สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การยับยั้งทางชีวภาพของจุลินทรีย์โปรไบโอติกต่อเชื้อก่อโรค ในกุ้ง *Vibrio parahaemolyticus*

The biological inhibition of probiotics on shrimp diseases *Vibrio parahaemolyticus*

T129778

จริยา อินทร์อำคา
ดรุณี วรสิทธิ์
นภาพร ศรีวิชัย

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 129778
วัน,เดือน,ปี 21 ส.ค. 2557

b.....
i.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2555

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

The biological inhibition of probiotics on shrimp diseases

Vibrio parahaemolyticus

CHARIYA INUMKA

DARUNEE WORASIT

NAPAPORN SRIWICHAI

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIRMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE

IN BIOTECHNOLOGY

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADENIC YEAR 2012

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

หัวข้อโครงงานพิเศษ การยับยั้งทางชีวภาพของจุลินทรีย์โปรไบโอติกต่อเชื้อก่อโรคในกุ้ง *Vibrio parahaemolyticus*

The biological inhibition of probiotics on shrimp diseases *Vibrio parahaemolyticus*

ชื่อนักศึกษา	นางสาวจริยา	อินทร์อำคา	52050286
	นางสาวดรุณี	วรสิทธิ์	52050314
	นางสาวนภาพร	ศรีวิชัย	52050330

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. สมชาย ไกรรักษ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพประจำปีการศึกษา 2555

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร. สรัญญา พันธุ์พฤกษ์	
ผศ.ดร. พนา โลหะทรัพย์ทวี	
ผศ.ดร. สมชาย ไกรรักษ์	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การยับยั้งทางชีวภาพของจุลินทรีย์โปรไบโอติกต่อเชื้อก่อโรคในกุ้ง *Vibrio parahaemolyticus*		
ชื่อนักศึกษา	นางสาวจริยา	อินทร์อำคา	รหัสนักศึกษา 52050286
	นางสาวดรุณี	วรสิทธิ์	รหัสนักศึกษา 52050314
	นางสาวนภาพร	ศรีวิชัย	รหัสนักศึกษา 52050330
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต		
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ		
ปีการศึกษา	2555		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร. สมชาย ไกรรักษ์		

บทคัดย่อ

การเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติกรหัส BM BS BL BP และBP2 ในอาหารเหลวสูตร YM ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างกัน 3 ชนิด คือ กลูโคส น้ำแป้งย่อย และน้ำเชื่อม พบว่าแบคทีเรียโปรไบโอติกรหัส BP BM และ BS เจริญดีที่สุดในอาหารกลูโคส โดยให้ผลได้ 2.0034 1.7221 และ 1.1325 OD ต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ ขณะที่ให้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ 0.2059 0.3190 และ 0.1230 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ สำหรับแบคทีเรียโปรไบโอติกรหัส BP2 เจริญในอาหารกลูโคสช้าที่สุด โดยให้ผลได้เซลล์เพียง 0.5758 OD ต่อกรัมสับสเตรท และอัตราการเจริญจำเพาะ 0.1317 ต่อชั่วโมง แบคทีเรียโปรไบโอติกรหัส BL ให้ผลได้เซลล์สูงสุด (1.9476 OD ต่อกรัมสับสเตรท) ในอาหารน้ำเชื่อม และให้อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดที่ 0.3097 ต่อชั่วโมง ผลทดสอบการเลี้ยงเชื้อร่วมกันระหว่างแบคทีเรียโปรไบโอติกทั้ง 5 ชนิด และ *V. parahaemolyticus* ในอาหารเหลวผสม YM และ LB พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *V. parahaemolyticus* โดยเปรียบเทียบกับการเจริญแบคทีเรียโปรไบโอติกทั้ง 5 ชนิด และเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในชุดควบคุมพบว่าให้การเจริญเป็นปกติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

Title	The biological inhibition of probiotics on shrimp diseases *Vibrio parahaemolyticus*	
Students	Chariya Inumka	Student ID 520050286
	Darunee Worasit	Student ID 520050314
	Napaporn Sriwichai	Student ID 520050330
Degree	Bachelor of Science	
Major Program	Biotchnology	
Academis	Year 2012	
Advisor	Asst. Prof. Dr. Somchai Krairak	

