สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การใช้โปรไบโอติก (PondSafe) ในการอนุบาลลูกกุ้งขาวแวนนาไม

USING PROBIOTIC (PondSafe) IN NURSING PACIFIC WHITE SHRIMP (*Litopenaeus vannamei*) LARVAE

T119619

ยุทธพล คงกระจ่าง

YUTTAPON KONGKRAJANG

b.12351221
i.
ว.ม. ย.2554
เลขหมู่ 2554
เลขทะเบียน 119619
วัน,เดือน,ปี - 8 S.A. 2554

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การประมง

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2554

KMITL-2011-AG-M-081-095

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

USING PROBIOTIC (PondSafe) IN NURSING PACIFIC WHITE SHRIMP (*Litopenaeus vannamei*) LARVAE

YUTTAPON KONGKRAJANG

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE IN FISHERIES SCIENCE

FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2011

KMITL-2011-AG-M-081-095

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COPYRIGHT 2011

FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การใช้โปรไบโอติก (PondSafe) ในการอนุบาลลูกกุ้งขาวแวนนาไม
นักศึกษา	นายยุทธพล คงกระจ่าง
รหัสประจำตัว	51065910
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การประมง
พ.ศ.	2554
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ.ดร.นงนุช เลาหะวิสุทธิ์

บทคัดย่อ

การศึกษาการใช้โปรไบโอติก PondSafe ประกอบด้วยแบคทีเรีย *Bacillus* 5 สายพันธุ์ได้แก่ *Bacillus amyloliquefaciens, B. licheniformis, B. subtilis, B. megaterium* และ *B. pumilus* ในการอนุบาลลูกกุ้งขาวแวนนาไม โดยแบ่งเป็น 4 การทดลอง การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของโปรไบโอติกต่อการยับยั้งแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ในห้องปฏิบัติการ โดยการใช้ยาปฏิชีวนะออกซีเตตร้าซัยคลิน 30 ไมโครกรัม และผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก PondSafe $1x10^4$, $1x10^5$ และ $1x10^6$ CFU/กรัม พบว่า การเกิดวงใสในการยับยั้งแบคทีเรีย *V. harveyi* ของชุดการทดลองที่ใช้ผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก PondSafe $1x10^4$, $1x10^5$ และ $1x10^6$ CFU/กรัม มีค่าไม่ต่างกับชุดการทดลองที่ใช้ยาปฏิชีวนะออกซีเตตร้าซัยคลิน 30 ไมโครกรัม ($P>0.05$) ที่ระยะเวลา 72, 60 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของอุณหภูมิและความเข้มข้นโปรไบโอติก ต่ออัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติกในการผสมอาหารผงสำเร็จรูป โดยนำอาหารกุ้งผสมโปรไบโอติก 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม แล้วนำไปผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง (29±2 °C) และอบที่อุณหภูมิ 40, 60 และ 80 °C พบว่า จำนวนอัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติกในอาหาร ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ในทุกอุณหภูมิของแต่ละชุดการทดลอง และชุดการทดลองอาหารกุ้งผสมโปรไบโอติก 5 กรัม/กิโลกรัม มีจำนวนอัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติกในอาหารมากที่สุดคือ $29.30\pm0.06x10^5$ CFU/กรัม ($P<0.05$) การทดลองที่ 3 ศึกษาผลของระยะเวลาการเก็บรักษาอาหาร ต่ออัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติกในการผสมอาหารผงสำเร็จรูป โดยนำอาหารกุ้งผสมโปรไบโอติก 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 29±2 °C เป็นระยะเวลา 5 เดือน พบว่า จำนวนอัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติกในอาหารของแต่ละชุดการทดลอง ลดลงหลังจากผ่านระยะเวลา 5 เดือน ($P<0.05$) ยกเว้นอาหารกุ้งที่ไม่ผสมโปรไบโอติก ไม่มีแบคทีเรียเกิดขึ้นในอาหาร การทดลองที่ 4 ศึกษาผลของโปรไบโอติกที่ใช้ผสมในอาหารผงสำเร็จรูป ต่อการเจริญเติบโต และการยับยั้งแบคทีเรีย *Vibrio* ในลูกกุ้งขาวแวนนาไม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยใช้อาหารผสมโปรไบโอติก 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม ในการอนุบาลลูกกุ้งเป็นระยะเวลา 28 วัน พบว่า การเจริญเติบโตของลูกกุ้งที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) แต่มีค่ามากกว่าลูกกุ้งที่ไม่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ส่วนจำนวนแบคทีเรีย *Vibrio* ที่เกิดในลูกกุ้ง พบว่า ค่าเฉลี่ยจำนวนแบคทีเรีย *Vibrio* ที่เกิดในลูกกุ้งที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) แต่มีค่าน้อยกว่าลูกกุ้งที่ไม่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Using Probiotic (PondSafe) in Nursing Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Larvae
Student	Mr. Yuttapon Kongkrajang
Student ID	51065910
Degree	Master of Science
Program	Fisheries Science
Year	2011
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Nongnuch Laohavissuti

ABSTRACT

The study on effect of using a commercial probiotic product; the probiotic PondSafe which composed of bacteria *Bacillus* 5 strains. There were *Bacillus amyloliquefaciens, B. licheniformis, B. subtilis, B. megaterium and B. pumilus* on nursing performance of Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei* larvae. Therefore, four experiments were conducted. The first experiment was conducted in laboratory which aimed to evaluate efficiency of the probiotic Pondsafe towards inhibition of bacteria *Vibrio harveyi*. The probiotic PondSafe of live concentrations of $1x10^4$, $1x10^5$ and $1x10^6$ CFU/g together with antibiotic oxytetracycline 30 µg in each concentration of the probiotic PondSafe and also using oxytetracycline the same concentrations alone were applied as treatments. It was found that the clear zone of inhibition bacteria *V. harveyi* in treatments using the probiotic PondSafe of live concentrations of $1x10^4$, $1x10^5$ and $1x10^6$ CFU/g were no significantly different (P>0.05) from the oxytetracycline 30 µg after 72, 60 and 48 hours respectively. The second experiment aimed to determine effect of temperatures on survival rate of the probiotic PondSafe in shrimp's powder feed. The mixture of different concentrations of the probiotic PondSafe in feed of 0, 1, 3 and 5 g/kg feed before all mixed feed were air-dried at room temperature (29±2 °C). After that all mixed feeds were oven-dried at temperatures of 40, 60 and 80 °C. The results showed that the survival rate of the probiotic PondSafe in feeds had no statistical significantly (P>0.05). However, mixed feed with the probiotic PondSafe at concentration of 5 g/kg showed the highest survival rate of probiotic bacteria in feed ($29.30±0.06x10^5$ CFU/g) (P>0.05). The third experiment aimed to find out effect of duration in storage on survival probiotic bacteria in feed powder in which treatments were same as in second experiment. All mixed feeds were stored at 29±2 °C for a period of 5 months. It was found that a

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

survival rate of probiotic bacteria in feed of individual treatment was reduced after 5 months ($P<0.05$) exceptionally, treatment with no the probiotic PondSafe was no bacteria occurred in feed. The last experiment aimed to investigate effects of the probiotic PondSafe in shrimp's feed powder on growth and inhibition of bacteria *Vibrio* in Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei* larvae. The experimental feed with different concentrations of the probiotic PondSafe of 0, 1, 3 and 5 g/kg feed were used in nursing shrimp larvae for a period of 28 days. Even through, the results showed that the larvae fed with probiotic treatments gave no differences on growth performances ($P>0.05$), but higher significantly than that control which had fed no probiotics ($P<0.05$). The viable of bacteria *Vibrio* in larvae fed probiotic treatments were no significantly differences ($P>0.05$) and were less than treatment without the probiotic ($P<0.05$).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.นงนุช เลาหะวิสุทธิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำ และให้ความดูแลเอาใจใส่อย่างดีตลอดช่วงระยะเวลาที่ทำการทดลอง จนกระทั่งทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ และขอกราบขอบพระคุณอาจารย์หลักสูตรวิทยาศาสตร์การประมงทุกท่าน ที่ให้ความรู้ทางด้านวิชาการ ตลอดจนอบรมสั่งสอนในสิ่งที่ดีงามแก่ข้าพเจ้าเสมอมา

ขอขอบคุณ คุณบุปผา จงพัฒน์ คุณนภพล เผ่าพนัส และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่านที่ให้การช่วยเหลือในการเตรียมเครื่องมือ และอุปกรณ์ต่างๆ และคำแนะนำที่ดีตลอดมา

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนและน้องๆ ปริญญาโทและตรี ที่คอยช่วยเหลือ ทำให้การทดลองของข้าพเจ้าสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และบุคคลอันเป็นที่รักยิ่งของข้าพเจ้า ที่คอยให้กำลังใจและความช่วยเหลือข้าพเจ้าอย่างดีมาโดยตลอด จนทำให้ข้าพเจ้าได้เจอแต่สิ่งที่ดีๆ และมีอนาคตที่ดีในวันนี้ ขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงจากใจจริง

หากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีคุณค่า และมีประโยชน์ต่อการศึกษาค้นคว้าของผู้ที่สนใจ ข้าพเจ้าขอมอบให้แก่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

ยุทธพล คงกระจ่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... III

กิตติกรรมประกาศ..... V

สารบัญ..... VI

สารบัญตาราง..... IX

สารบัญภาพ..... X

บทที่ 1 บทนำ.....

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... 1

1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา..... 2

1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับ..... 2

บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....

2.1 กุ้งขาวแวนนาไม..... 3

2.2 แบคทีเรีย *Vibrio*..... 3

2.3 โปรไบโอติก..... 4

2.4 คุณสมบัติของโปรไบโอติก..... 5

2.5 กลไกการทำงานของโปรไบโอติก..... 6

2.6 สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่นำมาใช้เป็นโปรไบโอติก..... 7

2.6.1 แบคทีเรียกรดแลคติก..... 7

2.6.2 แบคทีเรียบาซิลลัส..... 10

2.6.3 แบคทีเรียสังเคราะห์แสง..... 12

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....

3.1 สัตว์และผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกทดลอง..... 16

3.2 อุปกรณ์และสารเคมี..... 16

3.3 วิธีดำเนินการทดลอง..... 17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล..... 24

3.5 สถานที่ทำการวิจัย..... 25

3.6 ระยะเวลาดำเนินการ..... 25

บทที่ 4 ผลการทดลอง.....

4.1 การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของโปรไบโอติก ต่อการยับยั้งแบคทีเรีย *V. harveyi* ในห้องปฏิบัติการ..... 26

4.1.1 ผลของยาปฏิชีวนะออกซีเตตร้าซัยคลิน และผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก PondSafe ต่อการเกิดวงใส (Clear zone) ในการยับยั้งแบคทีเรีย *V. harveyi* ในห้องปฏิบัติการ..... 26

4.2 การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของอุณหภูมิและความเข้มข้นโปรไบโอติก ต่ออัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติกในการผสมอาหารผงสำเร็จรูป..... 28

4.2.1 ผลของอุณหภูมิ ต่ออัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติกในการผสมอาหารผงสำเร็จรูป..... 28

4.2.2 ผลของความเข้มข้นโปรไบโอติก ต่ออัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติกในการผสมอาหารผงสำเร็จรูป..... 29

4.3 การทดลองที่ 3 ศึกษาผลของระยะเวลาการเก็บรักษาอาหาร ต่ออัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติกในการผสมอาหารผงสำเร็จรูป..... 30

4.3.1 ผลของระยะเวลาการเก็บรักษาอาหาร ต่ออัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติกในการผสมอาหารผงสำเร็จรูป..... 30

4.4 การทดลองที่ 4 ศึกษาผลของโปรไบโอติกที่ใช้ผสมในอาหารผงสำเร็จรูป ต่อการเจริญเติบโต และการยับยั้งแบคทีเรีย *Vibrio* ในลูกกุ้งขาวแวนนาไม..... 32

4.4.1 ผลของโปรไบโอติกที่ใช้ผสมในอาหารผงสำเร็จรูป ต่อการเจริญเติบโตของลูกกุ้งขาวแวนนาไม..... 32

4.4.2 ผลของโปรไบโอติกที่ใช้ผสมในอาหารผงสำเร็จรูป ต่อการยับยั้งแบคทีเรีย *Vibrio* ในลูกกุ้งขาวแวนนาไม..... 37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง..... 40

บทที่ 6 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ..... 48

บรรณานุกรม..... 49

ภาคผนวก..... 57

ประวัติผู้เขียน..... 90

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

4.1 การเกิดวงใสในการยับยั้งแบคทีเรีย *V. harveyi* (มิลลิเมตร) ในห้องปฏิบัติการ..... 27

4.2 จำนวนอัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติก ($x10^5$ CFU/กรัม) ที่ผสมลงในอาหาร 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม แล้วนำไปผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิ 29±2 °C และอบที่อุณหภูมิ 40, 60 และ 80 °C..... 29

4.3 จำนวนอัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติก ($x10^5$ CFU/กรัม) ที่ผสมลงในอาหาร 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม แล้วนำไปผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิ 29±2 °C..... 30

4.4 จำนวนอัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติก ($x10^5$ CFU/กรัม) ที่ผสมลงในอาหาร 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม ในระยะเวลาการเก็บรักษาอาหาร 5 เดือน..... 32

4.5 น้ำหนักของลูกกุ้งขาวแวนนาไม (มิลลิกรัม/ตัว) ที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม เป็นระยะเวลา 28 วัน..... 34

4.6 ความยาวของลูกกุ้งขาวแวนนาไม (เซนติเมตร/ตัว) ที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม เป็นระยะเวลา 28 วัน..... 34

4.7 อัตราการรอดตายลูกกุ้งขาวแวนนาไม (เปอร์เซ็นต์) ที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม หลังจากสิ้นสุดการทดลองเป็นระยะเวลา 28 วัน..... 36

4.8 จำนวนแบคทีเรียรวม ($x10^5$ CFU/กรัม) ที่เกิดในลูกกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมปรไบโอติก 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม เป็นระยะเวลา 28 วัน 38

4.9 จำนวนแบคทีเรีย *Vibrio* ($x10^4$ CFU/กรัม) ที่เกิดในลูกกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม เป็นระยะเวลา 28 วัน..... 39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

4.1 การเกิดวงใสในการยับยั้งแบคทีเรีย *V. harveyi* (มิลลิเมตร) ในห้องปฏิบัติการ..... 26

4.2 จำนวนอัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติก ($x10^5$ CFU/กรัม) ที่ผสมลงในอาหาร 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม แล้วนำไปผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิ 29±2 °C และอบที่อุณหภูมิ 40, 60 และ 80 °C..... 28

4.3 จำนวนอัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติก ($x10^5$ CFU/กรัม) ที่ผสมลงในอาหาร 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม ในระยะเวลาการเก็บรักษาอาหาร 5 เดือน..... 31

4.4 น้ำหนักของลูกกุ้งขาวแวนนาไม (มิลลิกรัม/ตัว) ที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม เป็นระยะเวลา 28 วัน..... 33

4.5 ความยาวของลูกกุ้งขาวแวนนาไม (เซนติเมตร/ตัว) ที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม เป็นระยะเวลา 28 วัน..... 34

4.6 อัตราการรอดตายลูกกุ้งขาวแวนนาไม (เปอร์เซ็นต์) ที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม หลังจากสิ้นสุดการทดลองเป็นระยะเวลา 28 วัน..... 36

4.7 จำนวนแบคทีเรียรวม ($x10^5$ CFU/กรัม) ที่เกิดในลูกกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมปรไบโอติก 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม เป็นระยะเวลา 28 วัน 37

4.8 จำนวนแบคทีเรีย *Vibrio* ($x10^4$ CFU/กรัม) ที่เกิดในลูกกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม เป็นระยะเวลา 28 วัน..... 38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ประเทศไทยนำกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) มาเลี้ยงในปี 2541 (ชลอ ลิ้มสุวรรณ และ พรเลิศ จันทร์รัชชกูล. 2547) ซึ่งเป็นช่วงแรกของการทดลองเลี้ยงจึงไม่ค่อยได้รับความสนใจเท่าที่ควร ประกอบกับการจัดหาพันธุ์กุ้งขณะนั้นมีความยากลำบากและมีราคาแพง ต่อมาการเลี้ยงกุ้งกุลาดำประสบกับปัญหาโรคระบาด การขาดแคลนพ่อแม่พันธุ์กุ้งที่มีคุณภาพดี และลูกกุ้งกุลาดำแคระแกรนเลี้ยงไม่โต แต่ราคาลูกกุ้งปรับตัวสูงขึ้น เกษตรกรจึงหันมาเลี้ยงกุ้งขาวกันมากขึ้น ปัจจุบันกุ้งขาวจึงเป็นสัตว์น้ำที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ และเป็นที่นิยมบริโภคของคนไทยและคนต่างประเทศ ทำให้กุ้งขาวกลายเป็นสินค้าส่งออกที่สำคัญที่ทำรายได้ให้กับประเทศมูลค่าปีละหลายหมื่นล้านบาท ส่วนการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวก็ได้มีการหันมาใช้แนวทางธรรมชาติและชีวภาพมากขึ้น โดยการใช้แบคทีเรียโปรไบโอติก ซึ่งเป็นวิธีหนึ่งที่ได้รับความสนใจอย่างมาก เนื่องจากโปรไบโอติกมีประโยชน์หลายประการคือ เป็นสารที่กระตุ้นภูมิคุ้มกัน ช่วยในการปรับปรุงคุณภาพของน้ำ (Panigrahi *et al.* 2005) ส่งเสริมโภชนาการที่มีประโยชน์ และส่งผลต่อสรีรวิทยาของสัตว์น้ำ โดยปรับเยื่อบุผิวและระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายให้อยู่ในสภาพสมดุล ซึ่งเป็นการป้องกันกลุ่มแบคทีเรียที่ก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร (Gatesoupe. 1999 ; Verchuere *et al.* 2000) การใช้เป็นสารอาหารเพิ่มเติมในอาหารเลี้ยงสัตว์ เมื่อสัตว์น้ำได้รับโปรไบโอติก จะช่วยรักษาระดับความสมดุลของจำนวนแบคทีเรียในท่อทางเดินอาหาร ทำให้ตัวอ่อนของสัตว์น้ำมีอัตราการรอดตาย และผลผลิตจากสัตว์น้ำเพิ่มมากขึ้น (Villamil *et al.* 2003) นอกจากนี้การใช้โปรไบโอติก ยังเป็นการเพาะเลี้ยงที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมอีกด้วย

โรคเรืองแสงในกุ้งขาวเกิดจากแบคทีเรีย *V. harveyi* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ ลักษณะรูปร่างเป็นท่อนสั้น (Farmer *et al.* 2005) สามารถเคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลา ต้องการสารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน เจริญเติบโตได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน แบคทีเรีย *V. harveyi* ทำให้เกิดความเสียหายแก่อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งขนาดใหญ่ในทวีปอเมริกาใต้ (Alvarez *et al.* 1998) ทวีปออสเตรเลีย (Pizzuto and Hirst. 1995) และทวีปเอเชีย (Jiravanichpaisal *et al.* 1994) โดยอาจทำให้ลูกกุ้งมีอัตราการตายได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรีย *V. harveyi* สามารถให้แสงสีเขียวแกมเหลืองออกมา โดยปฏิกิริยาทางเคมีที่เกิดจากเอนไซม์ลูซิเฟอเรส ซึ่งทำให้เรืองแสงได้ในที่มืด (Karunasagar *et al.* 1994 ; Robertson *et al.* 1998) แบคทีเรีย *V. harveyi* จะเพิ่มจำนวนเซลล์ได้อย่างรวดเร็วในน้ำที่มีความเค็มระหว่าง 10-40 พีพีที ที่อุณหภูมิน้ำสูงประมาณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

25-35 °C และค่าพีเอชของน้ำที่แบคทีเรียชนิดนี้เจริญเติบโตได้ดีคือ พีเอช 7-9 ลักษณะอาการของกุ้งที่ป่วย กุ้งจะขึ้นมาเกาะตามขอบบ่อหรือว่ายอยู่ที่ผิวน้ำ โดยกุ้งป่วยเหล่านี้จะเห็นการเรืองแสงที่ส่วนหัวได้อย่างชัดเจนในเวลากลางคืน และเมื่อนำกุ้งมาตรวจสอบโดยการนำส่วนของตับและตับอ่อน หรือนำเลือดกุ้งมาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ จะพบแบคทีเรียท่อนสั้นเคลื่อนที่ได้เป็นจำนวนมาก และเมื่อเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อทีซีบีเอส (TCBS agar) จะได้โคโลนีของแบคทีเรียเป็นชนิดสีเขียว ส่วนการตรวจสอบทางเนื้อเยื่อในกุ้งป่วย พบว่าส่วนของตับและตับอ่อนถูกทำลายอย่างรุนแรง ทำให้การย่อยอาหารไม่เป็นปกติ และอาหารที่สะสมไว้ในตับก็จะน้อยลง กุ้งเริ่มอ่อนแอและตายในที่สุด นอกจากนี้พบว่าลำไส้กุ้งเกิดเซลล์ตาย และมีอาการอักเสบอย่างเห็นได้ชัดเจนเช่นกัน (ชลอ ลิ้มสุวรรณ และ พรเลิศ จันทร์รัชชกูล. 2547)

การศึกษาครั้งนี้ทดสอบว่าโปรไบโอติก สามารถยับยั้งการเกิดโรคที่เกิดจากแบคทีเรีย *Vibrio* รวมถึงผลของโปรไบโอติกต่ออัตราการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายของกุ้งวัยอ่อน เพื่อนำโปรไบโอติกไปใช้สำหรับป้องกันโรคจากแบคทีเรีย *Vibrio* และเพิ่มผลผลิตในการเพาะเลี้ยงกุ้งวัยอ่อน และยังเป็นการลดการใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาโรคจากแบคทีเรีย

1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา

1.2.1 เพื่อศึกษาผลของโปรไบโอติก ต่อการยับยั้งแบคทีเรีย *V. harveyi* ในห้องปฏิบัติการ

1.2.2 เพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิและความเข้มข้นโปรไบโอติก ต่ออัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติกในการผสมอาหารผงสำเร็จรูป

1.2.3 เพื่อศึกษาผลของระยะเวลาการเก็บรักษาอาหาร ต่ออัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติกในการผสมอาหารผงสำเร็จรูป

1.2.4 เพื่อศึกษาผลของโปรไบโอติกที่ผสมในอาหารผงสำเร็จรูป ต่อการเจริญเติบโต และการยับยั้งแบคทีเรีย *Vibrio* ในลูกกุ้งขาวแวนนาไม

1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

เกษตรกรสามารถนำโปรไบโอติกไปใช้สำหรับเพิ่มผลผลิตในการเพาะเลี้ยงกุ้ง และเป็นการช่วยลดการใช้ยาปฏิชีวนะของเกษตรกร ซึ่งจะส่งผลต่อปัญหาสารตกค้างในตัวกุ้ง ทำให้กลายเป็นปัญหาที่สำคัญสำหรับการส่งออกของประเทศไทย นอกจากนี้โปรไบโอติกยังช่วยสร้างความเป็นมิตรให้กับสิ่งแวดล้อม และมีความปลอดภัยต่อเกษตรกรผู้ใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 กุ้งขาวแวนนาไม

กุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) ถูกค้นพบโดย Boone ในปี ค.ศ. 1931 เป็นกุ้งที่มีถิ่นกำเนิดในทวีปอเมริกาใต้ (Holthuis. 1980) กุ้งขาวมีลักษณะเด่นคือ ส่วนของกรี มีฟัน 1 หรือ 2 ซี่ อยู่ด้านบนกรี และ 8-9 ซี่ อยู่ด้านล่าง กุ้งขาวจัดเป็นสมาชิกใน Subgenus *Litopenaeus* เนื่องจากกุ้งเพศเมียมีอวัยวะแสดงเพศแบบเปิด ซึ่งแตกต่างจากกุ้งชนิดอื่นๆ ในครอบครัวเดียวกัน เช่น ลักษณะอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียของกุ้งกุลาดำและกุ้งแชบ๊วย จะมีลักษณะเป็นแบบปิด ดังนั้นรูปแบบของการสืบพันธุ์และพฤติกรรมในการผสมพันธุ์ของกุ้งขาว จึงเป็นไปคนละลักษณะกับกุ้งกุลาดำและกุ้งแชบ๊วย (Brock and Main. 1994) กุ้งขาวเป็นสายพันธุ์กุ้งทะเลที่มีการเพาะเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายในหลายประเทศ เช่น สหรัฐอเมริกา เม็กซิโก กัวเตมาลาล นิคารากัว คอสตาริกา ปานามา โคลัมเบีย เอกวาดอร์ และเปรู เป็นต้น กุ้งสายพันธุ์นี้เป็นสัตว์ที่มีความแข็งแรงและทนทาน จึงมีการขยายพันธุ์ตามธรรมชาติได้กว้างไกล ในแถบแนวชายฝั่งตะวันออกของมหาสมุทรแปซิฟิก ตั้งแต่ประเทศเม็กซิโกไปจนถึงเปรู เนื่องจากภูมิภาคในแถบนี้มีอุณหภูมิของน้ำที่เหมาะสมสูงกว่า 20 °C ตลอดทั้งปี (Wyban and Sweeney. 1991) และที่ระดับความลึกจากเส้นแนวชายฝั่งลงไปประมาณ 72 เมตร หรือ 235 ฟุต มีพื้นท้องทะเลเป็นเหมือนโคลน ซึ่งเหมาะสมต่อการเจริญเติบโต และเป็นแหล่งอาหารที่อุดมสมบูรณ์ กุ้งขาวสามารถอาศัยอยู่ได้ในน้ำที่มีความเค็มตั้งแต่ 5-40 พีพีที (Smith and Lawrence. 1990 ; Bray *et al.* 1994 ; Samocha *et al.* 2001) ถึงแม้ว่ากุ้งชนิดนี้จะสามารถทนต่อการเปลี่ยนแปลงของความเค็มในช่วงกว้างได้ แต่กุ้งขาวจะโตเร็วที่ระดับความเค็มซึ่งความเข้มข้นของแร่ธาตุในน้ำเท่ากับในเลือดกุ้ง จากการศึกษาพบว่ากุ้งขาวเจริญเติบโตได้ดีที่ความเค็ม 33 พีพีที ซึ่งใกล้เคียงกับความเค็มของน้ำทะเล

2.2 แบคทีเรีย *Vibrio*

แบคทีเรีย *Vibrio* เป็นแบคทีเรียที่พบทั่วไปในน้ำเค็ม และเป็นสาเหตุที่สำคัญของการเกิดโรคเรืองแสงในกุ้ง โดยเกิดจากแบคทีเรีย *V. harveyi* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ ลักษณะรูปร่างเป็นท่อนสั้น (Farmer *et al.* 2005) สามารถเคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลา ต้องการสารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน เติบโตได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน แบคทีเรีย *V. harveyi* ทำให้เกิดความเสียหายแก่อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งขนาดใหญ่ในทวีปอเมริกาใต้ (Alvarez *et al.* 1998) ทวีปออสเตรเลีย (Pizzuto and Hirst. 1995) และทวีปเอเชีย (Jiravanichpaisal *et al.* 1994)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยอาจทำให้ลูกกุ้งมีอัตราการตายได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ จากรายงานของ Lightner (1993) พบว่าแบคทีเรีย *Vibrio* ก่อให้เกิดโรคในกุ้งสกุล *Penaeus* ทุกชนิด กุ้งที่ติดเชื้อชนิดนี้ จะเกิดการสะสมของเมลานินในบริเวณที่ติดเชื้อ เซลล์บริเวณรยางค์ต่างๆ จะตาย กุ้งกินอาหารน้อยลง และตายในที่สุด Lightner (1993) เชื่อว่าการติดเชื้อ *Vibrio* อาจเกิดจากสาเหตุอื่นมาก่อนที่กุ้งจะแสดงอาการของโรค ซึ่งสาเหตุเบื้องต้นอาจเกิดจากการติดเชื้อโรคอื่นมาก่อน การขาดธาตุอาหาร ความเครียด หรือบาดแผล เป็นต้น ในการติดเชื้ออาจเกิดแบบเฉียบพลัน กึ่งเฉียบพลัน และเรื้อรัง โดยกุ้งอาจไม่ตายเลยหรือตายทั้งหมด ชนิดของแบคทีเรีย *Vibrio* ที่มีรายงานไว้ว่าก่อให้เกิดโรคในกุ้งทะเลได้แก่ *V. harveyi, V. alginolyticus, V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* แบคทีเรีย *V. harveyi* สามารถให้แสงสีเขียวแกมเหลืองออกมา จากปฏิกิริยาทางเคมีที่เกิดจากเอนไซม์ลูซิเฟอเรส ซึ่งทำให้กุ้งเรืองแสงได้ในที่มืด โดยเกิดจากปฏิกิริยาทางเคมีภายในเซลล์ ภายใต้การควบคุมการทำงานของสารที่เรียกว่าเอนไซม์ลูซิเฟอเรส จะไปทำปฏิกิริยาเร่งการเปลี่ยนแปลงสารลูซิเฟอรินในสิ่งมีชีวิต ในสภาวะที่มีก๊าซออกซิเจน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาการเผาไหม้ภายในเซลล์ เพื่อให้เกิดเป็นสารประกอบที่มีพลังงานสูง ATP และสารเรืองแสงซึ่งเป็นผลพลอยได้จากปฏิกิริยาดังกล่าว (Karunasagar *et al.* 1994 ; Robertson *et al.* 1998) แบคทีเรีย *V. harveyi* จะเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างรวดเร็วในน้ำที่มีความเค็มระหว่าง 10-40 พีพีที ที่อุณหภูมิน้ำสูงประมาณ 25-35 °C และค่าพีเอชของน้ำที่แบคทีเรียชนิดนี้เจริญเติบโตได้ดีคือ พีเอช 7-9 ลักษณะอาการของกุ้งที่ป่วย กุ้งจะขึ้นมาเกาะตามขอบบ่อหรือว่ายอยู่ที่ผิวน้ำ ซึ่งกุ้งป่วยเหล่านี้จะเห็นการเรืองแสงที่ส่วนหัวได้อย่างชัดเจนในเวลากลางคืน และเมื่อนำกุ้งมาตรวจสอบ โดยการนำส่วนของตับและตับอ่อน หรือนำเลือดกุ้งมาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ จะพบแบคทีเรียท่อนสั้นเคลื่อนที่ได้เป็นจำนวนมาก และเมื่อเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อทีซีบีเอส (TCBS agar) จะได้โคโลนีของแบคทีเรียเป็นชนิดสีเขียว ส่วนการตรวจสอบทางเนื้อเยื่อในกุ้งป่วย พบว่า ส่วนของตับและตับอ่อนถูกทำลายอย่างรุนแรง ทำให้การย่อยอาหารไม่เป็นปกติ และอาหารที่สะสมไว้ในตับก็จะน้อยลง กุ้งเริ่มอ่อนแอและตายในที่สุด นอกจากนี้พบว่าลำไส้กุ้งเกิดเซลล์ตาย และมีอาการอักเสบอย่างเห็นได้ชัดเจนเช่นกัน (ชลอ ลิ้มสุวรรณ และ พรเลิศ จันทร์รัชชกูล. 2547)

