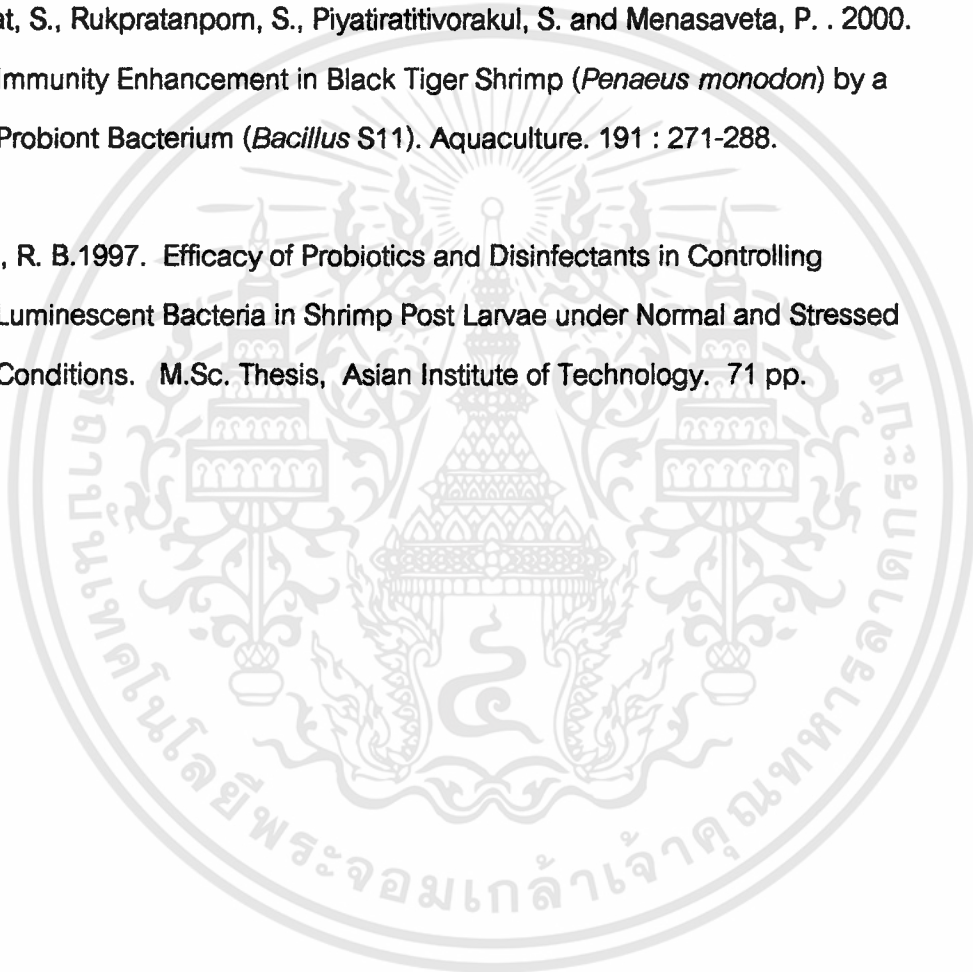
Gatesoupe, F. J. 1999. The Use of Probiotics in Aquaculture. *Aquaculture*. 180(1-2) : 147-165.

Prayitno, S. B. and Latchford, J. W. 1995. Experimental Infections of Crustaceans with Luminous Bacteria Related to *Photobacterium* and *Vibrio* . Effect of Salinity and pH on infectiosity. *Aquaculture*. 132(1-2) : 105-112.

Rengpipat, S., Phainphak, W., Piyatiratitivorakul, S., Menasaveta, P. 1998. Effects of Probiotic Bacterium on Black Tiger Shrimp *Penaeus monodon* Survival and Growth. *Aquaculture*. 167(3-4) : 301-313.

Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitivorakul, S. and Menasaveta, P. . 2000. Immunity Enhancement in Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) by a Probiotic Bacterium (*Bacillus* S11). *Aquaculture*. 191 : 271-288.

Shivappa, R. B.1997. Efficacy of Probiotics and Disinfectants in Controlling Luminescent Bacteria in Shrimp Post Larvae under Normal and Stressed Conditions. M.Sc. Thesis, Asian Institute of Technology. 71 pp.



## ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ (CFUs/mL) ในน้ำที่ความเค็ม 15 และ 30 ppt

ความเค็ม (ppt)	ชนิดแบคทีเรีย	เวลา (ชม.)				
		0	24	48	72	96
15	<i>L. acidophilus</i>	8.04E+05	8.28E+05	1.80E+03	6.80E+02	0.00E+00
		6.00E+05	6.68E+05	2.90E+04	4.88E+02	4.00E+02
		8.04E+05	8.38E+05	2.84E+04	1.83E+02	0.00E+00
	<i>L. panthalum</i>	3.80E+05	1.00E+02	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
		3.12E+05	2.00E+02	5.30E+04	0.00E+00	0.00E+00
		1.56E+05	1.40E+02	2.00E+02	0.00E+00	0.00E+00
	<i>L. pentosus</i>	4.60E+05	1.44E+05	1.00E+02	0.00E+00	0.00E+00
		3.90E+05	1.11E+05	1.75E+02	0.00E+00	0.00E+00
		3.98E+05	8.20E+05	1.00E+02	0.00E+00	0.00E+00
	<i>Pediococcus sp.</i>	3.98E+05	1.09E+04	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
		2.94E+05	9.80E+03	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
		4.82E+05	5.62E+03	2.00E+02	1.00E+02	0.00E+00
	<i>Vibrio harveyi</i>	1.54E+06	4.34E+05	3.00E+03	0.00E+00	0.00E+00
		1.16E+06	7.07E+05	1.40E+03	0.00E+00	0.00E+00
		1.52E+06	6.57E+04	1.33E+03	0.00E+00	0.00E+00
30	<i>L. acidophilus</i>	9.92E+05	5.10E+05	3.50E+04	1.00E+02	0.00E+00
		9.94E+05	6.38E+05	6.90E+03	1.00E+02	1.00E+02
		9.48E+05	3.58E+05	1.70E+04	1.00E+02	0.00E+00
	<i>L. panthalum</i>	1.56E+05	1.40E+02	2.00E+02	0.00E+00	0.00E+00
		3.52E+05	1.50E+02	1.00E+02	0.00E+00	0.00E+00
		3.14E+05	1.00E+02	1.00E+02	0.00E+00	0.00E+00

ตารางผนวกที่ 1 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ (CFUs/mL) ในน้ำที่ความเค็ม 15 และ 30 ppt (ต่อ)

ความเค็ม (ppt)	ชนิดแบคทีเรีย	เวลา (ชม.)				
		0	24	48	72	96
	<i>L. pentosus</i>	4.02E+05	1.46E+05	7.40E+02	0.00E+00	0.00E+00
		6.10E+05	1.62E+05	3.00E+02	0.00E+00	0.00E+00
		4.50E+05	1.55E+05	7.20E+02	0.00E+00	0.00E+00
	<i>Pediococcus sp.</i>	5.44E+05	1.13E+04	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
		5.20E+05	3.72E+04	1.00E+02	0.00E+00	0.00E+00
		3.54E+05	6.22E+03	1.00E+02	0.00E+00	0.00E+00
	<i>Vibrio harveyi</i>	1.18E+06	6.00E+04	1.67E+03	0.00E+00	0.00E+00
		1.44E+06	1.50E+04	1.00E+02	0.00E+00	0.00E+00
		7.20E+06	2.57E+04	1.00E+02	0.00E+00	0.00E+00

ตารางผนวกที่ 2 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ (CFUs/mL) ในน้ำที่ความเข้มข้น  $10^5$  และ  $10^6$  CFUs/mL

ความเข้มข้น CFUs/mL	ชนิดแบคทีเรีย	เวลา (ชม.)				
		0	24	48	72	
$10^5$	<i>L. acidophilus</i>	2.50E+04	1.46E+05	3.00E+02	1.67E+02	
		3.36E+05	4.78E+04	2.50E+02	1.75E+02	
		3.54E+05	6.40E+03	1.00E+02	0.00E+00	
	<i>L. panthalam</i>	2.02E+05	1.06E+05	1.00E+01	0.00E+00	
		2.00E+05	3.84E+04	1.33E+03	0.00E+00	
		1.64E+05	1.32E+04	1.00E+02	0.00E+00	
	<i>L. pentosus</i>	2.14E+05	8.20E+03	2.00E+02	0.00E+00	
		1.74E+05	2.42E+04	1.00E+02	0.00E+00	
		1.94E+05	1.94E+04	1.00E+02	0.00E+00	
	<i>Pediococcus</i> sp.	4.52E+05	1.84E+05	2.80E+02	2.00E+02	
		5.53E+05	1.34E+05	1.00E+02	1.50E+02	
		5.64E+05	1.10E+05	4.40E+02	0.00E+00	
	$10^6$	<i>L. acidophilus</i>	3.14E+06	1.18E+06	4.00E+02	1.67E+02
			3.16E+06	1.02E+06	4.00E+02	3.00E+02
			3.72E+06	1.28E+06	2.00E+02	1.33E+02
<i>L. panthalam</i>		2.20E+06	6.38E+05	1.75E+02	0.00E+00	
		1.84E+06	1.98E+05	1.00E+02	0.00E+00	
		2.04E+06	3.36E+05	0.00E+00	0.00E+00	
<i>L. pentosus</i>		2.16E+06	9.40E+04	1.26E+03	1.50E+02	
		2.10E+05	5.46E+05	4.50E+02	1.00E+02	
		2.00E+06	4.16E+05	3.60E+02	2.00E+02	
<i>Pediococcus</i> sp.		4.40E+06	1.84E+06	6.00E+02	4.00E+02	
		5.00E+06	1.54E+06	4.20E+02	3.00E+02	
		5.00E+06	9.30E+05	1.25E+02	3.75E+02	