ABSTRACT

The cultivation of probiotics so-called BM BS BL BP and BP2 were examined on YM medium containing glucose, starch hydrolysate and syrup as c-source. It was found that the probiotic BP BM and BS presented the maximal growth in glucose medium with $Y_{x/s}$ of 2.0034 1.7221 and 1.1325 OD.g-substrate^{-1} and μ of 0.2059 0.3190 and 0.1230 hr^{-1}, respectively. However, the probiotic BP2 gave the minimal growth in glucose medium in which cell yield 0.5758 OD.g-substrate^{-1} and 0.1317 hr^{-1} of μ. Therefore, the probiotic BL indicated high cell yield (1.9476 OD.g-substrate^{-1}) in syrup medium with maximum μ of 0.3097 hr^{-1}. The biological effect of all 5 probiotics on *V. parahaemolyticus* was studied with co-cultivation among them. The result showed that the *V. parahaemolyticus* was totally inhibited by mixed culture of 5 probiotics in YM and LB medium. In comparison, each cultivation of the mixed culture of 5 probiotics in YM medium and the *V. parahaemolyticus* in LB medium as control condition were indicated the normal growth.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษเล่มนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี เนื่องด้วยความอนุเคราะห์และเอาใจใส่จากอาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ผศ.ดร. สมชาย ไกรรักษ์ รวมทั้งคณะกรรมการโครงงานพิเศษ ผศ.ดร. สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ และ ผศ.ดร. พนา โลหะทรัพย์ทวี ตลอดทั้งอาจารย์ท่านอื่นๆที่ได้ให้คำปรึกษา ข้อเสนอแนะ ประสบการณ์ที่เป็นประโยชน์ ตลอดจนกรุณาช่วยตรวจแก้ไขโครงงานพิเศษนี้ให้เสร็จสมบูรณ์ ซึ่งคณะผู้จัดทำมีความวาบซึ้งในความกรุณาที่ได้รับ จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ทุกท่าน ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเบิก-คืนสารเคมี อาหารเลี้ยง และอุปกรณ์เครื่องมือต่างๆที่ใช้ในการทดลอง คอยอำนวยความสะดวก ให้คำปรึกษาและข้อแนะนำต่างๆในระหว่างการปฏิบัติงาน รวมถึงป้าแม่บ้านที่อำนวยความสะดวกในการใช้ห้องปฏิบัติการต่างๆในการทำการทดลอง

ขอขอบคุณบิดา มารดา ตลอดจนญาติพี่น้องทุกๆคน ที่คอยเป็นกำลังใจ แค่อยู่เคียงข้างจนโครงงานสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณเพื่อนๆพี่ๆทุกคน ที่คอยให้กำลังใจ และคำปรึกษาในเรื่องต่างๆ และให้ความช่วยเหลือในระหว่างการทำการทดลอง

คณะผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่า โครงงานพิเศษฉบับนี้จะเป็นประโยชน์แก่ผู้ที่สนใจศึกษาเกี่ยวกับการเลี้ยงเชื้อโปรไบโอติกที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อวิบริโอที่ก่อโรคในกุ้ง และนำความรู้ที่ได้ไปเป็นแนวทางการศึกษาต่อไป หากมีข้อผิดพลาดประการใดคณะผู้จัดทำขออภัยมา ณ โอกาสนี้ด้วย

น.ส.จริยา อินทร์อำคา
น.ส.ดรุณี วรสิทธิ์
น.ส.นภาพร ศรีวิชัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VII
สารบัญรูป	VIII

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	3
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	4
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 กุ้ง	
2.1.1 กุ้งที่นิยมเลี้ยงเพื่อบริโภคในประเทศไทย	5
2.1.2 คุณค่าทางโภชนาการของกุ้ง	8
2.1.3 คุณค่าทางเศรษฐกิจของกุ้ง	9
2.1.4 โรคในกุ้ง	10
2.1.5 การรักษาโรคในกุ้ง	11
2.2 โปรไบโอติก	
2.2.1 ตัวอย่างโปรไบโอติกส์ที่มีใช้อยู่ในปัจจุบัน	14
2.2.2 ประโยชน์ของโปรไบโอติกต่อกุ้ง	14
2.3 เชื้อ *Vibrio parahaemolyticus*.	
2.3.1 ลักษณะและคุณสมบัติของเชื้อ *V. parahaemolyticus*	15
2.3.2 อาการของกุ้งที่ติดเชื้อ *Vibrio* spp.	16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

สารบัญ (ต่อ)