2.3 โปรไบโอติก

ก่อนที่จะมีการนำโปรไบโอติกมาใช้ในสัตว์น้ำนั้น ได้มีการใช้โปรไบโอติกในคน สัตว์ใหญ่ รวมทั้งสัตว์ปีกมานานแล้ว และมีผู้ให้คำจำกัดความของคำว่าโปรไบโอติกไว้หลากหลาย เช่น หมายถึง สารที่ผลิตขึ้นจากจุลินทรีย์และส่งเสริมให้สัตว์มีการเจริญเติบโตที่ดี (Lilly and Stillwell. 1965) หรือหมายถึง สิ่งมีชีวิตหรือสารใดก็ตามที่มีประโยชน์ต่อสัตว์ โดยไม่มีผลกับจุลินทรีย์ที่พบตามปกติภายในลำไส้ (Parker. 1974) ต่อมา Havenaar *et al.* 1992 ได้ขยายคำจำกัดความของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โปรไบโอติกว่า ควรประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่มีชีวิต ซึ่งอาจมีเพียงชนิดเดียว หรือเป็นส่วนผสมของจุลินทรีย์หลายๆ ชนิดที่สามารถไปปรับปรุงคุณสมบัติของจุลินทรีย์ดั้งเดิมที่อาศัยอยู่ในลำไส้ของสัตว์นั้น โดยจุลินทรีย์เหล่านี้ อาจอยู่ในรูปของเซลล์แห้งจากกระบวนการระเหิดแห้ง หรืออยู่ในรูปผลิตภัณฑ์หมัก ซึ่งนอกจากไปส่งเสริมการเจริญเติบโตแล้ว ยังทำให้คนและสัตว์มีสุขภาพดีขึ้นด้วย และโปรไบโอติกไม่ได้จำกัดการใช้เฉพาะในทางเดินอาหารเท่านั้น ยังอาจไปมีผลกับระบบอื่นๆ เช่น ทางเดินหายใจส่วนต้น ระบบปัสสาวะ และระบบสืบพันธุ์ ตามที่กล่าวมานี้คือความหมายของคำว่าโปรไบโอติกที่ใช้ในคน และสัตว์บก แต่เนื่องจากสัตว์น้ำอาศัยอยู่ในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างจากสัตว์บกมาก จึงทำให้ความหมายของโปรไบโอติกที่ใช้กับสัตว์น้ำแตกต่างออกไปบ้าง โดย Moriarty (1998) ได้ให้ความหมายของโปรไบโอติกว่า เป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่เติมลงไปในน้ำแล้วสามารถที่จะไปปรับสภาพของสิ่งแวดล้อมในบ่อให้ดีขึ้น และ Fuller (1998) ได้จำกัดความหมายเฉพาะลงไปว่า โปรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่เติมลงไปในอาหาร แล้วไปปรับปรุงสมดุลของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ภายในลำไส้ของสัตว์น้ำ แต่ Gatesoupe (1999) ได้เสนอว่าความหมายนี้ไม่ตรงกับที่มีผู้กล่าวเอาไว้ก่อนหน้า จึงได้เสนอว่าโปรไบโอติกควรหมายถึง เซลล์ของจุลินทรีย์ที่เติมลงไปโดยวิธีใดๆ แล้วสามารถเข้าไปอยู่ในลำไส้ของสัตว์น้ำ และดำรงชีวิตอยู่ได้ เพื่อพร้อมที่จะไปปรับปรุงสุขภาพของสัตว์น้ำนั้นให้ดีขึ้น

2.4 คุณสมบัติของโปรไบโอติก

กิจจา อุไรรงค์ และคณะ (2537) ได้กล่าวถึงคุณสมบัติของโปรไบโอติกที่ดีควรมีดังต่อไปนี้

2.4.1 ควรเป็นแบคทีเรียชนิดที่ไม่ก่อให้เกิดโรค และไม่สร้างสารพิษ

2.4.2 ควรเป็นแบคทีเรียแกรมบวก เนื่องจากสามารถทนต่อการย่อยของน้ำย่อยในระบบทางเดินอาหารได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ

2.4.3 ต้องทนกรดได้ดีและไม่ถูกทำลายได้ง่าย โดยน้ำย่อยจากกระเพาะอาหาร และน้ำดีจากตับอ่อน

2.4.4 มีคุณสมบัติที่คงตัวและไม่ถูกทำลายได้ง่าย จากกรรมวิธีในการผลิต เช่น การบดละเอียด การถูกความชื้น และการถูกความร้อน เป็นต้น

2.4.5 สามารถอยู่ร่วมกับจุลินทรีย์ที่มีอยู่แล้วในทางเดินอาหาร และออกฤทธิ์ได้ดีกับทางเดินอาหารทุกส่วน

2.4.6 จุลินทรีย์ที่เป็นส่วนประกอบของโปรไบโอติก จะต้องไม่มีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติภายหลังจากเข้าไปอยู่ในตัวสัตว์แล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 กลไกการทำงานของโปรไบโอติก

โปรไบโอติกเมื่อเข้าสู่ร่างกายของสัตว์ จะเข้าไปเจริญเติบโตหรือยึดเกาะกับผนังลำไส้ทุกส่วน และจะแสดงกลไกการทำงานดังต่อไปนี้ (Gatesoupe. 1999 ; Gomez-Gil *et al.* 2000 ; Irianto and Austin. 2002 ; Balca´zar *et al.* 2006)

2.5.1 การเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ และช่วยควบคุมจุลินทรีย์ชนิดที่ก่อให้เกิดโรค สมมติฐานนี้จะเกี่ยวกับกลไกการควบคุมเชื้อจุลินทรีย์ชนิดใหม่ โดยโปรไบโอติกมีการแก่งแย่งอาหาร ซึ่งได้มาจากการสังเกตเห็นการแย่งอาหารกัน ระหว่างจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงในห้องทดลอง แต่ข้อมูลการวิจัยที่ในสภาวะลำไส้เล็กจริง ยังมีไม่เพียงพอที่จะสนับสนุนสมมติฐานนี้อย่างชัดเจน (Freter. 1992 ; Hentges. 1992) อย่างไรก็ตาม Jonsson and Conway (1992) เชื่อว่ากลไกการยับยั้งการตั้งถิ่นฐานของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดใหม่โดยโปรไบโอติก ไม่น่าจะเกิดขึ้นบนลำไส้เล็กเพียงอย่างเดียว และเชื่อว่าโปรไบโอติกน่าที่จะมีการแย่งอาหารในบริเวณที่เกาะตั้งถิ่นฐาน ไม่ให้เหลือพอที่เชื้อจุลินทรีย์ชนิดใหม่จะใช้ในการเจริญเติบโตและขยายจำนวนได้ หรือเกิดจากสารยับยั้งที่โปรไบโอติกสร้างขึ้น อาจมีส่วนในการยับยั้งการตั้งถิ่นฐานของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดใหม่ด้วย

2.5.2 การสร้างสารคล้ายยาต้านจุลชีพและสารอื่นๆ ซึ่งคอยควบคุมจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคได้ เช่น แบคเทอริโอซิน ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และกรดอินทรีย์บางชนิด ซึ่งแบคเทอริโอซินและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่จุลินทรีย์กลุ่มโปรไบโอติกสร้างขึ้นนั้น จะออกฤทธิ์ในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์โดยตรง ส่วนกรดอินทรีย์โดยเฉพาะกรดไขมันระเหยได้ เช่น กรดแลคติก กรดอะซิติค กรดโพรพิโอนิก และกรดบิวทีริก นอกจากจะช่วยลดพีเอชของลำไส้ไม่ให้เหมาะสมสำหรับการขยายตัวของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดใหม่ กรดที่ยังไม่ไอออนไนซ์ยังมีผลช่วยในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

2.5.3 การแย่งพื้นที่ในการจับตัวกับเยื่อบุลำไส้ ทำให้จุลินทรีย์ชนิดที่ก่อให้เกิดโรคมายึดเกาะและขยายจำนวนไม่ได้ จุลินทรีย์เหล่านี้มีความสามารถในการต่อต้านการเกาะของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดใหม่บนผนังลำไส้ โดยกระบวนการที่เรียกว่า Competitive exclusion หรือ Colonization resistance ซึ่งเป็นกลไกการต่อต้านการยึดเกาะของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดใหม่โดยจุลินทรีย์เดิม นอกจากจะขัดขวางการยึดเกาะของจุลินทรีย์ที่เป็นโทษโดยตรงแล้ว จุลินทรีย์เดิมในทางเดินอาหารยังสร้างสารซึ่งเป็นพิษต่อเชื้อจุลินทรีย์ที่เข้าไปใหม่ เช่น ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ กรดน้ำดีอิสระ เช่น Deoxycholic acid ซึ่งสารเหล่านี้จะช่วยป้องกันการยึดเกาะและตั้งถิ่นฐานของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดใหม่ที่เป็นโทษส่วนใหญ่

2.5.4 การสร้างสารจำพวก Extracellular enzyme ที่มีส่วนช่วยในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่ช่วยในการย่อยของสัตว์น้ำ เช่น Amylase, Protease และ Lipase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สร้างขึ้นภายในเซลล์แล้วถูกขับออกมาทำงานภายนอกเซลล์ เมื่อทำปฏิกิริยากับสารอาหารที่มีโมเลกุลใหญ่ ทำให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารอาหารมีโมเลกุลเล็กลงจนถูกดูดซึมเข้าสู่เซลล์ได้ ส่งผลให้กิจกรรมการย่อยของเอนไซม์สัตว์น้ำมีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้น

2.5.5 การกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรคในทางเดินอาหารให้สูงขึ้น กลไกการกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรคของสัตว์ยังไม่แน่นอน แต่เป็นที่ยอมรับกันแล้วว่าโปรไบโอติก จะช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรคของสัตว์ทั้งในแง่เพิ่มความต้านทานโรคโดยตัวสัตว์เอง และในแง่การกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน โดยโปรไบโอติกจะไปกระตุ้นการทำงานของแมคโครฟาร์จ และเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดเซลล์ที่แปลกปลอม และกระตุ้นการทำงานของ Immunocompetent cell เช่น Lymphocytes ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับ Cell-mediated immune โดยไม่มีการหลั่ง Antibodies รวมทั้งกระตุ้นการทำงานของ Secretory immune system โดยการหลั่ง Antibodies เช่น IgA ออกมาจับเชื้อจุลินทรีย์แปลกปลอมไม่ให้ยึดเกาะกับเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้เล็กได้ (สาโรช ค้าเจริญ. 2542)

2.5.6 การลดการสังเคราะห์สารอามีน และแอมโมเนียในทางเดินอาหาร ซึ่งสารเหล่านี้เป็นพิษและทำให้การใช้ประโยชน์จากอาหารลดลง

2.6 สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่นำมาใช้เป็นโปรไบโอติก

แบคทีเรียโปรไบโอติกที่นิยมนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีอยู่หลายสายพันธุ์ แต่สายพันธุ์หลักๆ ที่นิยมใช้กันอยู่ ได้แก่

2.6.1 แบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria ; LAB) มีการเปลี่ยนแปลงอย่างต่อเนื่องโดยเฉพาะในช่วงระยะเวลาในอดีตนั้น แบคทีเรียกรดแลคติกหมายถึง กลุ่มแบคทีเรียที่ทำให้น้ำนมมีรสเปรี้ยว เนื่องจากมีการสร้างกรดออกมา ซึ่งรวมเอาแบคทีเรียแกรมลบกลุ่มโคลิฟอร์มไว้ด้วย (Stiles and Holzapfel. 1997) ในปัจจุบันการจัดกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติก จะมีลักษณะที่สำคัญได้แก่ เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์คาตาเลส ไม่สร้างไซโตโครม ทนต่อสภาวะที่มีออกซิเจน ทนกรด และมีทั้งลักษณะรูปร่างแบบกลมได้แก่ *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus*, *Streptococcus*, *Oenococcus*, *Weissella* และ *Enterococcus* และที่เป็นรูปร่างแบบท่อนได้แก่ *Lactobacillus* และ *Carnobacterium* แบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่ต้องการออกซิเจนสำหรับการเจริญเติบโตเพียงเล็กน้อย บางชนิดเป็นพวกที่ไม่ต้องการออกซิเจนอย่างยิ่งในการเจริญเติบโต รวมทั้งได้แหล่งพลังงานจากกระบวนการหมักน้ำตาลชนิดต่างๆ โดยเฉพาะน้ำตาลกลูโคสและแล็กโตส นอกจากนี้แบคทีเรียกรดแลคติกยังมีลักษณะที่สำคัญอีกประการหนึ่งคือ ความสามารถในการย่อยน้ำตาลให้เป็นกรด ซึ่งทำให้เกิดรสชาติที่ต้องการในผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิด เช่น ผักดอง แหนม เนยแข็ง และนมเปรี้ยว เป็นต้น (Muralidhara *et al.* 1977 ; Pollman *et al.* 1980 ; Jonsson. 1986) โดยแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบได้ในสิ่งแวดล้อมต่างๆ ทั่วไป รวมถึงในระบบทางเดินอาหารของสิ่งมีชีวิต เช่น มนุษย์ สัตว์บก สัตว์ปีก และสัตว์น้ำ เป็นต้น (De Vuyst and Vandamme. 1994) และแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถแบ่งตามการใช้สารอาหาร และการสร้างสารออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ (Kandler and Weiss. 1986 ; Axelsson. 1993) ได้แก่ แบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่มโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกที่หมักน้ำตาลกลูโคส หรือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอมตัวอื่น แล้วให้กรดแลคติกประมาณ 85 เปอร์เซ็นต์ หรือมากกว่า ไม่ต้องการไธอะมีนในการเจริญเติบโต สามารถผลิตเอนไซม์อัลโดเลส และเอนไซม์เฮกโซสไอโซเมอเรส แต่ไม่ผลิตเอนไซม์ฟอสโฟคีโตเลส ทำให้ได้กรดแลคติก 2 โมเลกุลต่อน้ำตาลกลูโคส 1 โมเลกุล เป็นแบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 15-45 °C แบคทีเรียในกลุ่มนี้ได้แก่ *Lactobacillus sake, L. casei, P. acidilactici, P. pentosaceus, P. dextrinicus* และ *S. lactis* เป็นต้น และแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่มเฮทเทอร์โรเฟอร์เมนเททีฟ ซึ่งเป็นแบคทีเรียกรดแลคติกที่หมักน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอมตัวอื่น แล้วได้กรดแลคติกประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ กรดอะซิติกรวมทั้งเอทานอลประมาณ 20-50 เปอร์เซ็นต์ และคาร์บอนไดออกไซด์อีกเล็กน้อย เป็นแบคทีเรียที่ต้องการไธอะมีนในการเจริญเติบโต สามารถผลิตเอนไซม์ฟอสโฟคีโตเลส แต่ไม่สามารถผลิตเอนไซม์อัลโดเลส และเอนไซม์เฮกโซสไอโซเมอเรส แบคทีเรียในกลุ่มนี้ได้แก่ *L. plantarum, L. fermentum* และ *L. brevis* เป็นต้น นอกจากนี้แบคทีเรียกรดแลคติกยังสามารถสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ได้ โดยสารที่สำคัญคือ

2.6.1.1 กรดอินทรีย์ โดยกรดอินทรีย์ชนิดที่มีความสำคัญได้แก่ กรดแลคติก ซึ่งเป็นผลผลิตที่เกิดขึ้นในกระบวนการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต โดยจะมีการเปลี่ยนไพรูเวตไปเป็นกรดแลคติกด้วยเอนไซม์ Lactic dehydrogenase ซึ่งกรดที่เกิดขึ้นเมื่อมีการสะสมมากขึ้น จะทำให้ค่าความเป็นกรดด่างในบริเวณนั้นลดลง ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ โดยพบว่ากรดแลคติกสามารถแทรกผ่านเข้าไปภายในเซลล์จุลินทรีย์ได้ และเมื่อเจอสภาพภายในเซลล์ที่มีค่าความเป็นกรดด่างสูงกว่าภายนอกเซลล์ กรดแลคติกจะเกิดการแตกตัวได้เป็นไฮโดรเจนไอออน ซึ่งจะไปมีผลต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมต่างๆ ภายในเซลล์ (De Vuyst and Vandamme. 1994)

2.6.1.2 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จะผลิตออกมาจากแบคทีเรียกรดแลคติก เมื่อเจริญเติบโตในสภาวะที่มีออกซิเจน โดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการถ่ายเทอิเล็กตรอน ซึ่งพบว่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะทำปฏิกิริยากับไขมันที่อยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้ไม่สามารถควบคุมการผ่านเข้าออกของสารได้ นอกจากนี้ยังมีผลในการทำลายโครงสร้างของกรดนิวคลีอิกและโปรตีนที่อยู่ภายในเซลล์ โดยยังพบอีกว่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ นอกจากจะสามารถทำลายจุลินทรีย์ได้โดยตรงแล้ว ยังสามารถไปรวมตัวกับสารอื่นๆ และเกิดเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดใหม่ขึ้นมาได้อีกด้วย (De Vuyst and Vandamme. 1994)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.1.3 ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นผลผลิตที่เกิดจากกระบวนการหมักน้ำตาลแบบ Heterofermentation ของแบคทีเรียกรดแลคติก ซึ่งก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นจะไปแทนที่ก๊าซออกซิเจนในสภาวะแวดล้อมรอบๆ ทำให้เกิดสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ซึ่งไม่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดที่ต้องการใช้ออกซิเจน โดยเฉพาะในกลุ่มของเชื้อรา นอกจากนี้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ยังทำให้ค่าความเป็นกรดด่างภายในเซลล์และรอบๆ เซลล์ลดลง มีผลทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลาย (De Vuyst and Vandamme. 1994)

2.6.1.4 ไดอะซีทิล เป็นผลผลิตจากกระบวนการเมแทบอลิซึมไพรูเวต โดยแบคทีเรียกรดแลคติกในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน ซึ่งพบว่าจะมีการสร้างไพรูเวตออกมาในปริมาณมาก และสารดังกล่าวนี้จะถูกเปลี่ยนต่อไปเป็นไดอะซีทิลและอะซีโตอิน โดยไดอะซีทิลสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค และทำให้อาหารเกิดการเน่าเสีย ซึ่งผลในการยับยั้งของสารกลุ่มนี้จะมีผลต่อแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์ และรา มากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก เนื่องจากไดอะซีทิลจะไปขัดขวางการใช้อาร์จินีนของแบคทีเรียแกรมลบ โดยไปแทนที่อาร์จินีนในการรวมตัวกับ Arginine-binding protein (De Vuyst and Vandamme. 1994)

2.6.1.5 อะซีทัลดีไฮด์ โดยสารนี้จะเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตแบบ Heterofermentation ของแบคทีเรียกรดแลคติก ในสภาวะที่ไม่มีเอนไซม์ Alcohol dehydrogenase ทำให้เกิดการสร้างและขับอะซีทัลดีไฮด์ออกมาภายนอกเซลล์ ส่วนผลของอะซีทัลดีไฮด์ต่อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ นั้นยังไม่มีรายงานการศึกษามากนัก เพียงแต่มีการรายงานว่าอะซีทัลดีไฮด์ที่มีความเข้มข้นระหว่าง 10-100 ส่วนในล้านส่วน สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคในอาหารได้ (De Vuyst and Vandamme. 1994)

2.6.1.6 แบคเทอริโอซิน เป็นสารเปปไทด์หรือสารประกอบโปรตีนที่สร้างมาจากแบคทีเรีย มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียชนิดอื่น ที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกับแบคทีเรียที่ผลิตแบคเทอริโอซิน (Brink *et al.* 1994) หรือสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่มีความไวต่อแบคเทอริโอซิน (Kawai *et al.* 1994) โดยแบคเทอริโอซินที่รู้จักกันดีคือไนซิน มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก แต่ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์ หรือราได้ ไนซินถูกยับยั้งได้โดยเกลือ และเนื่องจากมีคุณสมบัติเป็นโปรตีนจึงถูกย่อยได้โดยเอนไซม์ Pancreatin และ α-Chymotrypsin (Helander *et al.* 1997)

ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ได้มีการนำแบคทีเรียกรดแลคติกมาใช้ในการเพิ่มการเจริญเติบโต และยับยั้งการเกิดโรค โดย Gildberg *et al.* (1997) ศึกษาอัตราการรอดตาย และการเจริญเติบโตของลูกปลาคอดที่จับได้จากมหาสมุทรแอตแลนติก โดยนำแบคทีเรีย *C. divergens* มาผสมกับอาหาร และมีการชั่งน้ำหนักและตรวจดูจำนวนแบคทีเรีย *V. anguillarum* ซึ่งเป็นสาเหตุที่เกิดโรคและการตายของลูกปลาคอด พบว่า 12 วัน หลังจากการให้อาหาร ลูกปลาคอดจะมีจำนวนแบคทีเรีย *V. anguillarum* ลดลง ในด้านการเจริญเติบโต พบว่า ลูกปลาคอดที่ได้รับอาหารผสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรีย *C. divergens* จะมีอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มจาก 2.35 เปอร์เซ็นต์ เป็น 2.68 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับลูกปลาคอดที่ได้รับอาหารปกติ

Garcia-de-la-banda *et al.* (1992) ศึกษาอัตราการรอดตายของลูกปลาเทอร์บอท *(Scophthalmus maximus)* โดยการเติมแบคทีเรียกรดแลคติก *S. lactis* และ *L. bulgaricus* ลงในอาร์ทีเมีย เพื่อเป็นอาหารของลูกปลาเทอร์บอท พบว่า สามารถเพิ่มอัตราการรอดตายของลูกปลาเทอร์บอทเป็น 66 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับลูกปลาเทอร์บอทที่ไม่ได้เติมแบคทีเรียกรดแลคติกลงในอาร์ทีเมีย ที่มีอัตราการรอดตายเพียง 34 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับ Gatesoupe (1994) ได้ปรับปรุงอัตราการรอดตายของลูกปลาเทอร์บอท โดยการเติมแบคทีเรียกรดแลคติกลงในโรติเฟอร์ เพื่อเป็นอาหารของลูกปลาเทอร์บอท พบว่า สามารถเพิ่มอัตราการรอดตายของลูกปลาเทอร์บอท เมื่อนำไปทดสอบการต้านทานแบคทีเรีย *Vibrio* sp. เมื่อเทียบกับลูกปลาเทอร์บอทที่ไม่ได้เติมแบคทีเรียกรดแลคติกลงในโรติเฟอร์

Carnevali *et al.* (2006) ทดลองผสม Lactic acid bacteria ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่เป็นโปรไบโอติกลงในอาหารเลี้ยงตัวเต็มวัยของปลา European sea bass พบว่า เมื่อครบ 70 วัน น้ำหนักปลามีความแตกต่างกัน โดยปลาที่ได้รับโปรไบโอติกผ่านทางโรติเฟอร์วันที่ 11-19 และผ่านทางอาร์ทีเมียวันที่ 30-70 และปลาที่ได้รับโปรไบโอติกผ่านทางอาร์ทีเมียเพียงอย่างเดียววันที่ 30-70 มีน้ำหนัก 85.00±5.36 และ 60.00±6.70 มิลลิกรัม ตามลำดับ ซึ่งมีค่ามากกว่าปลาที่ไม่ได้รับโปรไบโอติก (47.00±4.69 มิลลิกรัม)

Wang *et al.* (2008) ทดลองใส่โปรไบโอติก *E. faecium* ZJ4 ที่แยกออกมาจากบริเวณทางเดินอาหารของลูกหมูลงในน้ำเลี้ยงปลานิล พบว่า เมื่อครบ 40 วัน ปลานิลที่ได้รับโปรไบโอติกมีน้ำหนัก 32.63±1.82 กรัม ซึ่งมีค่ามากกว่าปลานิลที่ไม่ได้รับโปรไบโอติก (28.21±1.99 กรัม) และปลานิลที่ได้รับโปรไบโอติก มีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่อวันมากกว่าปลานิลที่ไม่ได้รับโปรไบโอติก

2.6.2 แบคทีเรียบาซิลลัส

แบคทีเรีย *Bacillus* spp. เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อนทรงกระบอก และอาจเป็นท่อนเดียวหรือต่อกันเป็นสาย มีขนาด 0.5-2.5x1.2-10 ไมโครเมตร (Claus and Berkeley. 1986 ; Turnbull *et al.* 1990 ; Rosovitz *et al.* 1998) ต้องการออกซิเจนในการหายใจ บางครั้งสามารถเจริญเติบโตได้ในที่ไม่มีออกซิเจน และสร้างสปอร์ภายในเซลล์ จึงทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม หรือสามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารหลายชนิด และเจริญเติบโตได้ดีในอุณหภูมิปกติ และพีเอชเป็นกลาง สามารถผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิด เช่น Amylase, Protease และ Lipase เป็นต้น โดยแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จะมีลักษณะทั่วไปและความสำคัญดังต่อไปนี้

2.6.2.1 แบคทีเรีย *Bacillus* spp. มีความหลากหลายทางลักษณะทางสัณฐานวิทยา และสรีรวิทยาที่กว้าง โดยลักษณะโคโลนีมีความแปรปรวนมากขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม คุณภาพ และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณของอาหารที่เลี้ยง ส่วนอายุของโคโลนีและจำนวนโคโลนีต่อจานอาหารที่เลี้ยง จะมีผลต่อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี ดังนั้นจึงเป็นเรื่องยากในการที่จะแยกชนิดด้วยลักษณะโคโลนี อย่างไรก็ตามในสภาพแวดล้อมเดียวกัน ลักษณะโคโลนีสามารถใช้ในการจำแนกชนิดได้ (Rosovitz *et al.* 1998) เช่น เมื่อเลี้ยงในอาหาร Casein agar *B. megaterium* ให้โคโลนีมีสีเหลือง *B. firmus* ให้โคโลนีสีชมพู *B. licheniformis* ให้โคโลนีสีแดงถึงน้ำตาล *B. pumilus* ให้โคโลนีสีเหลืองอ่อน *B. sphaericus* ให้โคโลนีสีชมพู และ *B. subtilis* ให้โคโลนีสีชมพูหรือน้ำตาล และเมื่อเลี้ยงบนอาหาร Ttyrosine agar *B. megaterium* ให้โคโลนีมีสีดำ เป็นต้น

2.6.2.2 เซลล์ของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ประกอบด้วย Cytoplasmic membrane และ Cell wall ในบางสายพันธุ์เซลล์ของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ไม่มีชั้น Outer membranes ซึ่งต่างจากแบคทีเรียแกรมลบ ส่วน Cell wall ประกอบด้วยเปปติโดไกลแคนหลายชั้น Anionic polymers ทำให้ผนังเซลล์มีความเหนียว บริเวณผิวหน้าของ Cell wall เป็นชั้นของ Paracrystalline cell wall surface layers ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนหรือไกลโคโปรตีน และแบคทีเรีย *Bacillus* spp. หลายชนิดมีการสร้าง Carbohydrate capsules และส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลาแบบ Peritrichous flagella และการใช้แฟลกเจลลาเป็น Antigens มีประโยชน์ในการตรวจจำแนกแบคทีเรีย *B. cereus, B. thuringiensis* และ *B. sphaericus* (Turnbull *et al.* 1990)