ตารางผนวกที่ 3 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ (CFUs/mL) ในน้ำที่เลี้ยงกุ้งกุลาดำเสริมโพรไบโอติก

ชนิดแบคทีเรีย	เวลา (ชม.)	ความเค็ม (ppt)		
		5	15	30
<i>L. acidophilus</i>				
	0	1.80E+06	1.98E+06	1.96E+06
		2.13E+06	1.62E+06	1.64E+06
		2.00E+05	1.60E+06	1.68E+06
	24	1.35E+06	6.40E+05	2.00E+05
		6.20E+05	1.10E+06	1.40E+05
		3.80E+05	6.80E+06	1.20E+05
	48	1.54E+03	9.40E+03	3.00E+03
		5.80E+03	7.40E+03	1.40E+03
		1.60E+04	9.60E+03	5.40E+03
	72	4.00E+03	6.00E+02	2.33E+02
		4.40E+02	3.60E+02	2.20E+02
		1.28E+03	3.00E+02	4.80E+02
	96	7.60E+02	2.00E+02	1.33E+02
		4.60E+02	0.00E+00	1.00E+02
		5.00E+02	1.00E+02	2.00E+02
<i>V. harveyi</i>				
	24	4.60E+04	1.20E+04	0.00E+00
		6.00E+04	2.80E+04	0.00E+00
		5.40E+04	0.00E+00	2.80E+04
	48	5.80E+03	2.20E+04	2.00E+03
		4.30E+04	6.00E+03	1.20E+04
		4.82E+05	9.40E+04	6.20E+04
	72	5.60E+03	2.60E+04	2.20E+03
		5.70E+03	2.20E+04	1.02E+04
		5.60E+03	1.40E+04	1.10E+05

ตารางผนวกที่ 3 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ (CFUs/mL) ในน้ำที่เลี้ยงกึ่งกลาดำเสริมโพรไบโอติก (ต่อ)

ชนิดแบคทีเรีย	เวลา (ชม.)	ความเค็ม (ppt)			
		5	15	30	
ไวรัสโคโคไลนีสี่เหลี่ยม	ก่อนใส่เชื้อ	5.80E+03	3.00E+04	5.80E+03	
		2.00E+03	6.80E+03	3.00E+03	
		7.80E+03	2.12E+04	2.20E+03	
	0	2.00E+03	1.24E+04	8.20E+03	
		6.00E+03	1.22E+04	3.00E+03	
		1.20E+04	2.20E+04	6.00E+03	
	24	3.32E+06	1.56E+06	6.00E+05	
		2.00E+05	2.18E+06	2.00E+05	
		1.94E+06	2.18E+06	2.40E+05	
	48	2.00E+04	4.40E+04	5.60E+04	
		1.40E+04	5.80E+05	4.00E+04	
		2.60E+04	1.34E+05	2.40E+04	
	72	1.12E+04	3.60E+04	1.28E+04	
		6.20E+03	7.60E+04	7.40E+04	
		5.00E+04	1.92E+05	7.80E+04	
	96	8.40E+03	6.20E+04	6.80E+03	
		8.20E+03	1.02E+05	1.20E+04	
		8.00E+03	5.60E+04	1.30E+05	
	ยีสต์	6	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
			0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
			2.00E+04	0.00E+00	0.00E+00
24		3.00E+02	1.20E+03	1.00E+03	
		1.60E+03	8.00E+02	2.00E+02	
		8.00E+03	1.20E+03	2.40E+03	