2.3.3 รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาทำให้แยกการติดเชื้อ *Vibrio* spp. 16

2.3.4 การควบคุมและป้องกัน 16

บทที่ 3 วิธีการดำเนินงาน

3.1 เชื้อจุลินทรีย์ 18

3.2 สารเคมี 18

3.3 เครื่องมือและอุปกรณ์ 18

3.4 วิธีการทดลอง 19

3.4.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ และการเตรียมเชื้อเริ่มต้น 19

3.4.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา 19

3.4.3.การศึกษาความสามารถของเชื้อโปรไบโอติกในการย่อยแป้ง 20

3.4.4 การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อเจริญของเชื้อโปรไบโอติก 20

3.4.5 การศึกษาผลกระทบของเชื้อโปรไบโอติกต่อ *V.parahaemolyticus*. 20

บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อเชื้อจุลินทรีย์โปรไบโอติก รหัส BL BM BP BP2 และ BS 22

4.2 การทดสอบเชื้อโปรไบโอติกในการย่อยแป้ง 24

4.3 การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อโปรไบโอติกในอาหารเหลว 25

4.3.1 การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อโปรไบโอติก ในอาหารเหลว YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำแป้งย่อย 25

4.3.2 การศึกษาการเจริญของเชื้อโปรไบโอติก ในอาหารเหลว YM ที่ใช้แหล่งคาร์บอนเป็นเชื่อมจากโรงงาน 28

4.3.3 การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อโปรไบโอติก ในอาหารเหลว YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส 32

4.3.4 การเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อโปรไบโอติกทั้ง 5 ชนิด ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน 36

4.4 การศึกษาผลกระทบของเชื้อโปรไบโอติกที่มีต่อเชื้อ *V. parahaemolyticus* 38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ 5 สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ	40
เอกสารอ้างอิง	42
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ	45
ภาคผนวก ข สารเคมีและวิธีวิเคราะห์	50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 แสดงข้อมูลโภชนาการของกุ้งต้ม	8
2.2 แสดงปริมาณผลผลิตกุ้งของโลกปี 2549-2555	9
2.3 การส่งออกกุ้งไทยปี 2545-2555 (มกราคม-ตุลาคม)	10
4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อโปรไบโอติก รหัส BL BM BP BP2 และ BS	23
4.2 ผลการทดสอบความสามารถในการย่อยแป้ง	24
4.3 แสดงการเปรียบเทียบอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) และผลได้เซลล์ ($Y_{x/s}$) ของเชื้อโปรไบโอติกทั้ง 5 ชนิด ในอาหารเหลวสูตร YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส อาหารเหลว YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำแป้งย่อย และอาหารเหลว YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเชื่อม	37

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 กุ้งกุลาดำ	6
2.2 กุ้งขาว	7
2.3 กุ้งก้ามกราม	8
4.1 แสดงการเจริญของเชื้อ BM ในอาหารเหลว YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำแป้งย่อย โดยวัดการเปลี่ยนแปลงเซลล์ (●) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (■) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (▲)	25
4.2 แสดงการเจริญของเชื้อ BP ในอาหารเหลว YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำแป้งย่อย โดยวัดการเปลี่ยนแปลงเซลล์ (●) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (■) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (▲)	26
4.3 แสดงการเจริญของเชื้อ BP2 ในอาหารเหลว YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำแป้งย่อย โดยวัดการเปลี่ยนแปลงเซลล์ (●) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (■) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (▲)	27
4.4 แสดงการเจริญของเชื้อ BS ในอาหารเหลว YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำแป้งย่อย โดยวัดการเปลี่ยนแปลงเซลล์ (●) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (■) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (▲)	27
4.5 แสดงการเจริญของเชื้อ BL ในอาหารเหลว YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำแป้งย่อย โดยวัดการเปลี่ยนแปลงเซลล์ (●) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (■) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (▲)	28
4.6 แสดงการเจริญของเชื้อ BM ในอาหารเหลว YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเชื่อม โดยวัดการเปลี่ยนแปลงเซลล์ (●) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (■) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (▲)	29
4.7 แสดงการเจริญของเชื้อ BP2 ในอาหารเหลว YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเชื่อม โดยวัดการเปลี่ยนแปลงเซลล์ (●) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (■) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (▲)	30
4.8 แสดงการเจริญของเชื้อ BS ในอาหารเหลว YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำแป้งย่อย โดยวัดการเปลี่ยนแปลงเซลล์ (●) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (■) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (▲)	30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