2.6.2.3 แบคทีเรีย *Bacillus* spp. สามารถสร้างสปอร์ภายในเซลล์ เมื่ออาหารมีจำกัดหรือเซลล์เข้าสู่ระยะ Stationary phase และอยู่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ความร้อน แสงยูวี และสารเคมีต่างๆ บางเซลล์อาจมีแวคิวโอล บางชนิดอาจพบผลึกโปรตีน เช่น *B. thuringiensis* (Rosovitz *et al.* 1998) และรูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสปอร์ และตำแหน่งการสร้างสปอร์ภายในเซลล์ สามารถจำแนกแบคทีเรียสกุล *Bacillus* spp. ได้เป็น 3 กลุ่ม (สุรางค์ สุธิราวุธ. 2538) คือ กลุ่มที่ 1 เซลล์ไม่โป่งพอง สปอร์เป็นรูปวงรีหรือรูปทรงกระบอก ตำแหน่งของสปอร์อยู่ตรงกลางหรือค่อนไปทางปลายเซลล์ กลุ่มที่ 2 เซลล์โป่งพอง สปอร์มีลักษณะเป็นรูปไข่ ตำแหน่งอยู่กลางหรือปลายเซลล์ ได้แก่ *B. circulans, B. macerans, B. polymyxa, B. stearothermophilus, B. brevis, B. laterosporus, B. popilliae, B. larvae, B. alvei* และ *B. lentimorbus* เป็นต้น และกลุ่มที่ 3 สปอร์ทำให้เซลล์โป่งออกหรือบางครั้งไม่โป่งออก โดยสปอร์มีลักษณะรูปร่างกลม ตำแหน่งอยู่ปลายหรือค่อนไปทางปลายเซลล์ เช่น *B. sphaericus* เป็นต้น

2.6.2.4 แบคทีเรีย *Bacillus* spp. สามารถสร้างเอนไซม์ Catalase จึงทำให้สามารถแยกความแตกต่างจากแบคทีเรียสกุล *Clostridium* และ *Sporolactobacillus* ได้ มีบางชนิดที่สร้างเอนไซม์ Catalase ได้น้อยหรือไม่สร้างเลย เช่น *B. larvae, B. lentimorbus, B. popilliae* และ *B. stearothermophilus* (Turnball *et al.* 1990) แบคทีเรีย *Bacillus* spp. ต้องการสารอาหารและสภาพแวดล้อมในการเจริญเติบโตแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ต้องการอาหารธรรมดาทั่วไปที่มีส่วนประกอบไม่ซับซ้อน กลุ่มที่ 2 ต้องการอาหารที่มีส่วนประกอบซับซ้อน และกลุ่มที่ 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต้องการอาหารเฉพาะสำหรับการเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆ ที่มีส่วนประกอบของคาร์โบไฮเดรต แบคทีเรีย *Bacillus* spp. จะสร้างกรดแต่ไม่สร้างแก๊ส ยกเว้น *B. polymyxa* และ *B. macerans* ที่สร้างแก๊สด้วย และคาร์โบไฮเดรตชนิดเดียวกันอาจจะให้แก๊สที่แตกต่างกัน เช่น *B. subtilis*, *B. cereus* และ *B. licheniformis* เมื่อเจริญเติบโตบนอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสแล้วได้ 2, 3-Butanediol และ Glycerol ในขณะที่ *B. polymyxa* เปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสแล้วได้ 2, 3-Butanediol ethanal และ Hydrogen ส่วน *B. macerans* เปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสแล้วได้ Ethanal, Acetone, Acetic และ Formic acid บางชนิดให้กรดแลคติก แบคทีเรีย *Bacillus* spp. ส่วนใหญ่จะสร้าง Proteolytic enzyme และสามารถย่อย Casein และ Gelatin ได้

แบคทีเรีย *Bacillus* spp. ถือว่าเป็นจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก เพราะว่าเป็นจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดสมดุลในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ (Ozawa *et al.* 1981 ; Ogle and Inborr. 1987 ; Spriet *et al.* 1987) และบางสายพันธุ์ถูกพัฒนามาเพื่อใช้ในการควบคุมสิ่งแวดล้อมทางการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เช่น ใช้ในการจัดการบ่อเลี้ยง และการปรับสภาพดินและน้ำ นอกจากนี้แบคทีเรีย *Bacillus* spp. ยังใช้ผสมลงในอาหารเพื่อเพิ่มการเจริญเติบโต และอัตราการรอดตายให้กับสัตว์น้ำ โดย Rengpipat *et al.* (1998) ทดลองใช้โปรไบโอติกสายพันธุ์ *Bacillus* S11 ผสมในอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำ พบว่า หลังจาก 100 วัน น้ำหนักของกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก (7.06±0.48 กรัม) มีค่ามากกว่ากุ้งกุลาดำที่ไม่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก (3.99±0.38 กรัม)

Rengpipat *et al.* (2003) ทดลองผสมโปรไบโอติก *Bacillus* S11 ลงไปในอาหารเพื่อใช้สำหรับเลี้ยงกุ้งกุลาดำ พบว่า หลังจาก 100 วัน ค่าเฉลี่ยน้ำหนักของกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก (25.40±2.50 และ 22.00±1.20 กรัม) มีค่ามากกว่าเมื่อเทียบกับกุ้งกุลาดำที่ไม่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก (18.60±0.80 และ 18.30±0.60 กรัม) ในการทดลองช่วงเดือนมิถุนายนถึงเดือนกันยายน และการทดลองช่วงเดือนพฤศจิกายนถึงเดือนกุมภาพันธ์ ตามลำดับ

Balca´zar *et al.* (2007) ทดลองใช้โปรไบโอติก 4 สายพันธุ์ ผสมลงในอาหารเลี้ยงกุ้งขาวเป็นเวลา 28 วัน หลังจากนั้นมีการเหนี่ยวนำในการทำให้กุ้งเกิดโรคด้วย *V. parahaemolyticus* เป็นเวลา 14 วัน พบว่า กุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกทั้งหมดมีอัตราการตาย 17-22 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าน้อยกว่ากุ้งขาวที่ไม่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก (33 เปอร์เซ็นต์)

2.6.3 แบคทีเรียสังเคราะห์แสง

แบคทีเรียสังเคราะห์แสง (Photosynthetic bacteria ; PSB) พบกระจายทั่วไปในธรรมชาติตามแหล่งน้ำจืด น้ำเค็ม ทะเลสาบน้ำเค็ม ทะเลสาบที่มีความเป็นด่าง น้ำที่มีความเป็น กรด น้ำพุร้อน และน้ำทะเลบริเวณขั้วโลกเหนือ นอกจากนี้ยังพบตามแหล่งน้ำเสีย และบ่อบำบัดน้ำ (Levett. 1990 ; Imhoff. 1992 ; Brock *et al.* 1994) บทบาทของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง มีความสำคัญในกระบวนการนำก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ไปใช้ และการตรึงไนโตรเจน นอกจากนี้ยังมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทบาทสำคัญในห่วงโซ่อาหาร ซึ่งสัตว์ขนาดเล็ก ปลา กุ้ง หอย และปู สามารถนำแบคทีเรียสังเคราะห์แสงมาใช้เป็นอาหารได้ และน้ำเสียจากบ้านเรือนและน้ำเสียจากการทำปศุสัตว์ สามารถบำบัดด้วยแบคทีเรียสังเคราะห์แสงได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Kobayashi. 2000) แบคทีเรียสังเคราะห์แสง สามารถนำมาใช้เป็นสารเสริมในอาหารสัตว์ เนื่องจากว่าในเซลล์แบคทีเรียมีปริมาณโปรตีนสูงถึงร้อยละ 60-65 ซึ่งโปรตีนเหล่านี้ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อสัตว์ครบถ้วน และยังมีวิตามินและแร่ธาตุ เช่น วิตามินบี 1 วิตามินบี 2 วิตามินบี 6 กรดฟอลิค วิตามินบี 12 วิตามินซี วิตามินดี และวิตามินอี นอกจากนี้ยังมีรงควัตถุสารโคแฟคเตอร์ เช่น ยูบิควิโนน และโคเอนไซม์คิว ประกอบอยู่ด้วย จึงเหมาะที่จะใช้เป็นแหล่งอาหาร โดยทั่วไปแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสามารถแบ่งเป็น 7 กลุ่มย่อย ตามความแตกต่างด้านสัณฐานวิทยา รงควัตถุ คุณสมบัติทางสรีรวิทยา และคุณสมบัติทางชีวเคมี (Pfenning and Truper. 1989 ; Kobayashi. 2000) ดังต่อไปนี้

2.6.3.1 Purple sulfur bacteria : Sulfur globules inside cells แบคทีเรียนี้มีลักษณะเด่นคือ สะสมซัลเฟอร์ภายในเซลล์ และเซลล์อาจอยู่เดี่ยวๆ หรือเป็นกลุ่ม มีรูปร่างกลม รูปไข่ ท่อนโค้ง และรูปเกลียว มีทั้งเคลื่อนที่ได้และไม่ได้ มีแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์เอและบี มีคาโรทีนอยด์ชนิด Spirilloxanthin, Okenone และ Rhodopinal โคโลนีมีสีส้มน้ำตาลจนถึงม่วง เมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนแต่มีแสงจะเจริญเติบโตแบบ Phototroph และอาจเจริญเติบโตแบบ Chemoautotroph ในสภาวะที่มีออกซิเจนแต่ไม่มีแสง และสามารถตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ โดยใช้วัฏจักรไรบูโลสไดฟอสเฟต ตัวอย่างของแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้แก่ *Amoebobacter, Chromatium, Lamprobacter, Lamprocystis, Thiocapsa, Thiocystis, Thiodictyon, Thiopedia* และ *Thiospirillum*

2.6.3.2 Purple sulfur bacteria : Sulfur globules outside cells มีลักษณะเด่นคือ สะสมซัลเฟอร์ไว้ภายนอกเซลล์ เคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลา มีแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์เอหรือบี และมีคาโรทีนอยด์ชนิด Normal spirolloxanthin โดยใช้ซัลไฟด์หรือซัลเฟอร์เป็นตัวให้อิเล็กตรอนในการสังเคราะห์แสง และออกซิไดซ์ซัลไฟด์เป็นซัลเฟอร์และซัลเฟต และไม่สามารถเจริญเติบโตในสภาวะที่มีออกซิเจน ตัวอย่างของแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้แก่ *Ectothiorhodospira*

2.6.3.3 Purple non-sulfur bacteria แบคทีเรียพวกนี้จะเจริญเติบโตในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนแต่มีแสงแบบ Phototrophic และมักใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอน แต่เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีออกซิเจน หรือมีออกซิเจนเล็กน้อยและไม่มีแสง จะเจริญเติบโตแบบ Chemotrophic และใช้สารอินทรีย์ แอลกอฮอล์ และกรดไขมัน เป็นตัวให้อิเล็กตรอนและเป็นแหล่งคาร์บอน บางพวกสามารถใช้ซัลไฟด์หรือไธโอซัลเฟต เป็นตัวให้อิเล็กตรอนในการสังเคราะห์แสง เซลล์มีรูปร่างท่อนกลม และรูปเกลียว เพิ่มจำนวนโดยการแตกหน่อหรือการแบ่งตัว มีทั้งเคลื่อนที่ได้และไม่ได้ และโคโลนีมีสีส้มน้ำตาลถึงสีม่วงแดง ตัวอย่างของแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้แก่ *Rhodobacter, Rhodocyclus, Rhodomicrobium, Rhodopila, Rhodopseudomonas* และ *Rhodospirillum*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.3.4 Bacteria with bacteriochlorophyll แบคทีริโอคลอโรฟิลล์จีและคาโรทินอยด์ ชนิด Neurosporene ดังนั้นจึงทำให้เซลล์มีสีเขียวออกน้ำตาลอ่อน และเซลล์มีรูปไข่หรือรูปท่อน ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีออกซิเจน และไม่ใช้ซัลไฟด์ จัดเป็น Photoheterotrophic โดยใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งให้อิเล็กตรอนเท่านั้น ตัวอย่างของแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้แก่ *Heliobacillus* และ *Heliobacterium*

2.6.3.5 Green sulfur bacteria มีแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ซี ดี หรืออี เซลล์มีสีเขียวหรือสีน้ำตาล รูปร่างกลม รูปไข่หรือท่อน เคลื่อนที่ได้แบบคืบคลานหรือเคลื่อนที่ไม่ได้ มีไรโบโซมซึ่งเป็นออร์แกเนลที่มีรงควัตถุที่ทำหน้าที่สังเคราะห์แสงอยู่ และเจริญเติบโตในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนแต่มีแสง โดยใช้ซัลไฟด์หรือซัลเฟอร์ เป็นตัวให้อิเล็กตรอน และสะสมซัลเฟอร์ไว้ภายนอกเซลล์ ตัวอย่างของแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้แก่ *Ancalochloris, Chlorobium, Chloroherpeton, Pelodictyon* และ *Prosthecochloris*

2.6.3.6 Muticellular filamentous green bacteria สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนแบบ Chemotrophic เซลล์มีการเรียงตัวเป็นเส้นสายมากมาย และเคลื่อนที่ได้โดยการคืบคลาน และใช้อินทรีย์สารเป็นตัวให้อิเล็กตรอนขณะสังเคราะห์แสง บางพวกสามารถออกซิไดซ์ซัลไฟด์เป็นซัลเฟอร์ และสะสมซัลเฟอร์ไว้ภายนอกเซลล์หรือไม่สะสม ตัวอย่างของแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้แก่ *Chloroflexus, Chloronema, Heliothrix* และ *Oscillochloris*

2.6.3.7 Aerobic chemotrophic bacteria with bacteriochlorophyll แบคทีเรียชนิดนี้เจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนเท่านั้น ซึ่งเป็นการเจริญเติบโตแบบ Chemotrophic แต่ออกซิไดซ์ซัลไฟด์ไม่ได้ และมีแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์เอหรือบี และคาโรทินอยด์ เคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลา ตัวอย่างแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้แก่ *Erythrobacter*

เนื่องจากเซลล์ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง เป็นเซลล์ที่มีปริมาณโปรตีนสูง และโปรตีนเหล่านี้จะประกอบด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็นครบถ้วน และยังมีวิตามินและแร่ธาตุต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ นอกจากนี้ยังมีรงควัตถุสารโคแฟคเตอร์ประกอบอยู่ด้วย จึงเหมาะที่จะใช้เป็นแหล่งอาหารเสริมให้กับสัตว์น้ำ ซึ่งจะส่งผลให้สัตว์น้ำมีการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้น โดย Wang and Zirong (2006) ทดลองผสมโปรไบโอติกลงในอาหารปลาคาร์พ พบว่า ค่าเฉลี่ยน้ำหนักสุดท้ายของปลาคาร์พที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก lyophilized photosynthetic bacteria cells, lyophilized *Bacillus* sp. และแบบผสมระหว่าง lyophilized photosynthetic bacteria กับ *Bacillus* sp. คือ 11.48±0.54, 11.44±0.44 และ 11.67±0.36 กรัม ตามลำดับ ซึ่งมีค่ามากกว่าปลาคาร์พที่ไม่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก (9.78±0.48 กรัม)

Wang (2007) ทดลองใช้แบคทีเรียที่มีการสังเคราะห์แสง และ *Bacillus* sp. ที่ถูกแยกออกมาจากบ่อเลี้ยงปลาคาร์พ นำมาเป็นโปรไบโอติกผสมลงในอาหารเลี้ยงกุ้งขาว พบว่า เมื่อครบ 28 วัน ค่าเฉลี่ยน้ำหนักสุดท้ายของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก (1.71±0.06 กรัม) มีค่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มากกว่ากุ้งขาวที่ไม่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก (1.57±0.05 กรัม) ส่วนน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่อวันของกุ้งขาว และความสัมพันธ์ของน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นในกุ้งข้าวที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก มีค่ามากกว่ากุ้งขาวที่ไม่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกเช่นเดียวกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สัตว์และผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกทดลอง

3.1.1 กุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาร์วา 10 จากฟาร์มอนุบาลลูกกุ้งในจังหวัดฉะเชิงเทรา มีน้ำหนักเฉลี่ยตัวละ 3.60±0.11 มิลลิกรัม และความยาว 1.09±0.02 เซนติเมตร จำนวน 4,800 ตัว

3.1.2 ผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก PondSafe ที่นำมาใช้ในการทดลอง เป็นแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* ในรูปผง ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท Novozymes Biological, Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งประกอบด้วย *Bacillus* 5 สายพันธุ์ได้แก่ *B. amyloliquefaciens, B. licheniformis, B. subtilis, B. megaterium* และ *B. pumilus* โดยมีปริมาณสปอร์ไม่น้อยกว่า 1 ล้านเซลล์ต่อกรัม

3.2 อุปกรณ์และสารเคมี

3.2.1 อุปกรณ์

3.2.1.1 ถังพลาสติก

3.2.1.2 ปั๊มลม

3.2.1.3 สายออกซิเจน

3.2.1.4 หัวทราย

3.2.1.5 สายยาง

3.2.1.6 ที่ช้อนปลา

3.2.1.7 ถุงพลาสติกสีดำ

3.2.1.8 อาหารลูกกุ้งซีพี 9001

3.2.1.9 ผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก PondSafe

3.2.1.10 เพลทพลาสติก

3.2.1.11 Micropipet ขนาด 10 ไมโครลิตร, 1,000 ไมโครลิตร และ 10 มิลลิลิตร

3.2.1.12 Tip ขนาด 10 ไมโครลิตร, 1,000 ไมโครลิตร และ 10 มิลลิลิตร

3.2.1.13 หลอดทดลองขนาด 16 มิลลิเมตร

3.2.1.14 แท่นวางหลอดทดลอง

3.2.1.15 บิกเกอร์ขนาด 50, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร

3.2.1.16 ขวดวัดปริมาตรขนาด 500 และ 1,000 มิลลิลิตร

3.2.1.17 ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

3.2.1.18 ขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2.1.19 ช้อนตักสาร

3.2.1.20 แท่งแก้วคนสาร

3.2.1.21 กระดาษชั่งสาร

3.2.1.22 กระดาษทิชชู

3.2.1.23 กระดาษฟอยด์

3.2.1.24 เครื่องชั่งสาร

3.2.1.25 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง

3.2.1.26 เครื่องปั่นเหวี่ยง

3.2.1.27 เครื่องเขย่าสาร

3.2.1.28 หม้อนึ่งความดันไอ

3.2.1.29 ตู้อบไอร้อน

3.2.1.30 ตู้ปลอดเชื้อ

3.2.1.31 ตู้บ่มเชื้อ

3.2.1.32 ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าและควบคุมอุณหภูมิ

3.2.1.33 เตาไมโครเวฟ

3.2.2 สารเคมี

3.2.2.1 น้ำกลั่น

3.2.2.2 โซเดียมคลอไรด์

3.2.2.3 แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์

3.2.2.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar (PCA)

3.2.2.5 อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy broth (TSB)

3.2.2.6 อาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulphate – citrate – bile salts – sucrose (TCBS)

3.3 วิธีดำเนินการทดลอง

3.3.1 การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของโปรไบโอติก ต่อการยับยั้งแบคทีเรีย *V. harveyi* ในห้องปฏิบัติการ

3.3.1.1 วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอดสมบูรณ์ (Complete randomized design ; CRD) โดยแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 4 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 4 ซ้ำ ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
119619

ชุดการทดลองที่ 1 การยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *V. harveyi* ด้วยยาปฏิชีวนะออกซีเตตร้าซัยคลิน 30 ไมโครกรัม

ชุดการทดลองที่ 2 การยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *V. harveyi* ด้วยโปรไบโอติก $1x10^4$ CFU/กรัม

ชุดการทดลองที่ 3 การยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *V. harveyi* ด้วยโปรไบโอติก $1x10^5$ CFU/กรัม

ชุดการทดลองที่ 4 การยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *V. harveyi* ด้วยโปรไบโอติก $1x10^6$ CFU/กรัม

3.3.1.2 เตรียมชุดทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ ดังรายละเอียดต่อไปนี้

1) เตรียมน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่งโซเดียมคลอไรด์ 8.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร จากนั้นเทลงในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

2) เตรียมน้ำเกลือความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่งโซเดียมคลอไรด์ 20 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร จากนั้นเทลงในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

3) เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy broth (TSB) ผสมกับเกลือความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB 30 กรัม และโซเดียมคลอไรด์ 20 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร จากนั้นเทลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่ปริมาตร 75 มิลลิลิตร แล้วปิดด้วยจุกสำลีและหุ้มด้วยกระดาษฟอยด์ นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

4) เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar (PCA) ผสมกับเกลือความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA 23.5 กรัม และโซเดียมคลอไรด์ 20 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร ต่อมานำไปเข้าไมโครเวฟจนวุ้นละลายหมด แล้วเทลงในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

5) นำอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA มาเทลงในเพลทพลาสติก ภายในตู้ปลอดเชื้อ โดยเทอาหารประมาณ 25 มิลลิลิตร/เพลท

6) นำ Tip และบิกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร ห่อด้วยกระดาษฟอยด์ แล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นนำ Tip และบิกเกอร์ไปอบในตู้อบไอร้อนที่อุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อทำให้น้ำที่อยู่ใน Tip และบิกเกอร์ระเหยออกหมด

3.3.1.3 เตรียมแบคทีเรีย *V. harveyi* ไปทำการเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ผสมกับเกลือโซเดียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บเซลล์แบคทีเรีย *V. harveyi* โดยนำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอนที่อุณหภูมิ 4 °C ความเร็วรอบ 3,600 g

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นาน 10 นาที และล้างด้วยน้ำเกลือความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 2 ครั้ง จากนั้นจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร แล้วปรับระดับความเข้มข้นของแบคทีเรียให้เท่ากับ 10^6 CFU/กรัม

3.3.1.4 เตรียมโปรไบโอติก 1 กรัม ละลายในน้ำเกลือความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ต่อมาทำการเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ผสมกับเกลือโซเดียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บเซลล์ของแบคทีเรียโปรไบโอติก โดยนำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอนที่อุณหภูมิ 4 °C ความเร็วรอบ 3,600 g นาน 10 นาที และล้างด้วยน้ำเกลือความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 2 ครั้ง จากนั้นจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร แล้วปรับระดับความเข้มข้นของแบคทีเรียให้เท่ากับ $1x10^4$, $1x10^5$ และ $1x10^6$ CFU/กรัม

3.3.1.5 นำแบคทีเรีย *V. harveyi* ปริมาตร 250 ไมโครลิตร มา Spread plate ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA และเจาะหลุมบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย Cork borer จำนวน 4 หลุม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.70 เซนติเมตร นำโปรไบโอติก $1x10^4$, $1x10^5$ และ $1x10^6$ CFU/กรัม และยาปฏิชีวนะออกซีเตตร้าซัยคลิน 30 ไมโครกรัม ปริมาตร 50 ไมโครลิตร หยดลงในหลุมของแต่ละชุดการทดลอง ต่อมานำจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA บ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C จากนั้นวัดวงใสที่เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *V. harveyi* ทุกๆ 12 ชั่วโมง เพื่อทำการเปรียบเทียบผลของโปรไบโอติกกับยาปฏิชีวนะออกซีเตตร้าซัยคลิน

3.3.2 การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของอุณหภูมิและความเข้มข้นโปรไบโอติก ต่ออัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติกในการผสมอาหารผงสำเร็จรูป

3.3.2.1 การทดลองที่ 2.1 ศึกษาผลของอุณหภูมิ ต่ออัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติกในการผสมอาหารผงสำเร็จรูป

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอดสมบูรณ์ (Complete randomized design ; CRD) โดยใช้ผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกผสมอาหารกุ้ง 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม แล้วนำไปผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิ 29±2 °C และอบที่อุณหภูมิ 40, 60 และ 80 °C ซึ่งแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 4 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 4 ซ้ำ ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 อาหารผงที่ไม่มีการผสมโปรไบโอติก แล้วนำไปผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิ 29±2 °C และอบที่อุณหภูมิ 40, 60 และ 80 °C (ชุดควบคุม)

ชุดการทดลองที่ 2 อาหารผงที่ผสมโปรไบโอติก 1 กรัม/กิโลกรัม แล้วนำไปผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิ 29±2 °C และอบที่อุณหภูมิ 40, 60 และ 80 °C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชุดการทดลองที่ 3 อาหารผงที่ผสมโปรไบโอติก 3 กรัม/กิโลกรัม แล้วนำไปผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิ 29±2 °C และอบที่อุณหภูมิ 40, 60 และ 80 °C

ชุดการทดลองที่ 4 อาหารผงที่ผสมโปรไบโอติก 5 กรัม/กิโลกรัม แล้วนำไปผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิ 29±2 °C และอบที่อุณหภูมิ 40, 60 และ 80 °C

1) เตรียมน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่งโซเดียมคลอไรด์ 8.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร จากนั้นใช้ Micropipet ดูดน้ำเกลือลงในหลอดทดลองขนาด 16 มิลลิเมตร แต่ละหลอดจำนวน 9 มิลลิลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

2) เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ผสมกับเกลือความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA 23.5 กรัม และโซเดียมคลอไรด์ 20 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร ต่อมานำไปเข้าไมโครเวฟจนวุ้นละลายหมด แล้วเทลงในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

3) นำอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA มาเทลงในเพลทพลาสติก ภายในตู้ปลอดเชื้อ โดยเทอาหารประมาณ 25 มิลลิลิตร/เพลท

4) แบ่งอาหารกุ้งออกเป็น 4 ชุดการทดลอง โดยแต่ละชุดการทดลองจะมีการผสมโปรไบโอติก 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม ซึ่งก่อนที่จะมีการผสมโปรไบโอติกลงไปในอาหารจะต้องผสมโปรไบโอติกกับน้ำมันปลาก่อน (ใช้น้ำมันปลา 5 มิลลิลิตร ต่อปริมาณอาหาร 100 กรัม) เพราะน้ำมันปลาจะช่วยเคลือบให้โปรไบโอติกติดกับอาหาร สำหรับอาหารชุดควบคุมเท่านั้น ที่จะมีการใช้น้ำมันปลาผสมลงไปในอาหารเพียงอย่างเดียว ต่อมาผึ่งอาหารให้แห้งที่อุณหภูมิ 29±2 °C เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำอาหารของแต่ละชุดการทดลองออกมา 10 กรัม เพื่อหาอัตราการรอดตายของแบคทีเรียเริ่มต้นที่มีอยู่ในอาหารที่อุณหภูมิ 29±2 °C

5) แบ่งอาหารของแต่ละชุดการทดลองออกเป็นอีก 3 ส่วน แต่ละส่วนนำไปอบที่อุณหภูมิ 40, 60 และ 80 °C เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำอาหารของแต่ละชุดการทดลองออกมา 10 กรัม และเจือจางอาหารที่อบระดับอุณหภูมิต่างๆ ด้วยน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับการเจือจาง 10^{-1}-10^{-6} แล้วตรวจหาอัตราการรอดตายของแบคทีเรียโดยวิธี Drop plate โดยหยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA อย่างละ 5 ตำแหน่ง/เพลท ตำแหน่งละ 10 ไมโครลิตร

6) นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA บ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำมาตรวจนับโคโลนีที่เกิดขึ้น เพื่อเป็นการตรวจสอบผลของระดับอุณหภูมิ ต่ออัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติกในอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.2.2 การทดลองที่ 2.2 ศึกษาผลของความเข้มข้นโปรไบโอติก ต่ออัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติกในการผสมอาหารผงสำเร็จรูป

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอดสมบูรณ์ (Complete randomized design ; CRD) โดยการใช้ผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกผสมอาหารกุ้ง 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม ซึ่งแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 4 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 4 ซ้ำ ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 อาหารผงที่ไม่มีการผสมโปรไบโอติก (ชุดควบคุม)

ชุดการทดลองที่ 2 อาหารผงที่ผสมโปรไบโอติก 1 กรัม/กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 3 อาหารผงที่ผสมโปรไบโอติก 3 กรัม/กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 4 อาหารผงที่ผสมโปรไบโอติก 5 กรัม/กิโลกรัม

1) เตรียมน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่งโซเดียมคลอไรด์ 8.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร จากนั้นใช้ Micropipet ดูดน้ำเกลือลงในหลอดทดลองขนาด 16 มิลลิเมตร แต่ละหลอดจำนวน 9 มิลลิลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

2) เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ผสมกับเกลือความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA 23.5 กรัม และโซเดียมคลอไรด์ 20 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร ต่อมานำไปเข้าไมโครเวฟจนวุ้นละลายหมด แล้วเทลงในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

3) นำอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA มาเทลงในเพลทพลาสติก ภายในตู้ปลอดเชื้อ โดยเทอาหารประมาณ 25 มิลลิลิตร/เพลท

4) แบ่งอาหารกุ้งออกเป็น 4 ชุดการทดลอง โดยแต่ละชุดการทดลองจะมีการผสมโปรไบโอติก 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม ซึ่งก่อนที่จะมีการผสมโปรไบโอติกลงไปในอาหารจะต้องผสมโปรไบโอติกกับน้ำมันปลาก่อน (ใช้น้ำมันปลา 5 มิลลิลิตร ต่อปริมาณอาหาร 100 กรัม) เพราะน้ำมันปลาจะช่วยเคลือบให้โปรไบโอติกติดกับอาหาร สำหรับอาหารชุดควบคุมเท่านั้น ที่จะมีการใช้น้ำมันปลาผสมลงไปในอาหารเพียงอย่างเดียว ต่อมาผึ่งอาหารให้แห้งที่อุณหภูมิ 29±2 °C เป็นเวลา 30 นาที

5) นำอาหารของแต่ละชุดการทดลองออกมา 10 กรัม และเจือจางอาหารด้วยน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับการเจือจาง 10^{-1}-10^{-6} แล้วตรวจหาอัตราการรอดตายของแบคทีเรียโดยวิธี Drop plate โดยหยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA อย่างละ 5 ตำแหน่ง/เพลท ตำแหน่งละ 10 ไมโครลิตร

6) นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA บ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำมาตรวจนับโคโลนี เพื่อเป็นการตรวจสอบผลของความเข้มข้นโปรไบโอติกต่ออัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติกในอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.3 การทดลองที่ 3 ศึกษาผลของระยะเวลาการเก็บรักษาอาหาร ต่ออัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติกในการผสมอาหารผงสำเร็จรูป

3.3.3.1 วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอดสมบูรณ์ (Complete randomized design ; CRD) สำหรับศึกษาระยะเวลาการเก็บรักษาอาหาร ต่ออัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติกในการผสมอาหารผงสำเร็จรูป โดยการใช้ผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกผสมลงไปในอาหาร แล้วนำไปอบด้วยอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทดลองที่ 2 ซึ่งแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 4 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 4 ซ้ำ ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 อาหารผงที่ไม่มีการผสมโปรไบโอติกอบที่อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทดลองที่ 2 (ชุดควบคุม)

ชุดการทดลองที่ 2 อาหารผงที่ผสมโปรไบโอติก 1 กรัม/กิโลกรัม อบที่อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทดลองที่ 2

ชุดการทดลองที่ 3 อาหารผงที่ผสมโปรไบโอติก 3 กรัม/กิโลกรัม อบที่อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทดลองที่ 2

ชุดการทดลองที่ 4 อาหารผงที่ผสมโปรไบโอติก 5 กรัม/กิโลกรัม อบที่อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทดลองที่ 2

3.3.3.2 เตรียมชุดทดสอบปริมาณแบคทีเรียโปรไบโอติก ดังรายละเอียดต่อไปนี้

1) เตรียมน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่งโซเดียมคลอไรด์ 8.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร จากนั้นใช้ Micropipet ดูดน้ำเกลือลงในหลอดทดลองขนาด 16 มิลลิเมตร แต่ละหลอดจำนวน 9 มิลลิลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

2) เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ผสมกับเกลือความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA 23.5 กรัม และโซเดียมคลอไรด์ 20 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร ต่อมานำไปเข้าไมโครเวฟจนวุ้นละลายหมด แล้วเทลงในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

3) นำอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA มาเทลงในเพลทพลาสติก ภายในตู้ปลอดเชื้อ โดยเทอาหารประมาณ 25 มิลลิลิตร/เพลท

3.3.3.3 แบ่งอาหารกุ้งออกเป็น 4 ชุดการทดลอง โดยแต่ละชุดการทดลองจะมีการผสมโปรไบโอติก 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม ซึ่งก่อนที่จะมีการผสมโปรไบโอติกลงไปในอาหารจะต้องผสมโปรไบโอติกกับน้ำมันปลาก่อน (ใช้น้ำมันปลา 5 มิลลิลิตร ต่อปริมาณอาหาร 100 กรัม) เพราะน้ำมันปลาจะช่วยเคลือบให้โปรไบโอติกติดกับอาหาร สำหรับอาหารชุดควบคุมเท่านั้น ที่จะมีการใช้น้ำมันปลาผสมลงไปในอาหารเพียงอย่างเดียว ต่อมาผึ่งอาหารให้แห้งที่อุณหภูมิ 29±2 °C เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปอบด้วยอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทดลองที่ 2 เป็นเวลา 30 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.3.4 ทำการสุ่มอาหารของแต่ละชุดการทดลองออกมา 10 กรัม สำหรับหาอัตราการรอดตายของแบคทีเรีย เมื่อเริ่มต้นการทดลอง และทุกๆ 1 เดือน จนกระทั่งครบ 5 เดือน

3.3.3.5 เจือจางอาหารของแต่ละชุดการทดลองด้วยน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับการเจือจาง 10^{-1}-10^{-6} แล้วตรวจหาจำนวนเชื้อโดยวิธี Drop plate โดยหยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA อย่างละ 5 ตำแหน่ง/เพลท ตำแหน่งละ 10 ไมโครลิตร

3.3.3.6 นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA บ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำมาตรวจนับโคโลนี เพื่อเป็นการตรวจสอบผลของระยะเวลาการเก็บรักษาอาหาร ต่ออัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติกในอาหาร

3.3.4 การทดลองที่ 4 ศึกษาผลของโปรไบโอติกที่ผสมในอาหารผงสำเร็จรูป ต่อการเจริญเติบโต และการยับยั้งแบคทีเรีย *Vibrio* ในลูกกุ้งขาวแวนนาไม

3.3.4.1 วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอดสมบูรณ์ (Complete randomized design ; CRD) เลี้ยงลูกกุ้งโดยใช้ผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกผสมลงในอาหาร ซึ่งแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 4 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำใช้ลูกกุ้ง 300 ตัว เป็นลูกกุ้งระยะโพสลาวา 15 ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 อาหารผงที่ไม่มีการผสมโปรไบโอติก (ชุดควบคุม)

ชุดการทดลองที่ 2 อาหารผงที่ผสมโปรไบโอติก 1 กรัม/กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 3 อาหารผงที่ผสมโปรไบโอติก 3 กรัม/กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 4 อาหารผงที่ผสมโปรไบโอติก 5 กรัม/กิโลกรัม

3.3.4.2 เตรียมน้ำความเค็ม 30 พีพีที ใส่ในถังพลาสติกที่หุ้มด้วยถุงพลาสติกสีดำ ถังละ 150 ลิตร จำนวน 16 ถัง และนำหัวทรายต่อเข้ากับปั๊มลม เพื่อให้ออกซิเจนกับลูกกุ้ง จากนั้นทำการสุ่มลูกกุ้งระยะโพสลาวา 15 จำนวน 300 ตัว ใส่ในแต่ละถัง

3.3.4.3 ให้อาหารปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักตัวลูกกุ้งทุกวัน วันละ 4 ครั้ง (ที่เวลา 8.00, 12.00, 16.00 และ 20.00 น.) และทำการถ่ายน้ำทุกๆ 4 วัน โดยดูดน้ำออกประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ และเติมน้ำใหม่ใส่เข้าไป

3.3.4.4 ทำการสุ่มลูกกุ้ง 10 ตัว ของแต่ละซ้ำในแต่ละชุดการทดลอง เมื่อเริ่มต้นการทดลอง และทุกๆ 7 วัน จนกระทั่งครบ 28 วัน

1) เก็บข้อมูลเกี่ยวกับการเจริญเติบโต โดยนำลูกกุ้งมาชั่งน้ำหนักและวัดความยาว และเมื่อสิ้นสุดการทดลอง นับจำนวนลูกกุ้งในแต่ละถัง เพื่อคำนวณหาอัตราการรอดตายของลูกกุ้งในแต่ละชุดการทดลอง

2) เก็บข้อมูลเกี่ยวกับแบคทีเรีย *Vibrio* ในลูกกุ้ง

2.1) เตรียมน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่งโซเดียมคลอไรด์ 8.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร จากนั้นใช้ Micropipet ดูดน้ำเกลือลงในหลอดทดลองขนาด 16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิลลิเมตร แต่ละหลอดจำนวน 9 มิลลิลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

2.2) เตรียมน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่งโซเดียมคลอไรด์ 8.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร จากนั้นเทลงในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

2.3) เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ผสมกับเกลือความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA 23.5 กรัม และโซเดียมคลอไรด์ 20 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร ต่อมานำไปเข้าไมโครเวฟจนวุ้นละลายหมด แล้วเทลงในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

2.4) เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulphate citrate bile salts sucrose (TCBS) โดยชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS 89 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร ต่อมานำไปเข้าไมโครเวฟจนวุ้นละลายหมด แล้วเทลงในขวดใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.5) นำอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA และ TCBS มาเทลงในเพลทพลาสติก ภายในตู้ปลอดเชื้อ โดยเทอาหารประมาณ 25 มิลลิลิตร/เพลท

2.6) นำตัวอย่างลูกกุ้งชั่งน้ำหนักและทำความสะอาด โดยล้างด้วยน้ำกลั่นและซับด้วยกระดาษทิชชูที่สะอาด จากนั้นนำลูกกุ้งมาบดทั้งตัวแล้วผสมกับน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วนลูกกุ้ง (w):น้ำเกลือ (v) (1:10 w/v) แล้วใช้ Micropipet ดูดตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่ใส่น้ำเกลือไว้แล้ว 9 มิลลิลิตร จะทำให้ความเข้มข้นของตัวอย่างถูกเจือจางลง 10 เท่า หรือ 10^{-1} และทำจนกระทั่งถึงระดับการเจือจาง 10^{-6} จากนั้นตรวจสอบหาจำนวนแบคทีเรียโดยวิธี Drop plate โดยดูดตัวอย่างหยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA และ TCBS อย่างละ 5 ตำแหน่ง/เพลท ตำแหน่งละ 10 ไมโครลิตร

2.7) นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA และ TCBS ไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำมาตรวจนับโคโลนี

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของชุดการทดลองโดยใช้ Duncan's new multiple range test ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการหลักสูตรวิทยาศาสตร์การประมง สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.6 ระยะเวลาดำเนินการ

เดือนมิถุนายน 2553 – เดือนกุมภาพันธ์ 2554

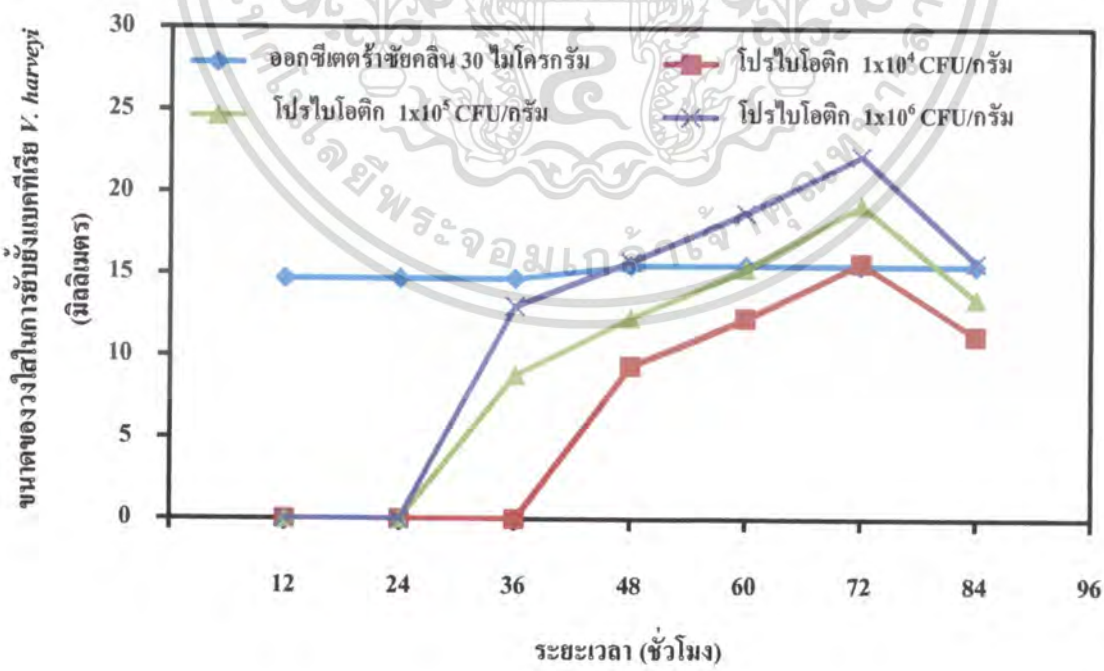
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลอง

4.1 การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของโปรไบโอติก ต่อการยับยั้งแบคทีเรีย *V. harveyi* ในห้องปฏิบัติการ

4.1.1 ผลของยาปฏิชีวนะออกซีเตตร้าซัยคลิน และผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก PondSafe ต่อการเกิดวงใส (Clear zone) ในการยับยั้งแบคทีเรีย *V. harveyi* ในห้องปฏิบัติการ

จากการทดลองใช้ยาปฏิชีวนะออกซีเตตร้าซัยคลิน 30 ไมโครกรัม และผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก PondSafe $1x10^4$, $1x10^5$ และ $1x10^6$ CFU/กรัม ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *V. harveyi* บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ในห้องปฏิบัติการ พบว่า การใช้ยาปฏิชีวนะออกซีเตตร้าซัยคลิน 30 ไมโครกรัม สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *V. harveyi* ตั้งแต่ 12 ชั่วโมง และการเกิดวงใสมีขนาดคงที่จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง ส่วนการใช้ผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก PondSafe $1x10^4$, $1x10^5$ และ $1x10^6$ CFU/กรัม มีขนาดของวงใสเพิ่มขึ้นหลังจากระยะเวลาผ่านไป 36 ชั่วโมง และขนาดของวงใสเพิ่มขึ้นมากที่สุดหลังจากระยะเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมง และลดลงเมื่อเวลาผ่านไป 84 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.1)



ภาพที่ 4.1 การเกิดวงใสในการยับยั้งแบคทีเรีย *V. harveyi* (มิลลิเมตร) ในห้องปฏิบัติการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์เปรียบเทียบทางสถิติ พบว่า การเกิดวงใสในการการยับยั้งแบคทีเรีย *V. harveyi* ของชุดการทดลองที่ใช้ยาปฏิชีวนะออกซีเตตร้าซัยคลิน 30 ไมโครกรัม และชุดการทดลองที่ใช้โปรไบโอติก PondSafe $1x10^4$, $1x10^5$ และ $1x10^6$ CFU/กรัม มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) ตั้งแต่ระยะเวลา 12 ชั่วโมง จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง โดยชุดการทดลองที่ใช้โปรไบโอติก PondSafe $1x10^4$ และ $1x10^5$ CFU/กรัม มีการเกิดวงใสในการยับยั้งแบคทีเรีย *V. harveyi* คือ 15.69±0.12 และ 15.31±0.33 มิลลิเมตร ซึ่งมีค่าไม่ต่างกับชุดการทดลองที่ใช้ยาปฏิชีวนะออกซีเตตร้าซัยคลิน 30 ไมโครกรัม (15.50±0.23 มิลลิเมตร) ($P>0.05$) ที่ระยะเวลา 72 และ 60 ชั่วโมง ตามลำดับ ส่วนชุดการทดลองที่ใช้โปรไบโอติก PondSafe $1x10^6$ CFU/กรัม (15.75±0.14 มิลลิเมตร) มีการเกิดวงใสในการยับยั้งแบคทีเรีย *V. harveyi* ซึ่งมีค่าไม่ต่างกับชุดการทดลองที่ใช้ยาปฏิชีวนะออกซีเตตร้าซัยคลิน 30 ไมโครกรัม (15.50±0.23 มิลลิเมตร) ($P>0.05$) ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง และมีการเกิดวงใสในการยับยั้งแบคทีเรีย *V. harveyi* เท่ากับ 18.75±0.14 และ 22.25±0.16 มิลลิเมตร ที่ระยะเวลา 60 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งมีค่ามากกว่าทุกชุดการทดลอง ($P<0.05$) (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 การเกิดวงใสในการยับยั้งแบคทีเรีย *V. harveyi* (มิลลิเมตร) ในห้องปฏิบัติการ

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณยาปฏิชีวนะออกซีเตตร้าซัยคลินและโปรไบโอติก			
	30 ไมโครกรัม	$1x10^4$ CFU/กรัม	$1x10^5$ CFU/กรัม	$1x10^6$ CFU/กรัม
12	$14.69±0.06^b$	0^a	0^a	0^a
24	$14.69±0.06^b$	0^a	0^a	0^a
36	$14.69±0.06^d$	0^a	$8.81±0.19^b$	$13.00±0.44^c$
48	$15.50±0.23^c$	$9.38±0.16^a$	$12.31±0.33^b$	$15.75±0.14^c$
60	$15.50±0.23^b$	$12.28±0.16^a$	$15.31±0.33^b$	$18.75±0.14^c$
72	$15.50±0.23^a$	$15.69±0.12^a$	$19.25±0.23^b$	$22.25±0.16^c$
84	$15.50±0.23^c$	$11.25±0.37^a$	$13.50±0.18^b$	$15.75±0.16^c$

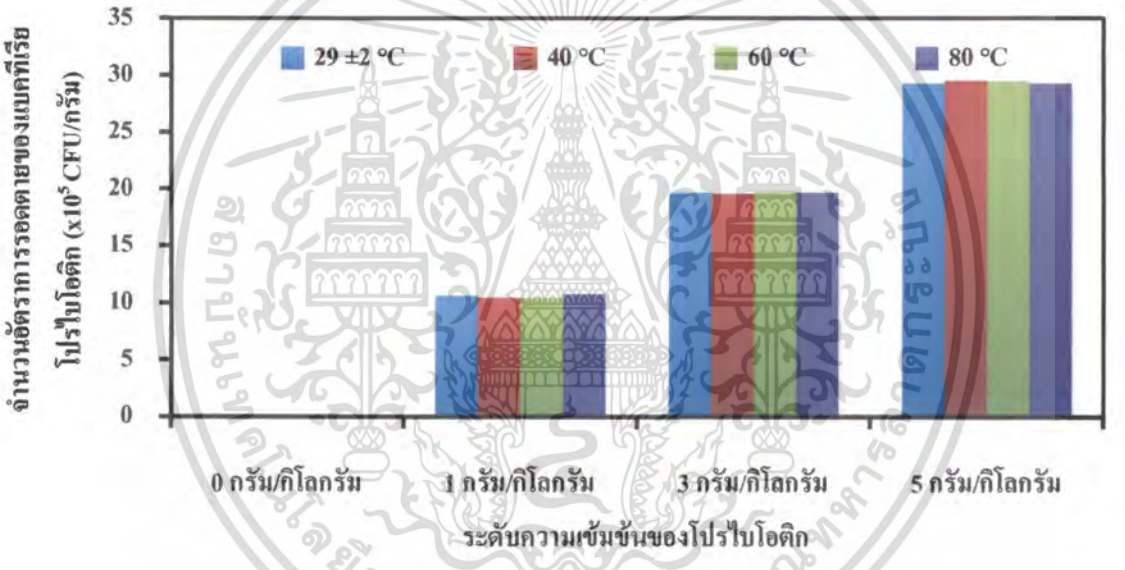
อักษรที่ต่างกันในแนวนอน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของอุณหภูมิและความเข้มข้นโปรไบโอติก ต่ออัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติกในการผสมอาหารผงสำเร็จรูป

4.2.1 ผลของอุณหภูมิ ต่ออัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติก ในการผสมอาหารผงสำเร็จรูป

จากการทดลองนำอาหารกุ้งผสมโปรไบโอติก 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม แล้วนำไปผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิ 29±2 °C และอบที่อุณหภูมิ 40, 60 และ 80 °C พบว่า ในแต่ละชุดของการทดลองอาหารกุ้งผสมโปรไบโอติกที่ความเข้มข้นต่างกัน แล้วนำไปผึ่งให้แห้งและอบที่อุณหภูมิต่างๆ มีจำนวนอัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติกในอาหาร ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ในทุกอุณหภูมิของแต่ละชุดการทดลอง (ภาพที่ 4.2)



ภาพที่ 4.2 จำนวนอัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติก (x10^5 CFU/กรัม) ที่ผสมลงในอาหาร 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม แล้วนำไปผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิ 29±2 °C และอบที่อุณหภูมิ 40, 60 และ 80 °C

เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์เปรียบเทียบทางสถิติ พบว่า อุณหภูมิไม่มีผลต่อจำนวนอัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติกในอาหารอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) (ตารางที่ 4.2) โดยชุดการทดลองอาหารกุ้งที่ไม่ผสมโปรไบโอติก แล้วนำไปผึ่งให้แห้งและอบที่อุณหภูมิต่างกัน ไม่มีแบคทีเรียในอาหารทุกอุณหภูมิ และเมื่อเปรียบเทียบทางสถิติ พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชุดการทดลองอาหารกุ้งผสมโปรไบโอติก 1 กรัม/กิโลกรัม แล้วนำไปผึ่งให้แห้งและอบที่อุณหภูมิต่างกัน พบว่า มีจำนวนอัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติกในอาหารคือ $10.65\pm0.10x10^5$, $10.45\pm0.13x10^5$, $10.45\pm0.17x10^5$ และ $10.80\pm0.32x10^5$ CFU/กรัม ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$)

ชุดการทดลองอาหารกุ้งผสมโปรไบโอติก 3 กรัม/กิโลกรัม แล้วนำไปผึ่งให้แห้งและอบที่อุณหภูมิต่างกัน พบว่า มีจำนวนอัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติกในอาหารคือ $19.70\pm0.10x10^5$, $19.55\pm0.10x10^5$, $19.80\pm0.08x10^5$ และ $19.70\pm0.24x10^5$ CFU/กรัม ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$)

ชุดการทดลองอาหารกุ้งผสมโปรไบโอติก 5 กรัม/กิโลกรัม แล้วนำไปผึ่งให้แห้งและอบที่อุณหภูมิต่างกัน พบว่า มีจำนวนอัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติกในอาหารคือ $29.30\pm0.06x10^5$, $29.55\pm0.05x10^5$, $29.50\pm0.13x10^5$ และ $29.30\pm0.10x10^5$ CFU/กรัม ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$)

ตารางที่ 4.2 จำนวนอัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติก ($x10^5$ CFU/กรัม) ที่ผสมลงในอาหาร 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม แล้วนำไปผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิ 29±2 °C และอบที่อุณหภูมิ 40, 60 และ 80 °C

อุณหภูมิ	ปริมาณโปรไบโอติก (กรัม/กิโลกรัม)			
(°C)	0	1	3	5
29±2	0[a]	10.65±0.10[a]	19.70±0.10[a]	29.30±0.06[a]
40	0[a]	10.45±0.13[a]	19.55±0.10[a]	29.55±0.05[a]
60	0[a]	10.45±0.17[a]	19.80±0.08[a]	29.50±0.13[a]
80	0[a]	10.80±0.32[a]	19.70±0.24[a]	29.30±0.10[a]

อักษรที่เหมือนกันในแนวตั้ง หมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

4.2.2 ผลของความเข้มข้นโปรไบโอติก ต่ออัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติก ในการผสมอาหารผงสำเร็จรูป

จากการทดลองนำอาหารกุ้งผสมโปรไบโอติก 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม แล้วนำไปผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิ 29±2 °C เนื่องจากว่าอุณหภูมิไม่มีผลต่อจำนวนอัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติกในอาหาร พบว่า ชุดการทดลองอาหารกุ้งผสมโปรไบโอติกที่ความเข้มข้นต่างกัน มีผลต่อจำนวนอัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติกในอาหารอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 4.3) โดยชุดการทดลองอาหารกุ้งผสมโปรไบโอติก 5 กรัม/กิโลกรัม มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จำนวนอัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติกในอาหารมากที่สุดคือ $29.30\pm0.06\times10^5$ CFU/กรัม รองลงมาคือ ชุดการทดลองอาหารกุ้งผสมโปรไบโอติก 3, 1 และ 0 กรัม/กิโลกรัม มีจำนวนอัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติกในอาหาร $19.70\pm0.10\times10^5$, $10.65\pm0.10\times10^5$ และ 0 CFU/กรัม ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$)

ตารางที่ 4.3 จำนวนอัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติก ($x10^5$ CFU/กรัม) ที่ผสมลงในอาหาร 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม แล้วนำไปผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิ 29±2 °C

อุณหภูมิ	ปริมาณโปรไบโอติก (กรัม/กิโลกรัม)			
(°C)	0	1	3	5
29±2	0^a	10.65 ± 0.10^b	19.70 ± 0.10^c	29.30 ± 0.06^d

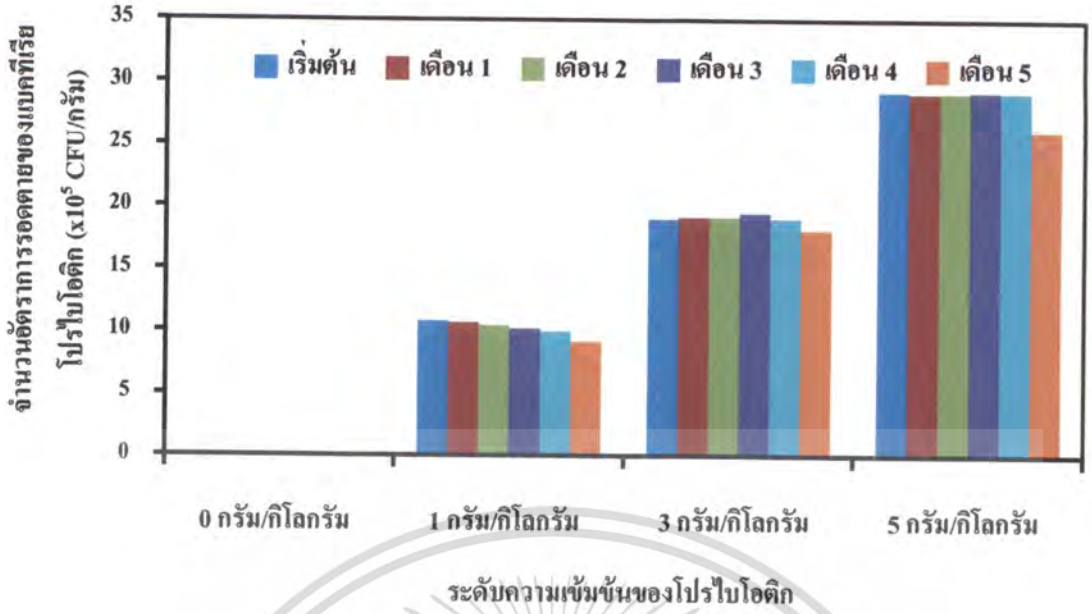
อักษรที่ต่างกันในแนวนอน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

4.3 การทดลองที่ 3 ศึกษาผลของระยะเวลาการเก็บรักษาอาหาร ต่ออัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติกในการผสมอาหารผงสำเร็จรูป

4.3.1 ผลของระยะเวลาการเก็บรักษาอาหาร ต่ออัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติกในการผสมอาหารผงสำเร็จรูป

จากการทดลองศึกษาระยะเวลาการเก็บรักษาอาหารที่ผสมโปรไบโอติก 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม ที่อุณหภูมิ 29±2 °C ต่ออัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติกในอาหาร ระยะเวลา 5 เดือน โดยนำอาหารไปอบที่อุณหภูมิ 80 °C เพราะว่าในขั้นตอนการผลิตอาหารกุ้งต้องใช้อุณหภูมิที่สูง และในการทดลองที่ 2 พบว่า อุณหภูมิไม่มีอิทธิพลต่อจำนวนอัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติกในอาหารอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) จึงเลือกนำอาหารกุ้งไปอบที่อุณหภูมิ 80 °C เพื่อจะได้สอดคล้องกับอุณหภูมิในขั้นตอนการผลิตของทางภาคอุตสาหกรรม ซึ่งจากการทดลอง พบว่า ชุดการทดลองอาหารกุ้งผสมโปรไบโอติก 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม และนำไปอบที่อุณหภูมิ 80 °C มีจำนวนอัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติกในอาหารลดลงหลังจากผ่านระยะเวลาการเก็บรักษาอาหาร 5 เดือน ส่วนชุดการทดลองอาหารกุ้งที่ไม่ผสมโปรไบโอติก และนำไปอบที่อุณหภูมิ 80 °C ไม่มีแบคทีเรียเกิดขึ้นในอาหาร (ภาพที่ 4.3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.3 จำนวนอัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติก ($x10^5$ CFU/กรัม) ที่ผสมลงในอาหาร 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม ในระยะเวลาการเก็บรักษาอาหาร 5 เดือน

เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์เปรียบเทียบทางสถิติ พบว่า ระยะเวลาการเก็บรักษาอาหารที่ผสมโปรไบโอติก มีผลต่อจำนวนอัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติกในอาหารอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 4.4) โดยชุดการทดลองอาหารกุ้งผสมโปรไบโอติก 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม มีจำนวนอัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติกในอาหารเริ่มต้นคือ $10.80\pm0.32x10^5$, $19.00\pm0.29x10^5$ และ $29.30\pm0.10x10^5$ CFU/กรัม ตามลำดับ และหลังจากผ่านระยะเวลาการเก็บรักษาอาหาร 5 เดือน ชุดการทดลองอาหารกุ้งผสมโปรไบโอติก 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม มีจำนวนอัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติกในอาหารลดลงคือ $9.15\pm0.29x10^5$, $18.10\pm0.45x10^5$ และ $26.15\pm0.22x10^5$ CFU/กรัม ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) ในแต่ละชุดการทดลอง ส่วนชุดการทดลองอาหารกุ้งที่ไม่ผสมโปรไบโอติก ไม่มีแบคทีเรียเกิดขึ้นในอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 จำนวนอัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติก ($x10^5$ CFU/กรัม) ที่ผสมลงในอาหาร 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม ในระยะเวลาการเก็บรักษาอาหาร 5 เดือน

ระยะเวลา	ปริมาณโปรไบโอติก (กรัม/กิโลกรัม)			
(เดือน)	0	1	3	5
เริ่มต้น	0^{a}	10.80 ± 0.32^{a}	19.00 ± 0.29^{a}	29.30 ± 0.10^{a}
1	0^{a}	10.65 ± 0.13^{a}	19.15 ± 0.10^{a}	29.15 ± 0.33^{a}
2	0^{a}	10.45 ± 0.05^{ab}	19.15 ± 0.17^{a}	29.20 ± 0.00^{a}
3	0^{a}	10.20 ± 0.08^{ab}	19.50 ± 0.19^{a}	29.30 ± 0.13^{a}
4	0^{a}	9.95 ± 0.38^{b}	19.05 ± 0.17^{a}	29.25 ± 0.13^{a}
5	0^{a}	9.15 ± 0.29^{c}	18.10 ± 0.45^{b}	26.15 ± 0.22^{b}

อักษรที่ต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

4.4 การทดลองที่ 4 ศึกษาผลของโปรไบโอติกที่ใช้ผสมในอาหารผงสำเร็จรูป ต่อการเจริญเติบโต และการยับยั้งแบคทีเรีย *Vibrio* ในลูกกุ้งขาวแวนนาไม

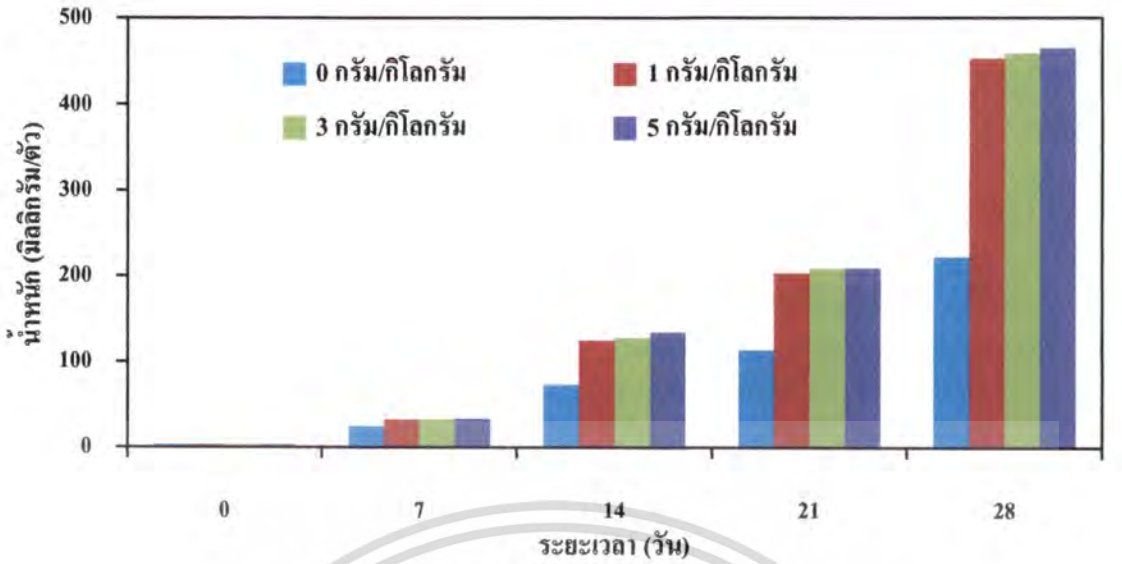
4.4.1 ผลของโปรไบโอติกที่ใช้ผสมในอาหารผงสำเร็จรูป ต่อการเจริญเติบโตของลูกกุ้งขาวแวนนาไม

จากการทดลองศึกษาการเจริญเติบโตของลูกกุ้งที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม โดยการชั่งน้ำหนัก และวัดความยาว ซึ่งจะทำการเก็บข้อมูลตั้งแต่เริ่มต้นการทดลองและทุกๆ 7 วัน จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง ส่วนการคำนวณหาอัตราการรอดตายของลูกกุ้งจะทำการเก็บข้อมูลหลังจากสิ้นสุดการทดลองเป็นระยะเวลา 28 วัน

4.4.1.1 น้ำหนักของลูกกุ้งขาวแวนนาไม

น้ำหนักตัวของลูกกุ้งชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม พบว่า น้ำหนักตัวของลูกกุ้งเพิ่มขึ้นตั้งแต่วันที่ 7 จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) กับลูกกุ้งชุดการทดลองที่ไม่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก (ภาพที่ 4.4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.4 น้ำหนักของลูกกุ้งขาวแวนนาไม (มิลลิกรัม/ตัว) ที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม เป็นระยะเวลา 28 วัน

เมื่อนำค่าเฉลี่ยน้ำหนักของลูกกุ้งมาวิเคราะห์เปรียบเทียบทางสถิติ ซึ่งแสดงในตารางที่ 4.5 พบว่า เมื่อเริ่มต้นการทดลอง ลูกกุ้งชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักคือ 3.60±0.09, 3.58±0.09, 3.60±0.15 และ 3.65±0.10 มิลลิกรัม/ตัว ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) และตั้งแต่วันที่ 7 จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง ค่าเฉลี่ยน้ำหนักของลูกกุ้งชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม มีค่ามากกว่าลูกกุ้งชุดการทดลองที่ไม่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก โดยเมื่อสิ้นสุดการทดลอง พบว่า ลูกกุ้งชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักคือ 453.48±2.98, 459.70±7.25 และ 465.25±4.85 มิลลิกรัม/ตัว ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) แต่มีค่ามากกว่าลูกกุ้งชุดการทดลองที่ไม่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก (222.43±7.50 มิลลิกรัม/ตัว) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

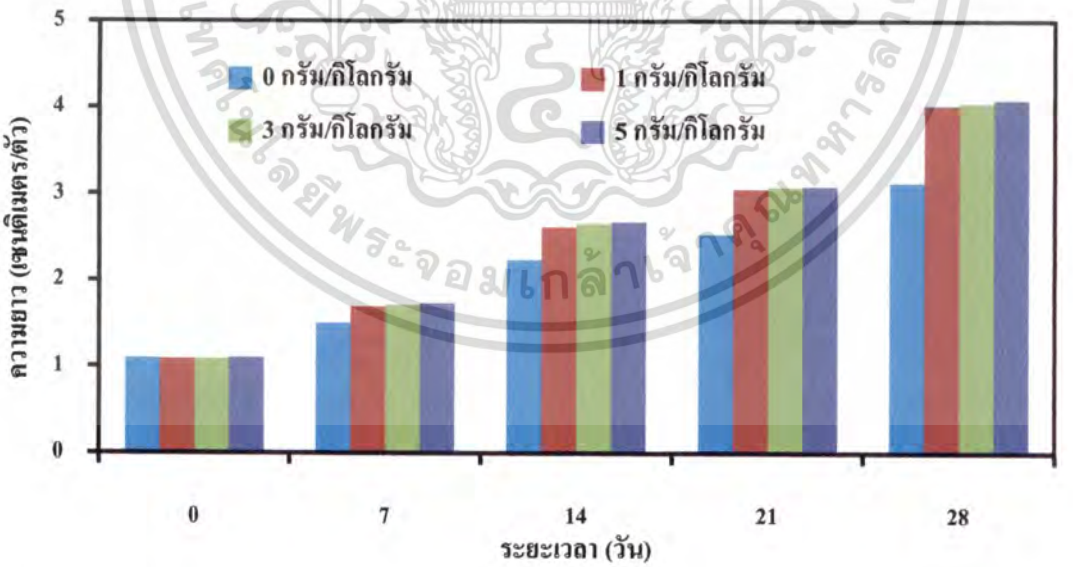
ตารางที่ 4.5 น้ำหนักของลูกกุ้งขาวแวนนาไม (มิลลิกรัม/ตัว) ที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม เป็นระยะเวลา 28 วัน

ระยะเวลา (วัน)	ปริมาณโปรไบโอติก (กรัม/กิโลกรัม)			
	0	1	3	5
0	3.60±0.09[a]	3.58±0.09[a]	3.60±0.15[a]	3.65±0.10[a]
7	25.15±0.73[a]	32.45±0.47[b]	33.15±0.95[b]	33.53±0.42[b]
14	73.40±3.22[a]	124.58±5.57[b]	127.83±4.48[b]	134.40±3.18[b]
21	113.60±0.90[a]	203.45±3.29[b]	208.08±4.97[b]	208.85±7.53[b]
28	222.43±7.50[a]	453.48±2.98[b]	459.70±7.25[b]	465.25±4.85[b]

อักษรที่ต่างกันในแนวนอน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

4.4.1.2 ความยาวของลูกกุ้งขาวแวนนาไม

ความยาวของลูกกุ้งชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม พบว่า ความยาวของลูกกุ้งเพิ่มขึ้นตั้งแต่วันที่ 7 จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) กับลูกกุ้งชุดการทดลองที่ไม่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก (ภาพที่ 4.5)



ภาพที่ 4.5 ความยาวของลูกกุ้งขาวแวนนาไม (เซนติเมตร/ตัว) ที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม เป็นระยะเวลา 28 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์เปรียบเทียบทางสถิติ พบว่า เมื่อเริ่มต้นการทดลอง ลูกกุ้งชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม มีค่าเฉลี่ยความยาวคือ 1.10±0.02, 1.09±0.01, 1.09±0.03 และ 1.10±0.01 เซนติเมตร/ตัว ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) และตั้งแต่วันที่ 7 จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง ค่าเฉลี่ยความยาวของลูกกุ้งชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม มีค่ามากกว่าลูกกุ้งชุดการทดลองที่ไม่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก โดยเมื่อสิ้นสุดการทดลอง พบว่า ลูกกุ้งชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม มีค่าเฉลี่ยความยาวคือ 4.03±0.01, 4.05±0.02 และ 4.09±0.01 เซนติเมตร/ตัว ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) แต่มีค่ามากกว่าลูกกุ้งชุดการทดลองที่ไม่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก (3.13±0.04 เซนติเมตร/ตัว) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) (ตารางที่ 4.6)

ตารางที่ 4.6 ความยาวของลูกกุ้งขาวแวนนาไม (เซนติเมตร/ตัว) ที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม เป็นระยะเวลา 28 วัน

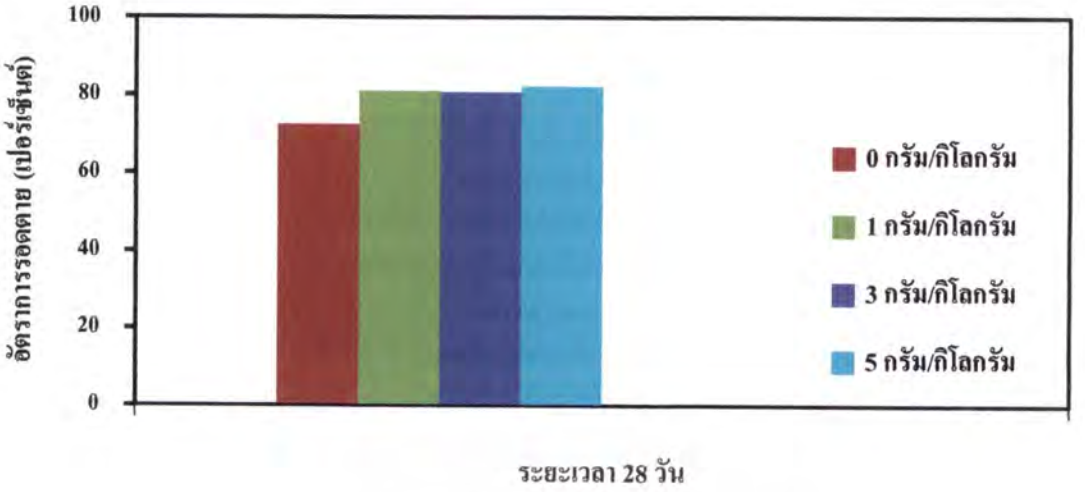
ระยะเวลา	ปริมาณโปรไบโอติก (กรัม/กิโลกรัม)			
(วัน)	0	1	3	5
0	1.10±0.02^{a}	1.09±0.01^{a}	1.09±0.03^{a}	1.10±0.01^{a}
7	1.50±0.01^{a}	1.70±0.01^{b}	1.72±0.02^{bc}	1.73±0.00^{c}
14	2.24±0.03^{a}	2.62±0.04^{b}	2.66±0.03^{b}	2.68±0.02^{b}
21	2.53±0.01^{a}	3.05±0.02^{b}	3.08±0.03^{b}	3.09±0.04^{b}
28	3.13±0.04^{a}	4.03±0.01^{b}	4.05±0.02^{b}	4.09±0.01^{b}

อักษรที่ต่างกันในแนวนอน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

4.4.1.3 อัตราการรอดตายของลูกกุ้งขาวแวนนาไม

อัตราการรอดตายของลูกกุ้งชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม พบว่า เมื่อสิ้นสุดการทดลองเป็นระยะเวลา 28 วัน อัตราการรอดตายของลูกกุ้งชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกทั้ง 3 ระดับ มีค่าสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) เมื่อเทียบกับลูกกุ้งชุดการทดลองที่ไม่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก ในขณะที่ลูกกุ้งชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกทั้ง 3 ระดับ มีอัตราการรอดตายไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) (ภาพที่ 4.6)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.6 อัตราการรอดตายลูกกุ้งขาวแวนนาไม (เปอร์เซ็นต์) ที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม หลังจากสิ้นสุดการทดลองเป็นระยะเวลา 28 วัน

เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์เปรียบเทียบทางสถิติ พบว่า เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ค่าเฉลี่ยอัตราการรอดตายของลูกกุ้งชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม มีค่ามากกว่าลูกกุ้งชุดการทดลองที่ไม่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก ($P<0.05$) (ตารางที่ 4.7) โดยลูกกุ้งชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม มีค่าเฉลี่ยอัตราการรอดตายคือ 81.10±1.11, 80.80±1.36 และ 82.30±1.16 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) แต่มีค่ามากกว่าลูกกุ้งชุดการทดลองที่ไม่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก (72.40±1.41 เปอร์เซ็นต์) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตารางที่ 4.7 อัตราการรอดตายลูกกุ้งขาวแวนนาไม (เปอร์เซ็นต์) ที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม หลังจากสิ้นสุดการทดลองเป็นระยะเวลา 28 วัน

ระยะเวลา	ปริมาณโปรไบโอติก (กรัม/กิโลกรัม)			
(วัน)	0	1	3	5
28	72.40±1.41[a]	81.10±1.11[b]	80.80±1.36[b]	82.30±1.16[b]

อักษรที่ต่างกันในแนวนอนเดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

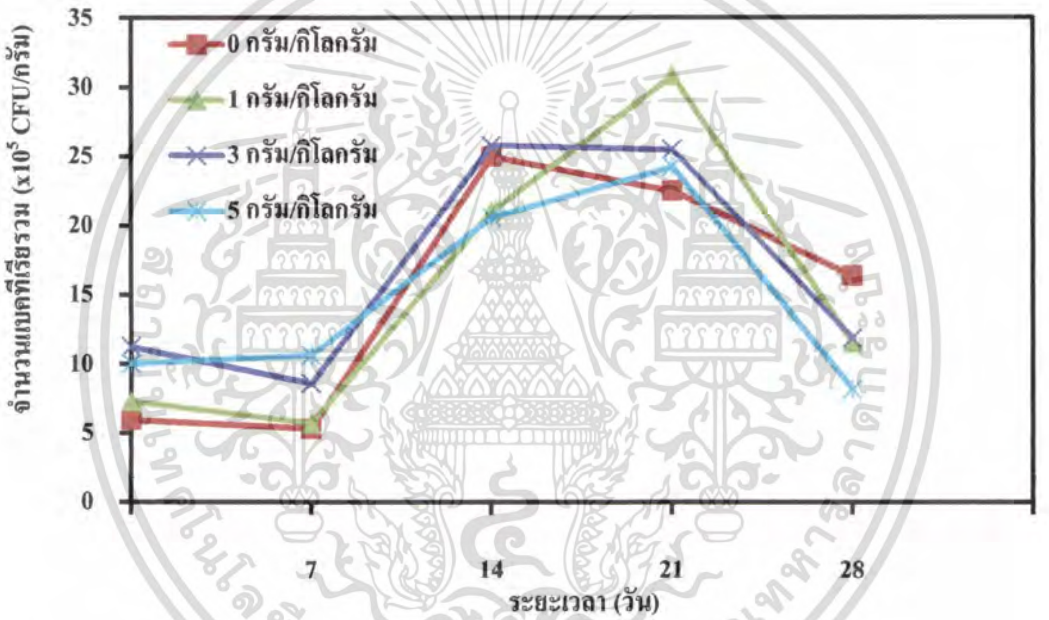
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4.2 ผลของโปรไบโอติกที่ใช้ผสมในอาหารผงสำเร็จรูป ต่อการยับยั้งแบคทีเรีย *Vibrio* ในลูกกุ้งขาวแวนนาไม

จากการทดลองศึกษาการยับยั้งแบคทีเรีย *Vibrio* ในลูกกุ้งขาวแวนนาไม ที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม ซึ่งจะทำการเก็บข้อมูลตั้งแต่เริ่มต้นการทดลองและทุกๆ 7 วัน จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลองเป็นระยะเวลา 28 วัน

4.4.2.1 จำนวนแบคทีเรียรวมที่เกิดในลูกกุ้งขาวแวนนาไม

จำนวนแบคทีเรียรวมที่เกิดในลูกกุ้งชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม พบว่า จำนวนแบคทีเรียรวมที่เกิดในลูกกุ้ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ตั้งแต่เริ่มต้นการทดลอง จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง (ภาพที่ 4.7)



ภาพที่ 4.7 จำนวนแบคทีเรียรวม (x10^5 CFU/กรัม) ที่เกิดในลูกกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม เป็นระยะเวลา 28 วัน

เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์เปรียบเทียบทางสถิติ พบว่า ค่าเฉลี่ยจำนวนแบคทีเรียรวมที่เกิดในลูกกุ้งชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ตั้งแต่เริ่มต้นการทดลอง จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง (ตารางที่ 4.8) โดยเมื่อสิ้นสุดการทดลอง พบว่า ลูกกุ้งชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม มีค่าเฉลี่ยจำนวนแบคทีเรียรวมคือ $16.35\pm4.07\times10^5$, $11.55\pm1.56\times10^5$, $11.90\pm4.65\times10^5$ และ $8.20\pm1.01\times10^5$ CFU/กรัม ตามลำดับ ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

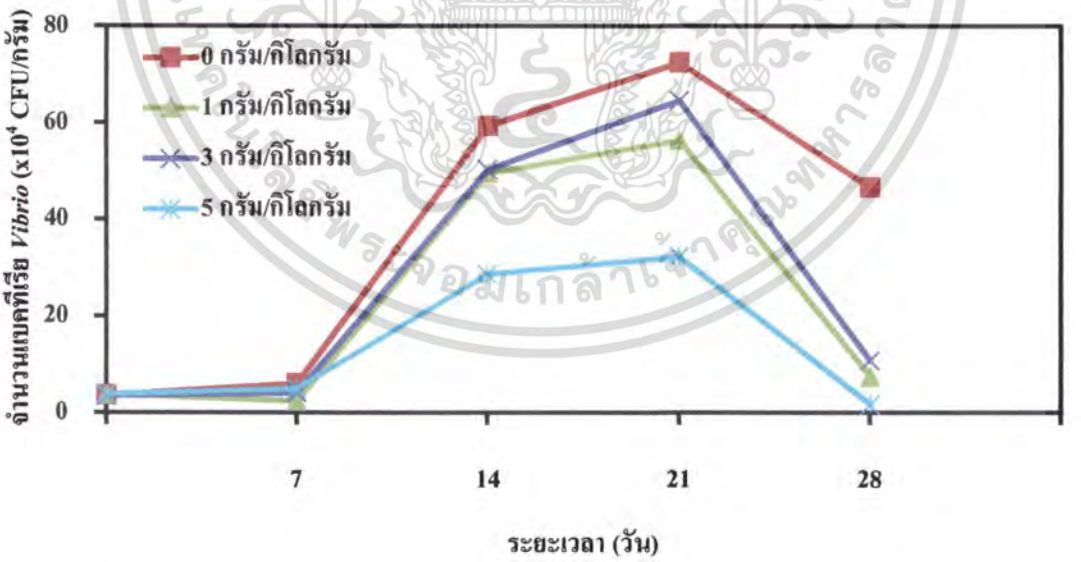
ตารางที่ 4.8 จำนวนแบคทีเรียรวม ($x10^4$ CFU/กรัม) ที่เกิดในลูกกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม เป็นระยะเวลา 28 วัน

ระยะเวลา (วัน)	ปริมาณโปรไบโอติก (กรัม/กิโลกรัม)			
	0	1	3	5
0	5.95±0.41[a]	7.30±1.91[a]	11.25±2.36[a]	10.05±1.26[a]
7	5.30±1.56[a]	5.70±1.44[a]	8.60±2.69[a]	10.65±3.07[a]
14	25.00±2.03[a]	21.05±3.82[a]	25.80±5.52[a]	20.60±2.50[a]
21	22.50±8.13[a]	30.85±1.30[a]	25.50±4.01[a]	24.25±2.01[a]
28	16.35±4.07[a]	11.55±1.56[a]	11.90±4.65[a]	8.20±1.01[a]

อักษรที่เหมือนกันในแนวนอน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

4.4.2.2 จำนวนแบคทีเรีย *Vibrio* ที่เกิดในลูกกุ้งขาวแวนนาไม

จำนวนแบคทีเรีย *Vibrio* ที่เกิดในลูกกุ้งชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม พบว่า จำนวนแบคทีเรีย *Vibrio* ที่เกิดในลูกกุ้ง มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) หลังจากระยะเวลาผ่านไป 14 วัน จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง (ภาพที่ 4.8)



ภาพที่ 4.8 จำนวนแบคทีเรีย *Vibrio* ($x10^4$ CFU/กรัม) ที่เกิดในลูกกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม เป็นระยะเวลา 28 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์เปรียบเทียบทางสถิติ พบว่า ค่าเฉลี่ยจำนวนแบคทีเรีย *Vibrio* ที่เกิดในลูกกุ้งชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 5 กรัม/กิโลกรัม มีค่าน้อยกว่าลูกกุ้งชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 0, 1 และ 3 กรัม/กิโลกรัม ($P<0.05$) หลังจากระยะเวลาผ่านไป 14 และ 21 วัน (ตารางที่ 4.9) แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อสิ้นสุดการทดลอง พบว่า ลูกกุ้งชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม มีค่าเฉลี่ยจำนวนแบคทีเรีย *Vibrio* คือ $7.55\pm3.62\times10^4$, $10.80\pm5.47\times10^4$ และ $1.75\pm0.48\times10^4$ CFU/กรัม ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) แต่มีค่าน้อยกว่าลูกกุ้งชุดการทดลองที่ไม่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก ($46.65\pm20.19\times10^4$ CFU/กรัม) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตารางที่ 4.9 จำนวนแบคทีเรีย *Vibrio* ($\times10^4$ CFU/กรัม) ที่เกิดในลูกกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม เป็นระยะเวลา 28 วัน

ระยะเวลา	ปริมาณโปรไบโอติก (กรัม/กิโลกรัม)			
(วัน)	0	1	3	5
0	3.70 ± 0.75^{a}	3.85 ± 1.94^{a}	3.55 ± 1.47^{a}	3.85 ± 0.46^{a}
7	6.05 ± 1.65^{a}	2.40 ± 0.59^{a}	4.15 ± 1.35^{a}	5.00 ± 2.25^{a}
14	59.35 ± 6.68^{a}	49.55 ± 7.12^{a}	50.30 ± 4.74^{a}	28.65 ± 3.19^{b}
21	72.55 ± 12.63^{a}	56.45 ± 3.42^{ab}	64.65 ± 20.23^{ab}	32.30 ± 2.10^{c}
28	46.65 ± 20.19^{a}	7.55 ± 3.62^{b}	10.80 ± 5.47^{b}	1.75 ± 0.48^{b}

อักษรที่ต่างกันในแนวนอน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
วิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 การศึกษาผลของโปรไบโอติก ต่อการยับยั้งแบคทีเรีย *V. harveyi* ในห้องปฏิบัติการ

5.1.1 ผลของยาปฏิชีวนะออกซีเตตร้าซัยคลิน และผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก PondSafe ต่อการเกิดวงใส (Clear zone) ในการยับยั้งแบคทีเรีย *V. harveyi* ในห้องปฏิบัติการ

การศึกษาการใช้ยาปฏิชีวนะออกซีเตตร้าซัยคลิน 30 ไมโครกรัม และผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก PondSafe $1x10^4$, $1x10^5$ และ $1x10^6$ CFU/กรัม ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *V. harveyi* บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ในห้องปฏิบัติการ พบว่า ชุดการทดลองที่ใช้ยาปฏิชีวนะออกซีเตตร้าซัยคลิน 30 ไมโครกรัม มีการเกิดวงใสในการยับยั้งแบคทีเรีย *V. harveyi* ที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมง ส่วนชุดการทดลองที่ใช้โปรไบโอติก PondSafe $1x10^4$, $1x10^5$ และ $1x10^6$ CFU/กรัม มีการเกิดวงใสในการยับยั้งแบคทีเรีย *V. harveyi* ไม่แตกต่างกับชุดการทดลองที่ใช้ยาปฏิชีวนะออกซีเตตร้าซัยคลิน 30 ไมโครกรัม ($P>0.05$) ที่ระยะเวลา 72, 60 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ และชุดการทดลองที่ใช้โปรไบโอติก PondSafe $1x10^5$ และ $1x10^6$ CFU/กรัม มีการเกิดวงใสในการยับยั้งแบคทีเรีย *V. harveyi* มากกว่าชุดการทดลองที่ใช้ยาปฏิชีวนะออกซีเตตร้าซัยคลิน 30 ไมโครกรัม ($P<0.05$) ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับปาจรีย์ จือเหลียง และคณะ (2554) ศึกษาผลของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. 5 สายพันธุ์ ในการยับยั้งแบคทีเรีย *V. harveyi* พบว่า แบคทีเรีย *Bacillus* แต่ละชนิดทั้ง 5 สายพันธุ์ และแบคทีเรีย *Bacillus* รวมทุกสายพันธุ์ สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *V. harveyi* ได้ดีที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง ส่วนมณจันทร์ เมฆธน และ กมลพร มาแสวง (2543) ศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรีย 8 สายพันธุ์ ในการยับยั้งแบคทีเรีย *V. harveyi* บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า มีแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *V. harveyi* ได้แก่ *B. subtilis* AM-01, *B. licheniformis* AM-04 และ *Nitrosomonas* sp. AM-11 ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง และมินตรา ศีลอุดม และคณะ (2551) ศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในการยับยั้งแบคทีเรีย *V. harveyi* พบว่า แบคทีเรีย *B. licheniformis* สายพันธุ์ BLF และ *B. licheniformis* สายพันธุ์ BLS สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *V. harveyi* ได้ ที่ระยะเวลา 96 ชั่วโมง ซึ่งจากผลการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า การใช้แบคทีเรีย *Bacillus* spp. เป็นโปรไบโอติก สามารถยับยั้งแบคทีเรียชนิดที่ก่อให้เกิดโรคในสัตว์น้ำได้ เนื่องจากแบคทีเรีย *Bacillus* spp. มีการสร้างสารปฏิชีวนะขึ้นมา (Williams and Vickers. 1986) ซึ่งสารเหล่านี้จะไปมีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างเปปติโดไกลแคน ที่เป็นส่วนประกอบของ Cell wall และมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตหรือทำลายแบคทีเรียที่ก่อโรค (Moriarty. 1999) เช่น แบคทีเรีย *B. subtilis* จะมีการสร้างสาร Mycobacillin, Subtilin, Bacilysin, Bacillin และ Subsprorin