ตารางผนวกที่ 3 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ (CFUs/mL) ในน้ำที่เลี้ยงกึ่งกลาดำเสริมโพรไบโอติก (ต่อ)

ชนิดแบคทีเรีย	เวลา (ชม.)	ความเค็ม (ppt)		
		5	15	30
	48	1.50E+03	5.00E+02	3.75E+02
		5.40E+02	4.00E+03	1.10E+03
		2.04E+03	5.75E+02	1.40E+03
	72	2.20E+02	5.40E+02	5.00E+02
		8.00E+02	0.00E+00	4.50E+02
		4.80E+02	1.00E+02	2.60E+02



ตารางผนวกที่ 4 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ (CFUs/g) ในลำไส้กุ้งกุลาดำเสริมโพรไบโอติก

ชนิดแบคทีเรีย	เวลา (ชม.)	ความเค็ม (ppt)		
		5	15	30
<i>L. acidophilus</i>				
	6	2.20E+06	5.33E+06	4.15E+06
		2.81E+06	5.01E+06	3.20E+06
		4.27E+06	2.93E+06	6.10E+06
	24	4.31E+06	5.62E+05	1.05E+06
		8.62E+05	5.39E+06	8.07E+05
		3.33E+05	1.51E+06	5.98E+05
	48	5.65E+04	3.10E+05	3.24E+05
		1.09E+05	4.32E+05	1.12E+05
		2.25E+04	3.50E+04	5.80E+05
	72	9.04E+04	1.57E+04	4.75E+04
		1.95E+05	1.20E+03	2.01E+04
		2.28E+04	7.40E+03	1.16E+04
<i>V. harveyi</i>				
	48	2.87E+08	7.08E+08	5.37E+08
		1.18E+10	1.46E+08	6.71E+08
		7.70E+08	5.22E+08	4.93E+08
	72	5.57E+06	8.45E+06	4.76E+07
		5.32E+07	8.08E+06	1.78E+08
		5.70E+05	4.03E+06	1.08E+08
ไวรัสโคโรนาที่สี่เหลี่ยม				
	6	7.90E+07	1.24E+08	3.85E+08
		7.29E+08	1.82E+08	1.99E+08
		2.53E+08	5.52E+08	1.53E+09
	24	1.26E+09	3.38E+08	1.17E+09
		1.62E+08	7.43E+07	1.32E+09
		3.84E+08	8.97E+08	1.80E+09

ตารางผนวกที่ 4 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ (CFUs/g) ในลำไส้กุ้งกุลาดำเสริมโพรไบโอติก (ต่อ)

ชนิดแบคทีเรีย	เวลา (ชม.)	ความเค็ม (ppt)		
		5	15	30
ยีสต์	48	4.72E+07	2.12E+08	1.58E+09
		9.51E+08	7.32E+08	2.72E+09
		1.03E+09	3.51E+08	9.68E+08
	72	2.02E+08	7.01E+07	1.76E+08
		6.82E+07	1.89E+08	9.50E+07
		3.52E+07	2.65E+07	1.93E+08
	6	5.17E+05	4.53E+05	1.34E+05
		3.65E+06	2.81E+05	2.07E+05
		1.54E+06	2.32E+05	1.81E+05
	24	3.50E+05	5.62E+04	5.62E+04
		2.75E+05	1.52E+06	1.25E+05
		1.21E+05	1.95E+05	2.85E+04
48	8.15E+03	4.20E+04	6.89E+04	
	3.69E+04	8.56E+04	1.29E+04	
	5.94E+04	3.69E+04	8.40E+04	
72	1.58E+05	4.46E+04	2.63E+04	
	8.47E+04	1.77E+05	3.57E+04	
	5.04E+03	7.60E+03	3.66E+04	

ตารางผนวกที่ 5 ค่า pH ในน้ำที่เลี้ยงกุ้งกุลาดำเสริมโพรไบโอติก

เวลา (ชม.)	ความเค็ม (ppt)		
	5	15	30
ก่อนใส่เชื้อ	7.77	7.66	7.55
	7.79	7.42	7.65
	7.87	7.7	7.52
0	6.99	6.88	6.76
	7.05	6.84	6.93
	7.07	6.93	6.87
6	6.64	6.63	6.67
	6.61	6.71	6.7
	6.58	6.79	6.71
24	7.28	7.39	7.41
	7.37	7.39	7.41
	7.37	7.41	7.41
48	7.61	7.59	7.48
	7.79	7.71	7.61
	7.83	7.69	7.6
72	7.84	7.81	7.8
	8	7.88	7.9
	8	7.88	7.83