สารบัญรูป(ต่อ)

4.9 แสดงการเจริญของเชื้อ BL ในอาหารเหลว YM ที่มีแหล่งคาร์บอน เป็นน้ำเชื่อม โดยวัดการเปลี่ยนแปลงเซลล์ (●) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (■) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (▲) 31

4.10 แสดงการเจริญของเชื้อ BP ในอาหารเหลว YM ที่มีแหล่งคาร์บอน เป็นน้ำเชื่อม โดยวัดการเปลี่ยนแปลงเซลล์ (●) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (■) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (▲) 32

4.11 แสดงการเจริญของเชื้อ BM ในอาหารเหลว YM ที่มีแหล่งคาร์บอน เป็นกลูโคส โดยวัดการเปลี่ยนแปลงเซลล์ (●)และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (■) 33

4.12 แสดงการเจริญของเชื้อ BS ในอาหารเหลว YM ที่มีแหล่งคาร์บอน เป็นกลูโคส โดยวัดการเปลี่ยนแปลงเซลล์ (●)และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (■) 33

4.13 แสดงการเจริญของเชื้อ BL ในอาหารเหลว YM ที่มีแหล่งคาร์บอน เป็นกลูโคส โดยวัดการเปลี่ยนแปลงเซลล์ (●)และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (■) 34

4.14 แสดงการเจริญของเชื้อ BP ในอาหารเหลว YM ที่มีแหล่งคาร์บอน เป็นกลูโคส โดยวัดการเปลี่ยนแปลงเซลล์ (●)และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (■) 35

4.15 แสดงการเจริญของเชื้อ BP2 ในอาหารเหลว YM ที่มีแหล่งคาร์บอน เป็นกลูโคส โดยวัดการเปลี่ยนแปลงเซลล์ (●)และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (■) 35

4.16 แสดงการเจริญของเชื้อกลุ่มทดลอง คือ โปรไบโอติกที่เลี้ยงรวมกันกับเชื้อ *V.parahaemolyticus* (◆)และกลุ่มควบคุมคือโปรไบโอติกที่เลี้ยงเดี่ยวๆ (■) และ *V.parahaemolyticus* (●)ที่เลี้ยงเดี่ยวๆ 39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

กุ้งเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย และเป็นสัตว์น้ำที่มีศักยภาพในการแข่งขันด้านการผลิต เพื่อการส่งออก เนื่องจากไทยเป็นผู้ผลิตกุ้งจากการเพาะเลี้ยงรายใหญ่ที่สุดของโลก หรือประมาณ 23% ของผลผลิตโลก (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2551) และมีการส่งออกเป็นอันดับ 1 ของโลก โดยในปี พ.ศ. 2551 กุ้ง และผลิตภัณฑ์จากกุ้ง มีมูลค่าการส่งออก 84,067 ล้านบาท (กรมศุลกากร, 2551)

โดยทั่วไปผลผลิตกุ้งมาจาก 2 แหล่ง คือจากการจับในแหล่งน้ำ และการเพาะเลี้ยง โดยกุ้งส่งออกจากประเทศไทยมาจากการเพาะเลี้ยงเป็นส่วนใหญ่ โดยพื้นที่เพาะเลี้ยงส่วนมากอยู่ในภาคตะวันออก และภาคใต้เกษตรกรส่วนใหญ่เลี้ยงกุ้งแบบพัฒนา ซึ่งมีการควบคุมปัจจัยการผลิตทั้งหมด เช่น พันธุ์กุ้ง อาหารกุ้ง กรรมวิธีการเลี้ยง (สถาบันอาหาร, 2548) จึงทำให้ได้ปริมาณผลผลิตต่อปีสูง