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนแบคทีเรีย *B. licheniformis* สามารถสร้างสาร Bacitraciin, Proticin และ Licheniformin (Edward and Amold. 1977) หรือเป็นผลมาจากกลไกการทำลายแบคทีเรียก่อโรคของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. โดยการหลั่งเอนไซม์ที่สามารถย่อยเมือกที่ล้อมรอบเซลล์แบคทีเรียแกรมลบที่ก่อโรค ทำให้สารปฏิชีวนะที่แบคทีเรีย *Bacillus* spp. สร้างขึ้น สามารถเข้าทำลายองค์ประกอบภายในของเซลล์ ส่งผลให้แบคทีเรียที่ก่อโรคหยุดการเจริญเติบโตและถูกทำลายในที่สุด (Moriarty. 1998)

5.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิและความเข้มข้นโปรไบโอติก ต่ออัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติกในการผสมอาหารผงสำเร็จรูป

5.2.1 ผลของอุณหภูมิและความเข้มข้นของโปรไบโอติก ต่ออัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติก ในการผสมอาหารผงสำเร็จรูป

การศึกษาการนำอาหารกุ้งผสมโปรไบโอติก 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม แล้วนำไปผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิ 29±2 °C และอบที่อุณหภูมิ 40, 60 และ 80 °C พบว่า ในแต่ละชุดของการทดลองอาหารกุ้งผสมโปรไบโอติกที่ความเข้มข้นต่างกัน แล้วนำไปผึ่งให้แห้งและอบที่อุณหภูมิต่างๆ มีจำนวนอัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติกในอาหาร ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ในทุกอุณหภูมิของแต่ละชุดการทดลอง และชุดการทดลองอาหารกุ้งผสมโปรไบโอติก 5 กรัม/กิโลกรัม มีจำนวนอัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติกในอาหารมากที่สุด สอดคล้องกับ Chaiyawan *et al.* (2010) ศึกษาลักษณะสมบัติและคุณสมบัติของโปรไบโอติกสายพันธุ์ *Bacillus* sp. ที่แยกได้จากไก่เนื้อ เพื่อนำไปพัฒนาเป็นสารเสริมอาหารสำหรับการเลี้ยงไก่ โดยนำแบคทีเรีย *Bacillus* sp. T3-1 มาผสมในอาหารและนำไปอบที่อุณหภูมิ 80 และ 100 °C เป็นเวลา 0, 15, 30, 60 และ 180 นาที พบว่า การอบอาหารที่อุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 180 นาที ไม่มีผลต่ออัตราการรอดตายของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. T3-1 ในอาหารอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) แต่ขณะที่การอบอาหารที่อุณหภูมิ 100 °C จะทำให้อัตราการรอดตายของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. T3-1 ลดลงเรื่อยๆ จนกระทั่งถึงระยะเวลา 180 นาที พบว่า มีอัตราการรอดตายของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. T3-1 เป็น $3.55\pm0.17\times10^4$ CFU/กรัม ($P<0.05$) ซึ่งจากผลการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า การใช้แบคทีเรีย *Bacillus* spp. เป็นโปรไบโอติกผสมลงในอาหารและอบที่อุณหภูมิสูง จะไม่มีผลต่ออัตราการรอดตายของแบคทีเรียในอาหาร เนื่องจากว่าแบคทีเรีย *Bacillus* spp. เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่สร้างสปอร์ที่มีความทนทานต่อสภาวะแวดล้อมต่างๆ ได้เป็นอย่างดี โดยสปอร์สามารถทนสภาพร้อนชื้นได้ถึง 100 °C และต้องใช้เวลา 20-30 นาที จึงจะทำให้ความสามารถในการมีชีวิตของมันลด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จำนวนลงได้ แต่ถ้าเป็นสภาวะที่ร้อนแห้ง ความสามารถในการมีชีวิตของมันจะเพิ่มขึ้นอีกถึง 1000 เท่า (Nicholson *et al.* 2000) ซึ่งคุณสมบัติการทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิสูง กำลังเป็นที่ต้องการอย่างมากในภาคอุตสาหกรรม เนื่องจากเอนไซม์ที่สร้างจากแบคทีเรียชนิดนี้ จะทนทานได้ดีที่อุณหภูมิสูง ทำให้ทนทานต่อระดับอุณหภูมิที่สูงในกระบวนการผลิตและมีอายุการใช้งานที่นาน อีกทั้งยังทนต่อสารที่มักทำลายโปรตีนได้ เช่น Detergent และ Organic solvents นอกจากการทนความร้อนได้แล้ว แบคทีเรีย *Bacillus* spp. ยังสามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ รวมทั้งผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิดที่เป็นประโยชน์ต่อการย่อยอาหารและการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำ และการที่แบคทีเรีย *Bacillus* spp. สามารถผลิตได้ปริมาณมาก รวมทั้งยังง่ายต่อการเก็บรักษาและการขนส่ง (Green *et al.* 1999 ; Nicholson *et al.* 2000 ; Oggioni *et al.* 2003 ; Van Rijn *et al.* 1995) ทำให้แบคทีเรีย *Bacillus* spp. เป็นที่น่าสนใจในภาคอุตสาหกรรม

5.3 การศึกษาผลของระยะเวลาการเก็บรักษาอาหาร ต่ออัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติกในการผสมอาหารผงสำเร็จรูป

5.3.1 ผลของระยะเวลาการเก็บรักษาอาหาร ต่ออัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติกในการผสมอาหารผงสำเร็จรูป

การศึกษาระยะเวลาการเก็บรักษาอาหารที่ผสมโปรไบโอติก 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม โดยนำอาหารไปอบที่อุณหภูมิ 80 °C เพราะว่าในขั้นตอนการผลิตอาหารกุ้งต้องใช้อุณหภูมิที่สูง และในการทดลองที่ 2 พบว่า อุณหภูมิไม่มีผลต่อจำนวนอัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติกในอาหารอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) จึงเลือกนำอาหารกุ้งไปอบที่อุณหภูมิ 80 °C เพื่อจะได้สอดคล้องกับอุณหภูมิในขั้นตอนการผลิตของทางภาคอุตสาหกรรม จากนั้นเก็บรักษาอาหารกุ้งที่อุณหภูมิ 29±2 °C เป็นระยะเวลา 5 เดือน พบว่า ชุดการทดลองอาหารกุ้งผสมโปรไบโอติก 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม มีจำนวนอัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติกในอาหารลดลง หลังจากผ่านระยะเวลาการเก็บรักษาอาหาร 5 เดือน ส่วนชุดการทดลองอาหารกุ้งที่ไม่ผสมโปรไบโอติก ไม่มีแบคทีเรียเกิดขึ้นในอาหาร ซึ่งสอดคล้องกับ Lalloo *et al.* (2010) ศึกษาระยะเวลาการเก็บรักษาสปอร์ของแบคทีเรีย *B. cereus* NRRL 100132 ที่อุณหภูมิ 4, 22 และ 32 °C หลังจากผ่านกระบวนการผลิตเพื่อนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ พบว่า อุณหภูมิต่างๆ ที่ใช้ในการเก็บรักษาแบคทีเรีย *B. cereus* NRRL 100132 เป็นระยะเวลา 42 วัน ไม่มีผลต่อการลดจำนวนของสปอร์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) และ Rengpipat *et al.* (2000) ศึกษาระยะเวลาการเก็บรักษาอาหารกุ้งกุลาดำที่ผสมโปรไบโอติกสายพันธุ์ *Bacillus* S11 ที่อุณหภูมิ 4 °C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นระยะเวลา 90 วัน พบว่า เมื่อเริ่มต้นการเก็บรักษาอาหาร มีจำนวนอัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติก *Bacillus* S11 ในอาหาร $4.69x10^{10}$ CFU/กรัม และหลังจากผ่านระยะเวลาการเก็บรักษาอาหาร 7 วัน มีจำนวนอัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติก *Bacillus* S11 ในอาหาร $1.39x10^{10}$ CFU/กรัม และเมื่อสิ้นสุดการทดลอง พบว่า มีจำนวนอัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติก *Bacillus* S11 ในอาหาร 10^{10} CFU/กรัม ซึ่งลดลงเพียงเล็กน้อย เมื่อเทียบกับตอนเริ่มต้นการทดลอง ส่วน Mesalhy *et al.* (2008) ศึกษาระยะเวลาการเก็บรักษาอาหารปลานิลที่ผสมโปรไบโอติก *B. subtilis* และ *L. Acidophilus* ที่อุณหภูมิ 4 และ 25 °C พบว่า อาหารที่ผสมโปรไบโอติก *B. subtilis* มีจำนวนอัตราการรอดตายของแบคทีเรียในอาหาร มากกว่าอาหารที่ผสมโปรไบโอติก *L. Acidophilus* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) จากผลการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า การใช้แบคทีเรีย *Bacillus* spp. เป็นโปรไบโอติกผสมลงในอาหาร จะช่วยเพิ่มระยะเวลาการเก็บรักษาอาหารที่ผสมโปรไบโอติก เมื่ออยู่ในสภาวะการเก็บรักษาอาหารที่แตกต่างกัน ได้นานกว่าการใช้แบคทีเรียสายพันธุ์อื่น เนื่องจากเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาอาหารผ่านไป ปริมาณของแบคทีเรียโปรไบโอติกในผลิตภัณฑ์หรืออาหารต่างๆ อาจลดจำนวนลงจนอยู่ในระดับที่ไม่มีประโยชน์ใดๆ เนื่องจากแบคทีเรียไม่สามารถรอดชีวิตอยู่ได้ในปริมาณมากพอ เมื่ออยู่รวมกับผลิตภัณฑ์หรืออาหารต่างๆ และถ้านำแบคทีเรียเหล่านี้ไปใช้ จะทำให้ความสามารถในการทำงานของแบคทีเรียลดลง แต่เนื่องจากแบคทีเรีย *Bacillus* spp. เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่สร้างสปอร์ที่มีความทนทานต่อสภาวะแวดล้อมต่างๆ ได้เป็นอย่างดี โดยเมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม แบคทีเรีย *Bacillus* spp. จะมีการสร้างสปอร์ที่เรียกว่า เอนโดสปอร์ ซึ่งมีผนังหนาเพื่อเป็นการป้องกันรังสี แรงกระแทก อุณหภูมิที่ร้อนจัดหรือเย็นจัด และสภาพการขาดแคลนอาหาร และนอกจากนี้เอนโดสปอร์จะสามารถงอกกลับมาเป็นเซลล์ใหม่ได้ง่าย รวมทั้งยังง่ายต่อการเก็บรักษาและการขนส่ง จึงเป็นอีกเหตุผลหนึ่งที่ทำให้แบคทีเรีย *Bacillus* spp. เป็นที่น่าสนใจในภาคอุตสาหกรรม (Green *et al.* 1999 ; Nicholson *et al.* 2000 ; Oggioni *et al.* 2003 ; Van Rijn *et al.* 1995)

5.4 การศึกษาผลของโปรไบโอติกที่ใช้ผสมในอาหารผงสำเร็จรูป ต่อการเจริญเติบโตและการยับยั้งแบคทีเรีย *Vibrio* ในลูกกุ้งขาวแวนนาไม

5.4.1 ผลของโปรไบโอติกที่ใช้ผสมในอาหารผงสำเร็จรูป ต่อการเจริญเติบโตของลูกกุ้งขาวแวนนาไม

การศึกษาการเจริญเติบโตของลูกกุ้งขาวแวนนาไม ที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม โดยการชั่งน้ำหนัก วัดความยาว และคำนวณหาอัตราการรอดตายของลูกกุ้ง พบว่า เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ลูกกุ้งชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 1, 3 และ 5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ทำซ้ำ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือแสวงหาผลประโยชน์ทางการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรัม/กิโลกรัม มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักคือ 453.48±2.98, 459.70±7.25 และ 465.25±4.85 มิลลิกรัม/ตัว ตามลำดับ และค่าเฉลี่ยความยาวคือ 4.03±0.01, 4.05±0.02 และ 4.09±0.01 เซนติเมตร/ตัว ตามลำดับ ส่วนค่าเฉลี่ยอัตราการรอดตายคือ 81.10±1.11, 80.80±1.36 และ 82.30±1.16 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) แต่มีค่ามากกว่าลูกกุ้งชุดการทดลองที่ไม่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับ Rengpipat *et al.* (1998) ทดลองใช้โปรไบโอติกสายพันธุ์ *Bacillus* S11 ผสมในอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำ พบว่า หลังจาก 100 วัน น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก (7.06±0.48 กรัม) มีค่ามากกว่ากุ้งกุลาดำที่ไม่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก (3.99±0.38 กรัม) ($P<0.05$) ส่วนอัตราการรอดตาย พบว่า กุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก (33.30±4.40 เปอร์เซ็นต์) มีอัตราการรอดตายมากกว่ากุ้งกุลาดำที่ไม่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก (15.80±5.20 เปอร์เซ็นต์) ($P<0.05$) และสอดคล้องกับ Wang (2007) ทดลองใช้แบคทีเรียที่มีการสังเคราะห์แสง และ *Bacillus* sp. จากบ่อเลี้ยงปลาคาร์พเป็นโปรไบโอติกผสมลงไปในอาหารเลี้ยงกุ้งขาว พบว่า เมื่อครบ 28 วัน ค่าเฉลี่ยน้ำหนักของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก (1.71±0.06 กรัม) มีค่ามากกว่ากุ้งขาวที่ไม่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก (1.57±0.05 กรัม) ($P<0.05$) นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับมนฑกานต์ สมบูรณ์ และคณะ (2552) ทดลองเติมจุลินทรีย์ 3 กลุ่ม คือ PondPlus, PondPlusE และ PondSafe ลงในบ่ออนุบาลลูกกุ้งขาวแวนนาไม พบว่า หลังจากเลี้ยงลูกกุ้งไปจนถึงระยะโพสลาร์วา 8 อัตราการรอดตายของลูกกุ้งบ่อที่ไม่มีการเติมจุลินทรีย์ (68.33±0.50 เปอร์เซ็นต์) และบ่อทดลองที่มีการเติมจุลินทรีย์ PondPlus (69.33±2.80 เปอร์เซ็นต์) ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) แต่มีอัตราการรอดตายต่ำกว่าบ่อทดลองที่มีการเติมจุลินทรีย์ PondPlusE (74.50±1.80 เปอร์เซ็นต์) และ PondSafe (78.22±4.23 เปอร์เซ็นต์) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เนื่องจากว่าสัตว์น้ำเมื่อได้รับโปรไบโอติกเข้าสู่ร่างกาย โปรไบโอติกจะไปเจริญเติบโตอยู่บริเวณทางเดินอาหารของสัตว์น้ำ และเข้าไปแย่งอาหารในบริเวณที่เกาะตั้งถิ่นฐาน ไม่ให้เหลือพอที่เชื้อจุลินทรีย์ชนิดใหม่จะใช้ในการเจริญเติบโตและขยายจำนวน จึงเป็นผลทำให้ลำไส้ของสัตว์น้ำสามารถดูดซึมสารอาหารไปใช้ได้อย่างเต็มที่ นอกจากนี้โปรไบโอติกยังสามารถกระตุ้นการสร้าง และการทำงานของเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหาร โดยการผลิตสารจำพวก Extracellular enzyme ที่มีส่วนช่วยในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่ช่วยในการย่อยของสัตว์น้ำ เช่น Amylase, Protease และ Lipase ซึ่งสร้างขึ้นภายในเซลล์แล้วถูกขับออกมาทำงานภายนอกเซลล์ เมื่อทำปฏิกิริยากับสารอาหารที่มีโมเลกุลใหญ่ จะทำให้สารอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีโมเลกุลเล็กลงจนถูกดูดซึมเข้าสู่เซลล์ได้ง่ายขึ้น เป็นผลทำให้กิจกรรมการย่อยของเอนไซม์สัตว์น้ำมีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้น (ชรินทร์ เขียวจรัส. 2539) ส่งผลให้สัตว์น้ำมีการเจริญเติบโตที่ดีขึ้น

5.4.2 ผลของโปรไบโอติกที่ใช้ผสมลงในอาหารผงสำเร็จรูป ต่อการยับยั้งแบคทีเรีย *Vibrio* ในลูกกุ้งขาวแวนนาไม

การศึกษาการยับยั้งแบคทีเรีย *Vibrio* ในลูกกุ้งขาวแวนนาไม ที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม พบว่า เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ลูกกุ้งชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม มีค่าเฉลี่ยจำนวนแบคทีเรียรวมที่เกิดในลูกกุ้ง คือ $16.35\pm4.07\times10^5$, $11.55\pm1.56\times10^5$, $11.90\pm4.65\times10^5$ และ $8.20\pm1.01\times10^5$ CFU/กรัม ตามลำดับ ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ส่วนจำนวนแบคทีเรีย *Vibrio* ที่เกิดในลูกกุ้ง พบว่า ลูกกุ้งชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 5 กรัม/กิโลกรัม มีค่าเฉลี่ยจำนวนแบคทีเรีย *Vibrio* น้อยกว่าลูกกุ้งชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 0, 1 และ 3 กรัม/กิโลกรัม ($P<0.05$) หลังจากระยะเวลาผ่านไป 14 และ 21 วัน แต่อย่างไรก็ตาม ในระหว่างทำการทดลองวันที่ 14 และ 21 มีจำนวนแบคทีเรีย *Vibrio* เกิดขึ้นมากกว่าระยะต่างๆ เนื่องจากเป็นช่วงที่สภาพภูมิอากาศมีการเปลี่ยนแปลง ทำให้อุณหภูมิของน้ำลดลง จึงส่งผลต่อระบบภูมิคุ้มกันในตัวลูกกุ้งลดลง เป็นสาเหตุทำให้แบคทีเรีย *Vibrio* สามารถเจริญเติบโตได้ดี ซึ่งสอดคล้องกับกิจการ ศุภมาตย์ และคณะ (2543) ทำการทดลองเรื่องผลของอุณหภูมิต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ พบว่า อุณหภูมิน้ำ 25 °C มีผลทำให้ปริมาณเม็ดเลือดรวม และค่าความสามารถการกำจัดเชื้อแบคทีเรียในน้ำเลือดลดต่ำลงกว่าในสภาวะอุณหภูมิน้ำ 30 °C เมื่อปริมาณเม็ดเลือดลดลงในสภาวะที่อุณหภูมิน้ำต่ำ จะส่งผลให้ระบบภูมิคุ้มกันโรคของกุ้งกุลาดำลดลงด้วย และลิลา เรืองแป้น (2540) กล่าวว่าเมื่อสัตว์น้ำอยู่ในสภาวะเครียด หรือมีภูมิคุ้มกันต่ำ แบคทีเรีย *Vibrio* จะกลายเป็นเชื้อก่อโรคที่ทำให้สัตว์น้ำป่วยและตายได้ และเมื่อสิ้นสุดการทดลอง พบว่า ลูกกุ้งชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม มีค่าเฉลี่ยจำนวนแบคทีเรีย *Vibrio* ที่เกิดในลูกกุ้งคือ $7.55\pm3.62\times10^4$, $10.80\pm5.47\times10^4$ และ $1.75\pm0.48\times10^4$ CFU/กรัม ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) แต่มีค่าน้อยกว่าชุดการทดลองที่ไม่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก ($46.65\pm20.19\times10^4$ CFU/กรัม) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เนื่องจากเมื่อสัตว์น้ำได้รับโปรไบโอติกเข้าสู่ร่างกาย โปรไบโอติกก็จะไปเจริญเติบโตอยู่บริเวณทางเดินอาหารของสัตว์น้ำ และแข่งขันกับเชื้อก่อโรคในการยึดเกาะกับเยื่อบุทางเดินอาหาร และมีการเพิ่มจำนวนบนเยื่อบุผนังลำไส้ โดยเฉพาะผนังลำไส้เล็กทุกส่วน ซึ่งจะแทรกตัวอยู่ที่ร่องของผนัง จึงช่วยลดการเกาะกลุ่มและทำให้เกิดการขับเชื้อก่อโรคออกจากทางเดินอาหาร (Karpinska *et al.* 2001) และการที่มันแปลกปลอมนี้เอง จึงสามารถดึงดูดให้แมคโครฟาร์จเดินทางมามาก ทำให้เป็นการกระตุ้นให้เกิดระบบภูมิคุ้มกันเฉพาะแห่งได้ดี นอกจากนี้โปรไบโอติกยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโต และทำลายเซลล์ของแบคทีเรีย *Vibrio* ได้ (เกรียงศักดิ์ พูลสุข.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2535) หรือมีการแย่งอาหารไม่ให้เหลือพอที่จุลินทรีย์ชนิดก่อโรค จะใช้ในการเจริญเติบโตและขยายจำนวน ซึ่งสอดคล้องกับนิตยา ยิ้มเจริญ และคณะ (2549) ทดลองใช้แบคทีเรียโปรไบโอติกสายพันธุ์ *B. subtilis* และ *B. licheniformis* ซึ่งแยกได้จากลำไส้กุ้งกุลาดำมาผสมอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำ และหลังจากกุ้งได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกเป็นระยะเวลา 1 เดือน จึงนำลำไส้กุ้งมาบด เพื่อนับปริมาณแบคทีเรีย *Vibrio* spp. พบว่า กุ้งที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกทุกวัน มีจำนวนแบคทีเรีย *Vibrio* spp. เฉลี่ยน้อยที่สุดคือ $0.22\pm0.19\times10^{6}$ CFU/กรัม ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) กับกุ้งที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกวันเว้นวัน แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับกุ้งที่ไม่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก และสอดคล้องกับไตรมาศ บุญไทย และคณะ (2550) ทดลองนำแบคทีเรียโปรไบโอติก *Bacillus* spp. ผสมลงในอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำเป็นเวลา 120 วัน พบว่า กุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกในรูปแบบเซลล์มีชีวิต และเซลล์แช่แข็ง มีปริมาณแบคทีเรีย *Vibrio* ในตับลดลงร้อยละ 46.13 และ 34.86 ตามลำดับ และปริมาณแบคทีเรีย *Vibrio* ในลำไส้ลดลงร้อยละ 62.21 และ 34.89 ตามลำดับ ในทางตรงกันข้ามกับปริมาณของแบคทีเรีย *Vibrio* ในตับและลำไส้ของกุ้งที่ไม่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกที่มีปริมาณเพิ่มขึ้น ซึ่งชี้ให้เห็นว่าแบคทีเรียโปรไบโอติกที่ผสมในอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำ มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณของแบคทีเรีย *Vibrio* ในขณะที่มนฑกานต์ สมบูรณ์ และคณะ (2552) ทดลองเติมจุลินทรีย์ 3 กลุ่ม คือ PondPlus, PondPlusE และ PondSafe ลงในบ่ออนุบาลลูกกุ้งขาวแวนนาไม ระยะนอเพลียสจนถึงระยะโพสลาร์วา 8 พบว่า หลังจาก 2 วัน บ่อที่เติมจุลินทรีย์ทั้ง 3 กลุ่ม มีปริมาณแบคทีเรีย *Vibrio* น้อยกว่าบ่อที่ไม่เติมจุลินทรีย์ แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) และหลังจากเติมจุลินทรีย์ 5 วัน ปริมาณแบคทีเรีย *Vibrio* ในบ่อที่เติมจุลินทรีย์ มีค่าน้อยกว่าบ่อที่ไม่เติมจุลินทรีย์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ซึ่งจากผลการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า การใช้แบคทีเรีย *Bacillus* spp. เป็นโปรไบโอติก สามารถลดปริมาณของแบคทีเรีย *Vibrio* ได้ โดย Moriarty (1998) กล่าวว่า การลดลงของแบคทีเรีย *Vibrio* อาจเป็นผลมาจากกลไกในการทำลายแบคทีเรียก่อโรคของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. โดยการแย่งสารอาหารและหลั่งเอนไซม์ที่สามารถย่อยเมือกที่ล้อมรอบเซลล์แบคทีเรียแกรมลบที่ก่อโรค ทำให้สารปฏิชีวนะที่แบคทีเรีย *Bacillus* spp. สร้างขึ้น สามารถเข้าทำลายองค์ประกอบภายในของเซลล์ ส่งผลให้แบคทีเรียก่อโรคหยุดการเจริญเติบโตและถูกทำลายในที่สุด และเมื่อแบคทีเรียก่อโรคลดลง จึงทำให้แบคทีเรีย *Bacillus* spp. เพิ่มจำนวนมากขึ้น เพื่อไปยึดเกาะบริเวณเยื่อบุทางเดินอาหารแทนที่แบคทีเรียก่อโรค และการที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. มีเปปติโดไกลแคนเป็นองค์ประกอบ รวมทั้งสารเมตาบอไลต์ที่เซลล์สร้างขึ้นมีสมบัติเป็นตัวกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Rengpipat *et al.* 2000) ซึ่งจะกระตุ้นการจับกินของระบบ Stimulating phagocytic activity ของเซลล์เม็ดเลือดชนิดกรานูลลาร์ของกุ้ง รวมทั้งยังกระตุ้นการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมที่เกิดจากกิจกรรมของเซลล์และสารน้ำ ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งพร้อมทำงาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตลอดเวลา ดังนั้นเมื่อแบคทีเรียก่อโรคเคลื่อนที่เข้าสู่เซลล์ ระบบภูมิคุ้มกันก็จะทำงานและกำจัดแบคทีเรียก่อโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Ziaei-Nejad *et al.* 2005)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 6
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

1. การใช้โปรไบโอติก PondSafe มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *V. harveyi* บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการ โดยโปรไบโอติก PondSafe $1x10^6$ CFU/กรัม มีการเกิดวงใสในการยับยั้งแบคทีเรีย *V. harveyi* มากที่สุดคือ 22.25±0.16 มิลลิเมตร เมื่อระยะเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมง

2. ระดับอุณหภูมิไม่มีผลต่อจำนวนอัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติกในอาหารกุ้ง โดยอาหารกุ้งผสมโปรไบโอติกที่ความเข้มข้นต่างกัน แล้วนำไปผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิ 29±2 °C และอบที่อุณหภูมิ 40, 60 และ 80 °C มีจำนวนอัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติก ไม่มีความแตกต่างกันในทุกอุณหภูมิของแต่ละความเข้มข้น

3. ความเข้มข้นของโปรไบโอติกที่ผสมลงในอาหารกุ้ง มีผลต่อจำนวนอัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติก โดยอาหารกุ้งผสมโปรไบโอติก 5 กรัม/กิโลกรัม มีจำนวนอัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติกในอาหารมากที่สุดคือ $29.30±0.06x10^5$ CFU/กรัม

4. ระยะเวลาการเก็บรักษาอาหารกุ้งที่ผสมโปรไบโอติก มีผลต่อจำนวนอัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติก โดยอาหารกุ้งผสมโปรไบโอติกแต่ละความเข้มข้น มีจำนวนอัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติก ลดลงหลังจากผ่านระยะเวลาการเก็บรักษา 5 เดือน

5. ลูกกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก มีผลต่อการเจริญเติบโต และจำนวนแบคทีเรีย *Vibrio* ที่เกิดในลูกกุ้ง โดยลูกกุ้งที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก มีค่าเฉลี่ยน้ำหนัก ความยาว และอัตราการรอดตาย มากกว่าลูกกุ้งที่ไม่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก ส่วนจำนวนแบคทีเรีย *Vibrio* ที่เกิดในลูกกุ้ง มีค่าเฉลี่ยน้อยกว่าลูกกุ้งที่ไม่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการผสมโปรไบโอติกลงในอาหารผงก่อนอัดเม็ดอาหารกุ้ง เพราะจะทำให้อาหารกุ้งมีจำนวนแบคทีเรียโปรไบโอติกเพิ่มขึ้น เนื่องจากอาหารผงมีพื้นที่ในการยึดเกาะของแบคทีเรียมากกว่าอาหารเม็ด

2. ควรวิเคราะห์คุณภาพของน้ำเลี้ยงกุ้ง เนื่องจากเวลาให้อาหารกุ้ง อาจทำให้โปรไบโอติกที่ผสมลงในอาหาร เมื่ออยู่ในน้ำจะมีบางส่วนหลุดออกจากอาหาร แล้วไปมีส่วนช่วยในการปรับปรุงคุณภาพของน้ำได้ด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

กิจการ ศุภมาตย์, จรีพร เรืองศรี, สุภฎา คีรีรัฐนิคม และ นเรศ ซ่วนยุก. 2543. "ผลของอุณหภูมิ ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำและความเป็นกรด – ด่างของน้ำต่อระบบภูมิคุ้มกันโรคและองค์ประกอบเลือดในกุ้งกุลาดำ." **วารสารสงขลานครินทร์ ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.** 22 (พิเศษ) : 605-613.

กิจจา อุไรรงค์, ธวัชชัย ศักดิ์ภู่อร่าม, วรวิทย์ วัชชวัลคุ และ ปรียพันธุ์ อุดมประเสริฐ. 2537. **การควบคุมและป้องกันโรคที่สำคัญในประเทศไทย.** กรุงเทพฯ : คณะสัตวแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน. 273 หน้า.

เกรียงศักดิ์ พูนสุข. 2535. "ตัวเสริมชีวนะ." **วารสารสัตว์เศรษฐกิจ.** 10 : 79-82.

ชรินทร์ เขียวจรัส. 2539. "การใช้โปรไบโอติก เอนไซม์ และกรดอินทรีย์ในอาหารสัตว์." **วารสารสัตวบาล** 6 : 23-37.

ชลอ ลิ้มสุวรรณ และ พรเลิศ จันทร์รัชชกูล. 2547. **อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย.** สนับสนุนการจัดการพิมพ์สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เพื่อเฉลิมพระเกียรติพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวภูมิพลอดุลยเดช เนื่องในวโรกาสพระราชพิธีมหามงคลเฉลิมพระชนพรรษา 5 ธันวาคม พ.ศ. 2547. บริษัท เมจิค พับบลิเคชั่น จำกัด. 206 หน้า.

ไตรมาศ บุญไทย, วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย และ สุบัณฑิต นิ่มรัตน์. 2550. "ผลของโพรไบโอติกต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณของ *Vibrio* และปริมาณแบคทีเรียโพรไบโอติกระหว่างการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ." หน้า 483-490. ใน **รายงานการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45 สาขาวิทยาศาสตร์การประมง** กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นิตยา ยิ้มเจริญ, นนทวิทย์ อาริย์ชน, ชุมพล ศริทอง และนิติ ชูเชิด. 2549. "การใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius)." หน้า 214-228. ใน **รายงานการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44 สาขาวิทยาศาสตร์การประมง** กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มณจันทร์ เมฆธน และ กมลพร มาแสวง. 2543. "ศักยภาพของแบคทีเรียที่มีประโยชน์บางชนิดในการยับยั้งแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ที่ทำให้เกิดโรคเรืองแสงในกุ้ง." หน้า 259-268. ใน **รายงานการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38 สาขาวิทยาศาสตร์การประมง** กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มนฑกานต์ สมบูรณ์, ชลอ ลิ้มสุวรรณ, นิติ ชูเชิด และ พรเลิศ จันทร์รัชชกูล. 2552. "ผลของการใช้จุลินทรีย์กลุ่ม *Bacillus* ที่แตกต่างกัน 3 กลุ่มต่อแบคทีเรียวิบริโอ (*Vibrio* spp.) คุณภาพน้ำและอัตราการรอดตายในการอนุบาลลูกกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*)." หน้า 178-187. ใน **รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47 สาขาวิทยาศาสตร์การประมง** กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มินตรา ศีลอุดม, นนทวิทย์ อารีย์ชน และ ประพันธ์ศักดิ์ ศิรษะภูมิ. 2551. "ประสิทธิภาพของแบคทีเรียสกุล *Bacillus* spp. ที่แยกได้จากลำไส้ของกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei* Boone) ในการควบคุมเชื้อ *Vibrio harveyi*." หน้า 91-99. ใน **รายงานการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46 สาขาวิทยาศาสตร์การประมง** กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ลิลา เรืองแป้น, วารินทร์ ธนาสมหวัง และ กุลวรา แสงรุ่งเรือง. 2540. "แบคทีเรียในกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในบ่อระบบพัฒนา." หน้า 3-10. ใน **รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 35 สาขาวิทยาศาสตร์การประมง** กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สาโรช ค้าเจริญ. 2542. **อาหาร และการให้อาหารสัตว์ไม่เคี้ยวเอื้อง.** ขอนแก่น : ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 685 หน้า.

สุรางค์ สุธิราวุธ. 2538. การจำแนกชนิดของแบคทีเรียใน Genus *Bacillus* ใน **เอกสารประกอบการฝึกอบรม เรื่อง การจัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์.** หน้า 21-37. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Alvarez, J.D., Austin, B., Alvarez, A.M. and Reyes, H. 1998. *"Vibrio harveyi* : pathogen of penaeid shrimps and fish in Venezuela." **Journal of Fish Diseases.** 21 : 313-316.

Axelsson, L.T. 1993. "Lactic Acid Bacteria : Classification and Physiology." *In* **Lactic Acid Bacteria.** 1st ed. (Salminen, S. and Wrigth, A.V., eds.). p. 1-64. New York : Marcel Dekker.

Balca´zar, J.L., De Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D. and Mu´zquiz, J.L. 2006. "The role of probiotics in aquaculture." **Veterinary Microbiology.** 114 : 173–186.

Balca´zar, J.L., Rojas-Luna, T. and Cunningham, D. 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*." **Journal of Invertebrate Pathology.** 96 : 147–150.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bray, W.A., Lawrence, A.L. and Leung-Trujiillo, J.R. 1994. "The effect of salinity on growth and survival of *Penaeus vannamei*, with observations on the interaction of IHHN virus and salinity." **Aquaculture.** 122 : 133-146.

Brink, B.T., Minekus, M., Vossen, J.M., Leer, R. J. and Veld, J.H.I. 1994. "Antimicrobial activity of lactobacilli : preliminary characterization and optimization of Acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* M46." **Applied Bacteriology**. 77 : 140-148.

Brock, J.A. and Main, K. 1994. **A Guide to the Common Problems and Diseases of Cultured *Penaeus vannamei*.** Publish by the Oceanic Institute, Makapu'u Point, Honolulu, HI, USA. pp. 241.

Brock, T.D., Madigan, M.T., Martinko, J. M. and Parker, J. 1994. **Biology of Microorganisms.** 7th ed., Prentice-Hall International, Inc. Englewood Cliffs, New Jersey. 909 p.

Carnevali, O., Vivo, L.D., Sulpizio, R., Gioacchini, G., Olivotto, I. and Cresci, S. 2006. "Growth improvement by probiotic in European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*, L.), with particular attention to IGF-1, myostatin and cortisol gene expression." **Aquaculture.** 258 : 430-438.

Chaiyawan, N., Taveeteptaikul, P., Wannissorn, B., Ruengsomwong, S., Klungsupya, P., Buaban, W. and Itsaranuwat, P. 2010. "Characterization and probiotic properties of *Bacillus* strains isolated from broiler." **Veterinary Medicine.** 40(2) : 207-214.

Claus, D. and Berkeley, R.C.W. 1986. "Genus *Bacillus* Cohn 1872." **Bergeys Manual of Systematic Bacteriology**. pp. 1105-1139.

De Vuyst, L. and Vandamme, E.J. 1994. "Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria." **Blackie Academic and Professional.**

Edward, K. and Arnold, L.D. 1977. "The peptide antibiotics of *Bacillus.*" **Chemistry Biogenesis and Possible Function.** 41 : 449-473.

Farmer, J.J., Janda, J.M., Brenner, F.W., Cameron, D.N. and Birkhead, K.M. 2005. "Genus 1. *Vibrio* Pacini 1854, 411AL, In: Garrity, G.M., Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T. (eds.), second ed." **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, vol. 2. Springer, New York, pp. 494-546.

Freter, R. 1992. "Factors affecting the microecology of the gut. In: R. Fuller (ed.)." **Probiotics : The Scientific Basis.** pp. 111-144.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Fuller, R. 1998. "Probiotics in man and animals." **Journal of Applied Bacteriology.** 66 : 365-378.

Garcia-de-la-banda, I., Chereguini, O. and Rasines, I. 1992. "Influence of lactic acid bacteria additives on turbot (*Scophtalmus maximus* L.) larvae culture." **Boletin del Instituto Espanol de Oceanografia.** 8 : 247-254.

Gatesoupe, F.J. 1994. "Lactic acid bacteria increase the resistance of turbot larvae, *Scopthalmus maximus*, against pathogenic *Vibrio*." **Aquaculture Living Resources.** 7 : 277-282.

Gatesoupe, F.J. 1999. "The use of probiotics in aquaculture." **Aquaculture.** 180 : 147-165.

Gildberg, A., Mikkelsen, H., Sandaker, E. and Ringo, E. 1997. "Probiotic effect of lactic acid bacteria in the feed on growth and survival of fry of Atlantic cod (*Gadus morhua*)." **Hydrobiology.** 352 : 279-285.

Gomez-Gil, B., Roque, A. and Turnbull, J.F. 2000. "The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms." **Aquaculture.** 191 : 259–270.

Green, D.H., Wakeley, P.R., Page, A., Barnes, A., Baccigalupi, L., Ricca, E. and Cutting, S.M. 1999. "Characterization of two *Bacillus* probiotics." **Applied and Environmental Microbiology.** 65 : 4288-4291.

Havenaar, R., Josh, J.H. and Veld, H. 1992. "Probiotics : A general view in B.L.B.Wood (ed.)." **Lactic Acid Bacteria in Health and Disease.** Glasgow, U.K. pp. 155-170.

Helander, I.M., Wright, A.V. and Mattila-Sandholm, T.M. 1997. "Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria." **Trends in Food Science and Technology.** 8 : 146-150.

Hentges, D.J. 1992. "Gut flora in disease resistance. In: R. Fuller (Ed.)" **Probiotics: The Scientific Basis.** pp. 87-110.

Holthuis, L.B. 1980. FAO Species Catalogue, Vol. 1, **Shrimps and Prawns of the World.** Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Imhoff, J.F. 1992. "Taxonomy, phylogeny, and general ecology of anoxygenic phototrophic baeteria,. *In* N.H. Mann, and N.G. Carr (ed.)." **Photosynthetic Prokaryotes.** pp. 53-92

Irianto, A. and Austin, B. 2002. "Probiotics in aquaculture." **Journal of Fish Diseases.** 25 : 633–642.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Jiravanichpaisal, P., Miyazaki, T. and Limsuwan, C. 1994. "Histopathology, biochemistry, and pathogenicity of *Vibrio harveyi* infecting black tiger prawn *Penaeus monodon*." **Journal of Aquatic Animal Health.** 6 : 27-35.

Jonsson, E. 1986. "Persistence of *Lactobacillus* strain in the gut of sucking piglets and its influence on performance and health." **Journal of Agricultural Research.** 16 : 43–60.

Jonsson, E. and Conway, P. 1992. "Probiotics for pigs. In: R. Fuller (ed.)." **Probiotics : The Scientific Basis.** pp. 260-316.

Kandler, O. and Weiss, N. 1986. "Regular, non-sporing gram-positive rods." *In* **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 1208-1234 p.

Karpinska, E., Blaszczak, B., Kosowska, G., Degorski, A. and Borzemak, B.W. 2001. "Growth of the intestinal anaerobic in the newly hatched chicks according to the feeding and proving with normal gut flora." **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**. 45 : 105-109.

Karunasagar, I., Pai, R., Malathi, G.R. and Karunasagar, I. 1994. "Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection." **Aquaculture.** 128 : 203-209.

Kawai, Y., Saito, T., Samant, S.K. and Itoh, T. 1994. "Isolation and characterization of a highly hydrophobic new bacteriocin (Gassericin A) from *Lactobacillus gasseri* LA39." **Journal Bioscience Biotechnology and Biochemistry.** 58 : 1218-1221.

Kobayashi, M. 2000. "Waste remediation and treatment using anoxygenic phototropic bacteria." **Anoxygenic Photosynthetic Bacteria.** pp. 1269 – 1282.

Lalloo, R., Maharajh, D., Görgens, J. and Gardiner, N. 2010. "A downstream process for production of a viable and stable *Bacillus cereus* aquaculture biological agent." **Applied Microbiology and Biotechnology.** 86 : 499–508.

Levett, P.N. 1990. **Anaerobic Bacteria : A Functional Biology.** St Edmunds bury Press Ltd. Philadelphia. 116 p.

Lightner, D.V. 1993. "Diseases of cultured penaeid shrimp. In J.P. McVey (ed.)." **Handbook of Mariculture, Vol.I : Crustacean Aquaculture**, 2nd edn. CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 393-485.

Lilly, D.M. and Stillwell, R.H. 1965. "Probiotics : growth promoting factors produces by microorganisms." **Science.** 147 : 747-748.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Mesalhy, S.A., Galil, A.A., Aziz, A.G. and Fathi, M.M. 2008. "Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of Tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections." **Fish and Shellfish Immunology.** 25 : 128-136.

Moriarty, D.J.W. 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. **Microbial Interactions in Aquaculture.**

Muralidhara, K.S., Sheggeby, G.G. and Elliker, P.R. 1977. "Effect of feeding *Lactobacilli* on the coliform and *Lactobacillus* flora of intestinal tissue and feces from piglets." **Journal of Food Protect.** 40 : 288–295.

Nicholson, W.L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H.J. and Setlow, P. 2000. "Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments." **Microbiology and Molecular Biology Reviews.** 64(3) : 548-572.

Oggioni, M.R., Ciabattini, A., Cuppone, A.M. and Pozzi, G. 2003. "*Bacillus* spores for vaccine delivery." **Vaccine.** 21: 96-101.

Ogle, R.B. and Inborr, J. 1987. **Alternatives to Low Dose Antibiotics in Piglet Feeds in Sweden.** 38th meeting of the European association for animal production, Portugal, commission on pig production, session 4, pp. 1–6.

Ozawa, K., Yokota, H., Kimura, M. and Mitsuoka, T. 1981. "Effect of administration of *Bacillus subtilis* strain BN on intestinal flora of weanling piglets." **Journal of Veterinary Science.** 43 : 771–775.

Panigrahi, A., Kiron, V., Paungkaew, J., Kobayashi, T., Satoh, S. and 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 antibiotics story." **Animal Nutrition and Health.** 29 : 4-8.

Pfenning, N. and Truper, H.G. 1989. "Anoxygenic phototrophic bacteria. In J.T. Staley, M.P. Bryant, N. Pfennig and T.G. Holt (eds.)." **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.** Vol.3. The William and Wilkins, Co., Baltimore. pp. 1635-1682.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Pizzuto, M. and Hirst, R.G. 1995. "Classification of isolates of *Vibrio harveyi* virulent to *Penaeus monodon* larvae by protein profile analysis and M13 DNA fingerprinting." **Disease of Aquatic Organisms.** 21 : 61-68.

Pollman, D.S., Danielson, D.M., Peo, E.R. and E.R, Jr. 1980. "Effect of microbial feed additive on performance of starter and growing–finishing pigs." **Journal of Animal Science.** 50 : 572-580.

Rengpipat, S., Phianphak, W., Piyatiratitivorakul, S. and Menasaveta, P. 1998. "Effect of probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth." **Aquaculture.** 167 : 301-313.

Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatriatitivorakul, S. and Menasveta, P. 2000. "Immunity enhancement in black tigershrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11)." **Aquaculture.** 191 : 271–288.

Rengpipat, S., Tunyanun, A., Fast, A.W., Piyatiratitivorakul, S. and Menasveta, P. 2003. "Enhanced growth and resistance to *Vibrio* challenge in pond-reared black tiger shrimp *Penaeus monodon* fed a *Bacillus* probiotic." **Diseases of Aquatic Organisms.** 55 : 169-173.

Robertson, P.A.W., Xu, H.S. and Austin, B. 1998. "An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of *Vibrio harveyi* in penaeid shrimp and water." **Journal of Microbiological Methods.** 34 : 31-39.

Rosovitz, M.J., Voskuil, M.I. and Chambliss, G.H. 1998. "*Bacillus.*" **Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections Systematic Bacteriology.** 2 : 709-729.

Samocha, T.M., Davis, A.D., Lawrence, A.L., Collins, C.R. and Van Wyk, P. 2001. "Intensive and super-intensive production of the pacific white *Litopenaeus vannamei* In greenhouse-enclose raceway system." **Aquaculture.** pp. 573.

Smith, L.L. and Lawrence, A.L. 1990. "Feasibility of penaeid shrimp culture in inland saline groundwater-fed pond." **Texas Journal of Science.** 42(1) : 3-12.

Spriet, S.M., Decuypere, J.A. and Hendericky, H.K. 1987. "Effect of *Bacillus toyoi* (Toyocerin) on the digestibility of the nutrient and the small intestinal mean retention time in pig." **Faculty of Medicine Landbouw.** 52 : 1673–1683.

Stiles, M.E. and Holzapfel, W.H. 1997. "Lactic acid bacteria of food and their current taxonomy." **International Journal of Food Microbiology.** 36 : 1-29.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Turnbull, P.C.B., Kramer, J.M. and Melling, J. 1990. "*Bacillus.*" **Topley and Wilson's Principle of Bacteriology, Virology and Immunity.** 2 : 187-210.

Van Rijn, J., Fonarev N. and Berkowitz, B. 1995. "Anaerobic treatment of fish culture effluents : digestion of fish feed and release of volatile fatty acids." **Aquaculture.** 33 : 9-20.

Verschuere, L., Heang, H., Criel, G., Dafnis, S., Sorgeloos, P. and Verstraete, W. 2000. "Protection of *Artemia* against the pathogenic effects of *Vibrio proteolyticus* CW8T2 by selected bacterial strains." **Applied and Environmental Microbiology**. 66 **:** 1139–1146.

Villamil, L., Figueras, A., Planas, M. and Novoa, B. 2003. "Control of *Vibrio alginolyticus* in artemia culture by treatment with bacterial probiotic." **Aquaculture.** 219 : 43-56.

Wang, Y.B. 2007. "Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei.*" **Aquaculture**. 269 : 259–264.

Wang, Y.B. and Zirong, X. 2006. "Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities." **Animal Feed Science and Technology.** 127 : 283-292.

Wang, Y.B., Tian, Z.Q., Yao, J.T. and Li, W.F. 2008. "Effect of probiotics, *Enterococcus faecium*, on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response." **Aquaculture**. 277 : 203-207.

Williams, S.T. and Vickers, J.C. 1986. "The ecology of antibiotic production." **Microbial Ecology.** 12 : 43-52.

Wyban, J.A. and Sweeney, J.N. 1991. **Intensive Shrimp Production Technology.** The Oceanic Institute, Makapu'u point, Waimanalo, Hawaii, USA. pp. 158.

Ziaei-Nejad, S., Rezaei, M.H., Takami, G.A., Lovett, D.L., Mirvaghefi, A. and Shakouri, M. 2005. "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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.
ข้อมูลการเกิดวงใส (Clear zone)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ ก.1 การเกิดวงใสในการยับยั้งแบคทีเรีย *V. harveyi* (มิลลิเมตร) ในห้องปฏิบัติการ ชั่วโมงที่ 12

ซ้ำที่	ปริมาณยาปฏิชีวนะออกซีเตตร้าซัยคลินและโปรไบโอติก			
	30 ไมโครกรัม	$1x10^4$ CFU/กรัม	$1x10^5$ CFU/กรัม	$1x10^6$ CFU/กรัม
1	14.50	0.00	0.00	0.00
2	14.75	0.00	0.00	0.00
3	14.75	0.00	0.00	0.00
4	14.75	0.00	0.00	0.00
AVERAGE	14.69	0.00	0.00	0.00
SE	0.06	0.00	0.00	0.00

ตารางผนวกที่ ก.2 การเกิดวงใสในการยับยั้งแบคทีเรีย *V. harveyi* (มิลลิเมตร) ในห้องปฏิบัติการ ชั่วโมงที่ 24

ซ้ำที่	ปริมาณยาปฏิชีวนะออกซีเตตร้าซัยคลินและโปรไบโอติก			
	30 ไมโครกรัม	$1x10^4$ CFU/กรัม	$1x10^5$ CFU/กรัม	$1x10^6$ CFU/กรัม
1	14.50	0.00	0.00	0.00
2	14.75	0.00	0.00	0.00
3	14.75	0.00	0.00	0.00
4	14.75	0.00	0.00	0.00
AVERAGE	14.69	0.00	0.00	0.00
SE	0.06	0.00	0.00	0.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ ก.3 การเกิดวงใสในการยับยั้งแบคทีเรีย *V. harveyi* (มิลลิเมตร) ในห้องปฏิบัติการ ชั่วโมงที่ 36

ซ้ำที่	ปริมาณยาปฏิชีวนะออกซีเตตร้าซัยคลินและโปรไบโอติก			
	30 ไมโครกรัม	$1x10^4$ CFU/กรัม	$1x10^5$ CFU/กรัม	$1x10^6$ CFU/กรัม
1	14.50	0.00	9.00	14.25
2	14.75	0.00	9.00	13.00
3	14.75	0.00	9.00	12.50
4	14.75	0.00	8.25	12.25
AVERAGE	14.69	0.00	8.81	13.00
SE	0.06	0.00	0.19	0.44

ตารางผนวกที่ ก.4 การเกิดวงใสในการยับยั้งแบคทีเรีย *V. harveyi* (มิลลิเมตร) ในห้องปฏิบัติการ ชั่วโมงที่ 48

ซ้ำที่	ปริมาณยาปฏิชีวนะออกซีเตตร้าซัยคลินและโปรไบโอติก			
	30 ไมโครกรัม	$1x10^4$ CFU/กรัม	$1x10^5$ CFU/กรัม	$1x10^6$ CFU/กรัม
1	15.25	9.50	11.75	16.00
2	15.75	9.25	13.00	16.00
3	15.00	9.75	12.75	15.50
4	16.00	9.00	11.75	15.50
AVERAGE	15.50	9.38	12.31	15.75
SE	0.23	0.16	0.33	0.14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ ก.5 การเกิดวงใสในการยับยั้งแบคทีเรีย *V. harveyi* (มิลลิเมตร) ในห้องปฏิบัติการ ชั่วโมงที่ 60

ซ้ำที่	ปริมาณยาปฏิชีวนะออกซีเตตร้าซัยคลินและโปรไบโอติก			
	30 ไมโครกรัม	$1x10^4$ CFU/กรัม	$1x10^5$ CFU/กรัม	$1x10^6$ CFU/กรัม
1	15.25	12.50	14.75	19.00
2	15.75	12.25	16.00	19.00
3	15.00	12.75	15.75	18.50
4	16.00	12.00	14.75	18.50
AVERAGE	15.50	12.38	15.31	18.75
SE	0.23	0.16	0.33	0.14

ตารางผนวกที่ ก.6 การเกิดวงใสในการยับยั้งแบคทีเรีย *V. harveyi* (มิลลิเมตร) ในห้องปฏิบัติการ ชั่วโมงที่ 72

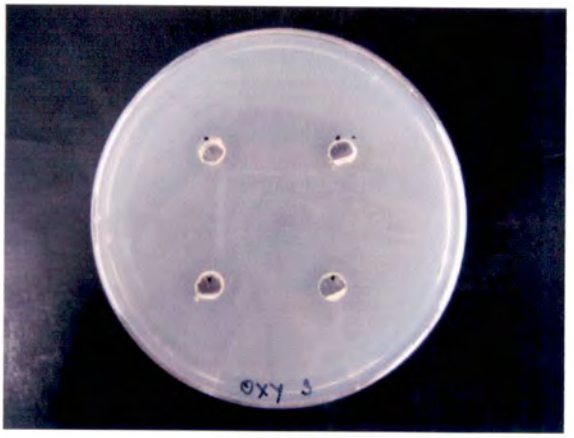
ซ้ำที่	ปริมาณยาปฏิชีวนะออกซีเตตร้าซัยคลินและโปรไบโอติก			
	30 ไมโครกรัม	$1x10^4$ CFU/กรัม	$1x10^5$ CFU/กรัม	$1x10^6$ CFU/กรัม
1	15.25	15.50	19.00	22.50
2	15.75	15.50	19.50	22.25
3	15.00	16.00	19.75	22.00
4	16.00	15.75	18.75	22.25
AVERAGE	15.50	15.69	19.25	22.25
SE	0.23	0.12	0.23	0.10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

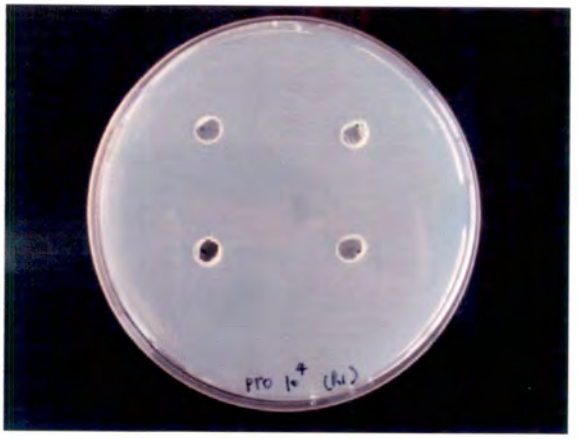
ตารางผนวกที่ ก.7 การเกิดวงใสในการยับยั้งแบคทีเรีย *V. harveyi* (มิลลิเมตร) ในห้องปฏิบัติการ ชั่วโมงที่ 84

ซ้ำที่	ปริมาณยาปฏิชีวนะออกซีเตตร้าซัยคลินและโปรไบโอติก			
	30 ไมโครกรัม	$1x10^4$ CFU/กรัม	$1x10^5$ CFU/กรัม	$1x10^6$ CFU/กรัม
1	15.25	11.00	14.00	15.75
2	15.75	11.25	13.50	16.00
3	15.00	10.50	13.25	15.25
4	16.00	12.25	13.25	16.00
AVERAGE	15.50	11.25	13.50	15.75
SE	0.23	0.37	0.18	0.18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ออกซีเตตร้าซัยคลิน 30 ไมโครกรัม



โปรไบโอติก $1x10^4$ CFU/กรัม

โปรไบโอติก $1x10^5$ CFU/กรัม

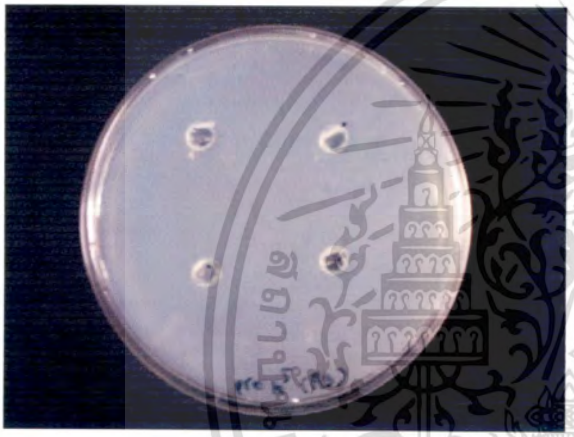
โปรไบโอติก $1x10^6$ CFU/กรัม

ภาพผนวกที่ ก.1 การเกิดวงใสในการยับยั้งแบคทีเรีย *V. harveyi* (มิลลิเมตร) ในห้องปฏิบัติการ ชั่วโมงที่ 12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ออกซีเตตร้าซัยคลิน 30 ไมโครกรัม

โปรไบโอติก $1x10^4$ CFU/กรัม

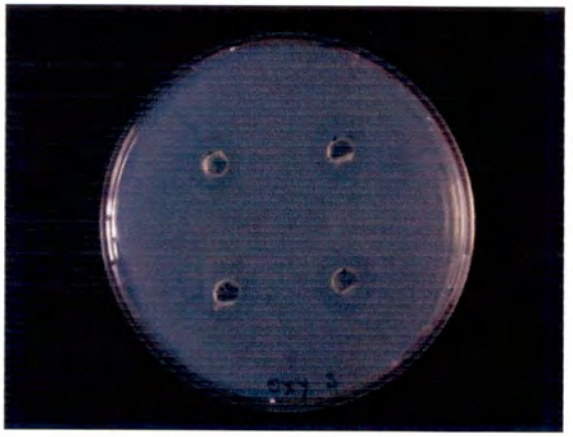


โปรไบโอติก $1x10^5$ CFU/กรัม

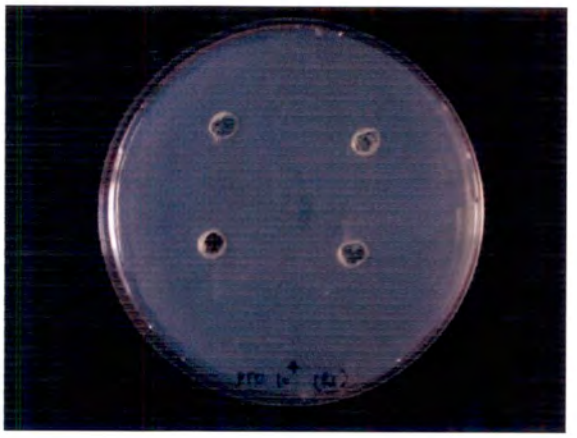
โปรไบโอติก $1x10^6$ CFU/กรัม

ภาพผนวกที่ ก.2 การเกิดวงใสในการยับยั้งแบคทีเรีย *V. harveyi* (มิลลิเมตร) ในห้องปฏิบัติการ ชั่วโมงที่ 24

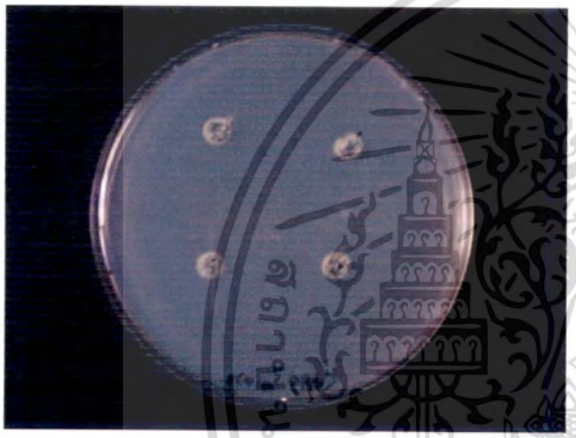
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



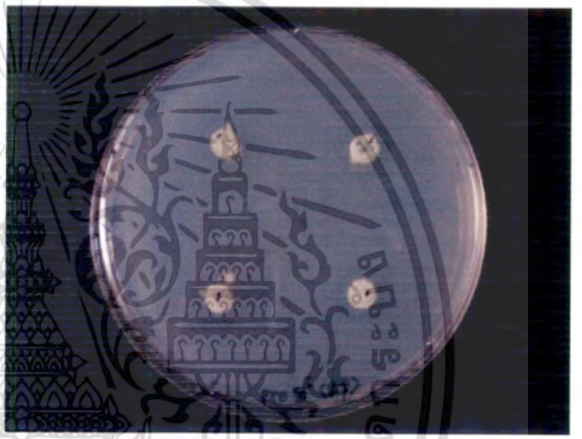
ออกซีเตตร้าซัยคลิน 30 ไมโครกรัม



โปรไบโอติก $1x10^4$ CFU/กรัม



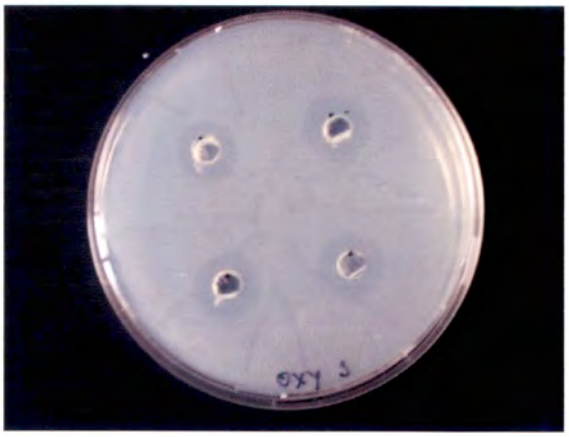
โปรไบโอติก $1x10^5$ CFU/กรัม



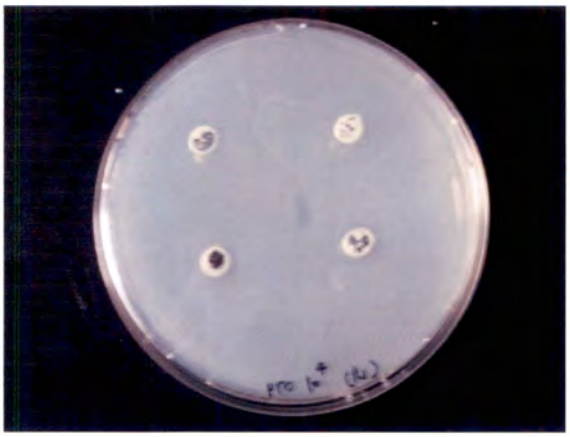
โปรไบโอติก $1x10^6$ CFU/กรัม

ภาพผนวกที่ ก.3 การเกิดวงใสในการยับยั้งแบคทีเรีย *V. harveyi* (มิลลิเมตร) ในห้องปฏิบัติการ ชั่วโมงที่ 36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ออกซีเตตร้าซัยคลิน 30 ไมโครกรัม



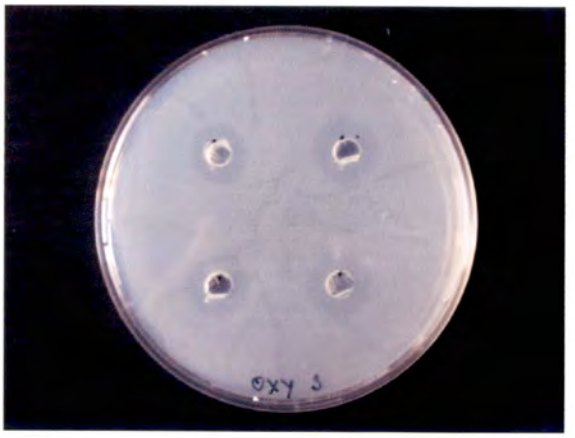
โปรไบโอติก $1x10^4$ CFU/กรัม

โปรไบโอติก $1x10^5$ CFU/กรัม

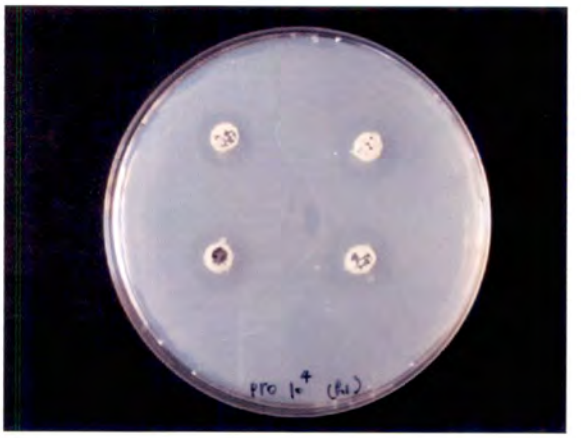
โปรไบโอติก $1x10^6$ CFU/กรัม

ภาพผนวกที่ ก.4 การเกิดวงใสในการยับยั้งแบคทีเรีย *V. harveyi* (มิลลิเมตร) ในห้องปฏิบัติการ ชั่วโมงที่ 48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ออกซีเตตร้าซัยคลิน 30 ไมโครกรัม



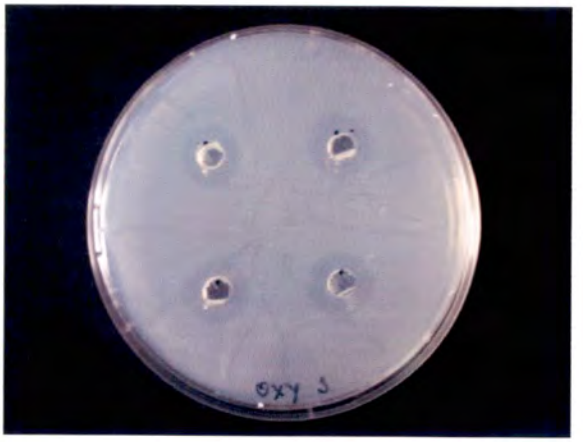
โปรไบโอติก $1x10^4$ CFU/กรัม

โปรไบโอติก $1x10^5$ CFU/กรัม

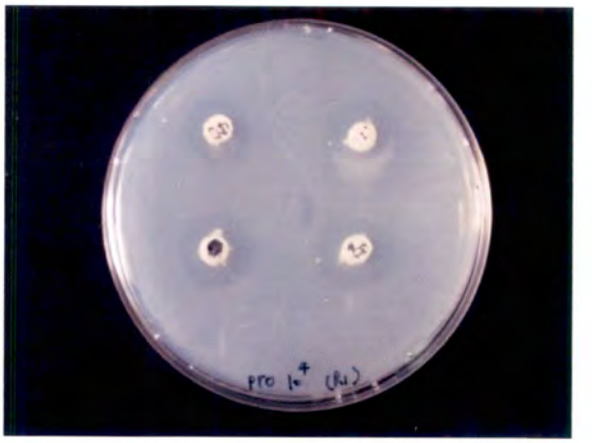
โปรไบโอติก $1x10^6$ CFU/กรัม

ภาพผนวกที่ ก.5 การเกิดวงใสในการยับยั้งแบคทีเรีย *V. harveyi* (มิลลิเมตร) ในห้องปฏิบัติการ ชั่วโมงที่ 60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

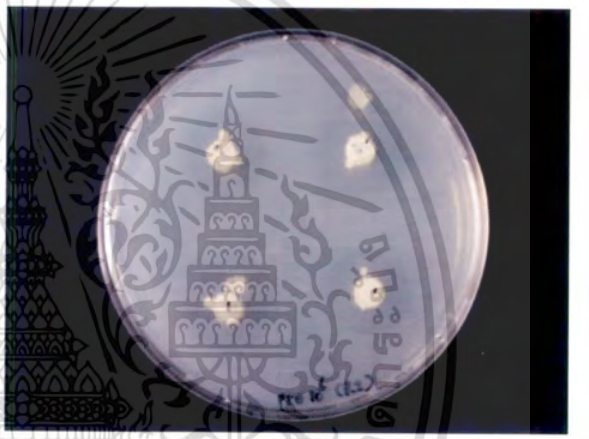


ออกซีเตตร้าซัยคลิน 30 ไมโครกรัม



โปรไบโอติก $1x10^4$ CFU/กรัม

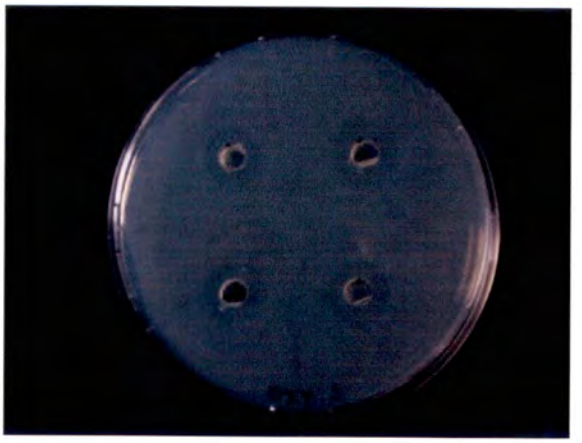
โปรไบโอติก $1x10^5$ CFU/กรัม



โปรไบโอติก $1x10^6$ CFU/กรัม

ภาพผนวกที่ ก.6 การเกิดวงใสในการยับยั้งแบคทีเรีย *V. harveyi* (มิลลิเมตร) ในห้องปฏิบัติการ ชั่วโมงที่ 72

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ออกซีเตตร้าซัยคลิน 30 ไมโครกรัม

โปรไบโอติก $1x10^4$ CFU/กรัม

โปรไบโอติก $1x10^5$ CFU/กรัม

โปรไบโอติก $1x10^6$ CFU/กรัม

ภาพผนวกที่ ก.7 การเกิดวงใสในการยับยั้งแบคทีเรีย *V. harveyi* (มิลลิเมตร) ในห้องปฏิบัติการ ชั่วโมงที่ 84

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข.
ข้อมูลโปรไบโอติกที่ผสมลงในอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ ข.1 จำนวนอัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติก ($x10^5$ CFU/กรัม) ที่ผสมลงในอาหาร 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม และนำไปผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิ 29±2 °C

ซ้ำที่	ปริมาณโปรไบโอติก (กรัม/กิโลกรัม)			
	0	1	3	5
1	0.00	10.40	19.80	29.40
2	0.00	10.60	19.80	29.20
3	0.00	10.80	19.40	29.20
4	0.00	10.80	19.80	29.40
AVERAGE	0.00	10.65	19.70	29.30
SE	0.00	0.10	0.10	0.06

ตารางผนวกที่ ข.2 จำนวนอัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติก ($x10^5$ CFU/กรัม) ที่ผสมลงในอาหาร 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม และนำไปอบที่อุณหภูมิ 40 °C

ซ้ำที่	ปริมาณโปรไบโอติก (กรัม/กิโลกรัม)			
	0	1	3	5
1	0.00	10.20	19.40	29.40
2	0.00	10.80	19.60	29.60
3	0.00	10.40	19.40	29.60
4	0.00	10.40	19.80	29.60
AVERAGE	0.00	10.45	19.55	29.55
SE	0.00	0.13	0.10	0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ ข.3 จำนวนอัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติก ($x10^5$ CFU/กรัม) ที่ผสมลงในอาหาร 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม และนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 °C

ซ้ำที่	ปริมาณโปรไบโอติก (กรัม/กิโลกรัม)			
	0	1	3	5
1	0.00	10.60	19.80	29.80
2	0.00	10.00	20.00	29.20
3	0.00	10.80	19.80	29.40
4	0.00	10.40	19.60	29.60
AVERAGE	0.00	10.45	19.80	29.50
SE	0.00	0.17	0.08	0.13

ตารางผนวกที่ ข.4 จำนวนอัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติก ($x10^5$ CFU/กรัม) ที่ผสมลงในอาหาร 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม และนำไปอบที่อุณหภูมิ 80 °C

ซ้ำที่	ปริมาณโปรไบโอติก (กรัม/กิโลกรัม)			
	0	1	3	5
1	0.00	10.20	19.40	29.40
2	0.00	10.40	19.60	29.40
3	0.00	11.60	19.40	29.00
4	0.00	11.00	20.40	29.40
AVERAGE	0.00	10.80	19.70	29.30
SE	0.00	0.32	0.24	0.10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค.
ข้อมูลการเก็บอาหารที่ผสมโปรไบโอติก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ ค.1 จำนวนอัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติก ($x10^5$ CFU/กรัม) ที่ผสมลงในอาหาร 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม ในระยะเวลาเริ่มต้น

ซ้ำที่	ปริมาณโปรไบโอติก (กรัม/กิโลกรัม)			
	0	1	3	5
1	0.00	10.20	18.60	29.40
2	0.00	10.40	19.60	29.40
3	0.00	11.60	19.40	29.00
4	0.00	11.00	18.40	29.40
AVERAGE	0.00	10.80	19.00	29.30
SE	0.00	0.32	0.29	0.10

ตารางผนวกที่ ค.2 จำนวนอัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติก ($x10^5$ CFU/กรัม) ที่ผสมลงในอาหาร 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม ในระยะเวลา 1 เดือน

ซ้ำที่	ปริมาณโปรไบโอติก (กรัม/กิโลกรัม)			
	0	1	3	5
1	0.00	10.60	19.00	29.20
2	0.00	10.60	19.20	28.40
3	0.00	10.40	19.40	30.00
4	0.00	11.00	19.00	29.00
AVERAGE	0.00	10.65	19.15	29.15
SE	0.00	0.13	0.10	0.33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ ค.3 จำนวนอัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติก ($x10^5$ CFU/กรัม) ที่ผสมลงในอาหาร 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม ในระยะเวลา 2 เดือน

ซ้ำที่	ปริมาณโปรไบโอติก (กรัม/กิโลกรัม)			
	0	1	3	5
1	0.00	10.40	18.80	29.20
2	0.00	10.40	19.00	29.20
3	0.00	10.40	19.60	29.20
4	0.00	10.60	19.20	29.20
AVERAGE	0.00	10.45	19.15	29.20
SE	0.00	0.05	0.17	0.00

ตารางผนวกที่ ค.4 จำนวนอัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติก ($x10^5$ CFU/กรัม) ที่ผสมลงในอาหาร 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม ในระยะเวลา 3 เดือน

ซ้ำที่	ปริมาณโปรไบโอติก (กรัม/กิโลกรัม)			
	0	1	3	5
1	0.00	10.40	20.00	29.00
2	0.00	10.00	19.60	29.40
3	0.00	10.20	19.20	29.60
4	0.00	10.20	19.20	29.20
AVERAGE	0.00	10.20	19.50	29.30
SE	0.00	0.08	0.19	0.13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ ค.5 จำนวนอัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติก ($x10^5$ CFU/กรัม) ที่ผสมลงในอาหาร 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม ในระยะเวลา 4 เดือน

ซ้ำที่	ปริมาณโปรไบโอติก (กรัม/กิโลกรัม)			
	0	1	3	5
1	0.00	9.80	18.60	29.20
2	0.00	9.80	19.00	29.00
3	0.00	11.00	19.40	29.20
4	0.00	9.20	19.20	29.60
AVERAGE	0.00	9.95	19.05	29.25
SE	0.00	0.38	0.17	0.13

ตารางผนวกที่ ค.6 จำนวนอัตราการรอดตายของแบคทีเรียโปรไบโอติก ($x10^5$ CFU/กรัม) ที่ผสมลงในอาหาร 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม ในระยะเวลา 5 เดือน

ซ้ำที่	ปริมาณโปรไบโอติก (กรัม/กิโลกรัม)			
	0	1	3	5
1	0.00	9.00	17.40	25.60
2	0.00	8.80	18.00	26.60
3	0.00	10.00	17.60	26.00
4	0.00	8.80	19.40	26.40
AVERAGE	0.00	9.15	18.10	26.15
SE	0.00	0.29	0.45	0.22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง.
ข้อมูลการเจริญเติบโต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ ง.1 น้ำหนักของลูกกุ้งขาวแวนนาไม (มิลลิกรัม/ตัว) ที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม ในระยะเวลาเริ่มต้น

ซ้ำที่	ปริมาณโปรไบโอติก (กรัม/กิโลกรัม)			
	0	1	3	5
1	3.50	3.40	3.80	3.60
2	3.80	3.50	3.40	3.70
3	3.40	3.80	3.30	3.40
4	3.70	3.60	3.90	3.90
AVERAGE	3.60	3.58	3.60	3.65
SE	0.09	0.09	0.15	0.10

ตารางผนวกที่ ง.2 น้ำหนักของลูกกุ้งขาวแวนนาไม (มิลลิกรัม/ตัว) ที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม ในวันที่ 7

ซ้ำที่	ปริมาณโปรไบโอติก (กรัม/กิโลกรัม)			
	0	1	3	5
1	24.20	32.50	31.20	34.10
2	27.00	33.60	34.30	34.20
3	25.60	32.40	35.20	32.40
4	23.80	31.30	31.90	33.40
AVERAGE	25.15	32.45	33.15	33.53
SE	0.73	0.47	0.95	0.42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ ง.3 น้ำหนักของลูกกุ้งขาวแวนนาไม (มิลลิกรัม/ตัว) ที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม ในวันที่ 14

ซ้ำที่	ปริมาณโปรไบโอติก (กรัม/กิโลกรัม)			
	0	1	3	5
1	66.00	113.30	126.30	138.10
2	81.10	132.30	136.30	125.30
3	71.00	135.80	132.80	134.80
4	75.50	116.90	115.90	139.40
AVERAGE	73.40	124.58	127.83	134.40
SE	3.22	5.57	4.48	3.18

ตารางผนวกที่ ง.4 น้ำหนักของลูกกุ้งขาวแวนนาไม (มิลลิกรัม/ตัว) ที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม ในวันที่ 21

ซ้ำที่	ปริมาณโปรไบโอติก (กรัม/กิโลกรัม)			
	0	1	3	5
1	111.00	201.70	217.80	191.90
2	113.50	212.50	198.30	214.90
3	115.10	196.80	215.40	226.50
4	114.80	202.80	200.80	202.10
AVERAGE	113.60	203.45	208.08	208.85
SE	0.93	3.29	4.97	7.53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ ง.5 น้ำหนักของลูกกุ้งขาวแวนนาไม (มิลลิกรัม/ตัว) ที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม ในวันที่ 28

ซ้ำที่	ปริมาณโปรไบโอติก (กรัม/กิโลกรัม)			
	0	1	3	5
1	210.20	446.30	476.50	474.90
2	212.70	455.50	442.30	456.80
3	223.40	460.40	455.20	472.30
4	243.40	451.70	464.80	457.00
AVERAGE	222.43	453.48	459.70	465.25
SE	7.55	2.98	7.25	4.85

ตารางผนวกที่ ง.6 ความยาวของลูกกุ้งขาวแวนนาไม (เซนติเมตร/ตัว) ที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม ในระยะเวลาเริ่มต้น

ซ้ำที่	ปริมาณโปรไบโอติก (กรัม/กิโลกรัม)			
	0	1	3	5
1	1.08	1.07	1.14	1.10
2	1.13	1.08	1.07	1.10
3	1.06	1.11	1.03	1.07
4	1.11	1.09	1.13	1.13
AVERAGE	1.10	1.09	1.09	1.10
SE	0.02	0.01	0.03	0.01

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ ง.7 ความยาวของลูกกุ้งขาวแวนนาไม (เซนติเมตร/ตัว) ที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม ในวันที่ 7

ซ้ำที่	ปริมาณโปรไบโอติก (กรัม/กิโลกรัม)			
	0	1	3	5
1	1.50	1.69	1.68	1.74
2	1.52	1.73	1.73	1.74
3	1.50	1.69	1.75	1.72
4	1.49	1.68	1.70	1.73
AVERAGE	1.50	1.70	1.72	1.73
SE	0.01	0.01	0.02	0.00

ตารางผนวกที่ ง.8 ความยาวของลูกกุ้งขาวแวนนาไม (เซนติเมตร/ตัว) ที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม ในวันที่ 14

ซ้ำที่	ปริมาณโปรไบโอติก (กรัม/กิโลกรัม)			
	0	1	3	5
1	2.15	2.52	2.71	2.71
2	2.30	2.66	2.69	2.62
3	2.22	2.71	2.67	2.67
4	2.27	2.58	2.56	2.71
AVERAGE	2.24	2.62	2.66	2.68
SE	0.03	0.04	0.03	0.02

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ ง.9 ความยาวของลูกกุ้งขาวแวนนาไม (เซนติเมตร/ตัว) ที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม ในวันที่ 21

ซ้ำที่	ปริมาณโปรไบโอติก (กรัม/กิโลกรัม)			
	0	1	3	5
1	2.51	3.04	3.13	3.01
2	2.53	3.11	3.02	3.09
3	2.55	3.01	3.12	3.18
4	2.54	3.04	3.05	3.06
AVERAGE	2.53	3.05	3.08	3.09
SE	0.01	0.02	0.03	0.04

ตารางผนวกที่ ง.10 ความยาวของลูกกุ้งขาวแวนนาไม (เซนติเมตร/ตัว) ที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม ในวันที่ 28

ซ้ำที่	ปริมาณโปรไบโอติก (กรัม/กิโลกรัม)			
	0	1	3	5
1	3.08	4.01	4.09	4.11
2	3.08	4.04	4.00	4.06
3	3.13	4.05	4.04	4.11
4	3.23	4.01	4.06	4.08
AVERAGE	3.13	4.03	4.05	4.09
SE	0.04	0.01	0.02	0.01

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ ง.11 อัตราการรอดตายลูกกุ้งขาวแวนนาไม (เปอร์เซ็นต์) ที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม ในวันที่ 28

ซ้ำที่	ปริมาณโปรไบโอติก (กรัม/กิโลกรัม)			
	0	1	3	5
1	75.60	78.00	79.20	82.80
2	73.20	82.00	78.00	82.40
3	72.00	81.20	82.00	84.80
4	68.80	83.20	84.00	79.20
AVERAGE	72.40	81.10	80.80	82.30
SE	1.41	1.11	1.36	1.16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ.
ข้อมูลจำนวนแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ จ.1 จำนวนแบคทีเรียรวม ($x10^5$ CFU/กรัม) ที่เกิดในลูกกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม ในระยะเวลาเริ่มต้น

ซ้ำที่	ปริมาณโปรไบโอติก (กรัม/กิโลกรัม)			
	0	1	3	5
1	6.20	3.80	7.00	12.40
2	7.00	4.20	10.40	7.40
3	5.40	10.20	9.60	12.00
4	5.20	11.00	18.00	8.40
AVERAGE	5.95	7.30	11.25	10.05
SE	0.41	1.91	2.36	1.26

ตารางผนวกที่ จ.2 จำนวนแบคทีเรียรวม ($x10^5$ CFU/กรัม) ที่เกิดในลูกกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม ในวันที่ 7

ซ้ำที่	ปริมาณโปรไบโอติก (กรัม/กิโลกรัม)			
	0	1	3	5
1	2.20	4.00	7.60	4.00
2	5.20	8.80	11.00	9.00
3	4.20	7.40	1.60	18.80
4	9.60	2.60	14.20	10.80
AVERAGE	5.30	5.70	8.60	10.65
SE	1.56	1.44	2.69	3.07

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ จ.3 จำนวนแบคทีเรียรวม ($x10^5$ CFU/กรัม) ที่เกิดในลูกกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม ในวันที่ 14

ซ้ำที่	ปริมาณโปรไบโอติก (กรัม/กิโลกรัม)			
	0	1	3	5
1	23.00	15.40	17.20	17.60
2	25.60	32.00	29.80	25.60
3	30.40	16.20	39.60	15.20
4	21.00	20.60	16.60	24.00
AVERAGE	25.00	21.05	25.80	20.60
SE	2.03	3.82	5.52	2.50

ตารางผนวกที่ จ.4 จำนวนแบคทีเรียรวม ($x10^5$ CFU/กรัม) ที่เกิดในลูกกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม ในวันที่ 21

ซ้ำที่	ปริมาณโปรไบโอติก (กรัม/กิโลกรัม)			
	0	1	3	5
1	9.20	28.60	34.00	19.00
2	45.60	29.00	30.00	23.80
3	21.80	34.20	21.80	28.60
4	13.40	31.60	16.20	25.60
AVERAGE	22.50	30.85	25.50	24.25
SE	8.13	1.30	4.01	2.01

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ จ.5 จำนวนแบคทีเรียรวม ($x10^5$ CFU/กรัม) ที่เกิดในลูกกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม ในวันที่ 28

ซ้ำที่	ปริมาณโปรไบโอติก (กรัม/กิโลกรัม)			
	0	1	3	5
1	12.60	8.60	25.00	10.80
2	28.40	10.00	9.60	6.40
3	13.80	11.80	10.00	8.80
4	10.60	15.80	3.00	6.80
AVERAGE	16.35	11.55	11.90	8.20
SE	4.07	1.57	4.65	1.01

ตารางผนวกที่ จ.6 จำนวนแบคทีเรีย *Vibrio* ($x10^4$ CFU/กรัม) ที่เกิดในลูกกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม ในระยะเวลาเริ่มต้น

ซ้ำที่	ปริมาณโปรไบโอติก (กรัม/กิโลกรัม)			
	0	1	3	5
1	4.80	1.40	1.60	2.80
2	2.40	0.60	1.60	3.40
3	2.40	9.20	3.20	4.40
4	5.20	4.20	7.80	4.80
AVERAGE	3.70	3.85	3.55	3.85
SE	0.75	1.94	1.47	0.46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ ง.7 จำนวนแบคทีเรีย *Vibrio* (x10^4 CFU/กรัม) ที่เกิดในลูกกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม ในวันที่ 7

ซ้ำที่	ปริมาณโปรไบโอติก (กรัม/กิโลกรัม)			
	0	1	3	5
1	5.60	1.20	2.20	1.00
2	3.40	2.40	7.80	1.20
3	10.80	4.00	2.00	9.00
4	4.40	2.00	4.60	8.80
AVERAGE	6.05	2.40	4.15	5.00
SE	1.65	0.59	1.35	2.25

ตารางผนวกที่ ง.8 จำนวนแบคทีเรีย *Vibrio* (x10^4 CFU/กรัม) ที่เกิดในลูกกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม ในวันที่ 14

ซ้ำที่	ปริมาณโปรไบโอติก (กรัม/กิโลกรัม)			
	0	1	3	5
1	48.60	40.20	41.80	26.60
2	76.40	67.40	45.20	36.60
3	63.60	54.40	63.40	21.40
4	48.80	36.20	50.80	30.00
AVERAGE	59.35	49.55	50.30	28.65
SE	6.68	7.12	4.74	3.19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ ง.9 จำนวนแบคทีเรีย *Vibrio* (x10^4 CFU/กรัม) ที่เกิดในลูกกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม ในวันที่ 21

ซ้ำที่	ปริมาณโปรไบโอติก (กรัม/กิโลกรัม)			
	0	1	3	5
1	53.00	57.20	124.00	34.20
2	106.00	62.80	52.00	27.00
3	78.20	46.80	49.60	31.20
4	53.00	59.00	33.00	36.80
AVERAGE	72.55	56.45	64.65	32.30
SE	12.63	3.42	20.23	2.10

ตารางผนวกที่ ง.10 จำนวนแบคทีเรีย *Vibrio* (x10^4 CFU/กรัม) ที่เกิดในลูกกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก 0, 1, 3 และ 5 กรัม/กิโลกรัม ในวันที่ 28

ซ้ำที่	ปริมาณโปรไบโอติก (กรัม/กิโลกรัม)			
	0	1	3	5
1	17.40	1.60	24.80	1.80
2	106.00	4.20	2.00	0.40
3	26.00	6.40	14.20	2.20
4	37.20	18.00	2.20	2.60
AVERAGE	46.65	7.55	10.80	1.75
SE	20.19	3.62	5.47	0.48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นายยุทธพล คงกระจ่าง
วัน เดือน ปีเกิด	23 พฤศจิกายน 2528 ที่จังหวัดสระแก้ว
ที่อยู่	21/9 หมู่ 3 แขวงลาดพร้าว เขตลาดพร้าว จังหวัดกรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	2550 วิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ประสบการณ์การทำงานและผลงานวิจัย

พ.ศ. 2554 ยุทธพล คงกระจ่าง และ นงนุช เลาหะวิสุทธิ์. 2554. "การใช้แบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp. เป็นโปรไบโอติกที่มีต่อการเจริญเติบโต อัตราการรอดตาย และปริมาณเชื้อวิบริโอในกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*)." หน้า 400-407 ในการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 49 สาขาประมง กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้