อุตสาหกรรมกุ้ง ไทยมีการเจริญเติบโตอย่างมาก แต่ประสบปัญหาการระบาดของโรคกุ้ง การติดเชื้อแบคทีเรีย ทำให้ลูกกุ้งตายในปริมาณที่มาก (Wilkenfeld, 1992) เนื่องจากแบคทีเรียก่อโรคมีโอกาสในการแพร่กระจาย (Nicolas และคณะ, 1989) การใช้ยาปฏิชีวนะ และสารเคมีในการควบคุมโรค เป็นการแก้ปัญหาที่ปลายเหตุ การใช้ยาปฏิชีวนะที่มากเกินไปมีผลกระตุ้นให้เชื้อเกิดการดื้อยา (Cabello, 2006) และยาต้านจุลินทรีย์ส่วนเกิน จะตกค้างอยู่ในสิ่งแวดล้อม และผลผลิตกุ้ง (Graslund และ Bengtsson, 2001) ในปัจจุบันปัญหาการตกค้างของยาปฏิชีวนะในผลผลิตกุ้งกลายเป็นปัญหาระดับนานาชาติ เนื่องจากกุ้งมีคุณภาพไม่ตรงตามมาตรฐานการส่งออก ซึ่งก่อให้เกิดอุปสรรคต่อการขยายตลาดการส่งออกกุ้ง เพราะในปัจจุบันผู้บริโภคเริ่มหันมาใส่ใจต่อสุขภาพมากยิ่งขึ้น จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่เกษตรผู้เลี้ยงกุ้งจะต้องทำความเข้าใจ เพื่อที่จะสามารถผลิตกุ้งได้อย่างมีคุณภาพ

มีรายงานว่า แบคทีเรียก่อโรคในกุ้งเกือบทั้งหมด มีการพัฒนาตัวเองจากการยับยั้งเชื้อโดยใช้สารเคมีเพียงครั้งเดียวหรือมากกว่า 1 ครั้ง ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ยิ่งไปกว่านั้นในสภาพของน้ำทะเล ทำให้ยาออกฤทธิ์ได้น้อยลง (Tanasomwang และคณะ, 1998) ดังนั้น หลายปีที่ผ่านมาได้เห็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ถึงความสำคัญของการแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์จากน้ำทะเล ตะกอนดิน จากกระเพาะอาหารและลำไส้ แล้วคัดเอาจุลินทรีย์ที่มีความสามารถผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค โดยทำในหลอดทดสอบ แล้วนำมาใช้ประโยชน์ (Rengpipat และคณะ, 1998) ตั้งข้อสังเกตว่า การใช้ประโยชน์จากแบคทีเรียประจำถิ่น มีข้อดีตรงที่ทำให้ปลอดภัยทางชีวภาพ และยังไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโดยฉับพลันต่อจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในระบบนิเวศน์นั้นๆ

ดังนั้นจึงได้เกิดแนวคิดการแก้ปัญหา และเริ่มดำเนินการวิจัย และพัฒนางานนี้ขึ้นเพื่อศึกษาแก้ปัญหาการติดโรคของกุ้งในระหว่างการเพาะเลี้ยง โดยการนำเชื้อจุลินทรีย์โปรไบโอติก (probiotics) ที่ได้จากธรรมชาติเข้ามาใช้ เป็นการช่วยส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง ลดการใช้สารเคมี และยาปฏิชีวนะในการเลี้ยงกุ้ง เพื่อเพิ่มศักยภาพให้ผลผลิตกุ้ง ที่เป็นการเน้นคุณภาพกุ้งปลอดสารหรือกุ้งอินทรีย์ เป็นการเลี้ยงที่ไม่ก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม และเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค ด้วยเหตุนี้จึงมีการศึกษาโปรไบโอติก

โปรไบโอติก เป็นกลุ่มของจุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิต และนำมาใช้เป็นอาหารเสริมในสัตว์ โดยที่บทบาทของจุลินทรีย์เหล่านี้มีประโยชน์ต่อความสมดุลของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ในลำไส้ของสัตว์ (Fuller, 1989) การประยุกต์ใช้โปรไบโอติกเริ่มมีบทบาทในอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ หรือการป้องกัน และรักษาโรคมนุษย์มากขึ้นเรื่อยๆ ทั้งยังสามารถที่จะนำมาใช้ทดแทนยาปฏิชีวนะได้ (Sissons, 1989 และ Tournut, 1989)

โปรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่มีคุณสมบัติบางประการที่เป็นประโยชน์ และมีคุณสมบัติเฉพาะ ซึ่งแตกต่างจากจุลินทรีย์ทั่วไป คุณสมบัติของโปรไบโอติกมีลักษณะดังต่อไปนี้ (กิจจา และคณะ, 2537)

- ต้องทนกรดได้ดี ไม่ถูกทำลายโดยน้ำย่อยจากกระเพาะอาหาร และน้ำดีจากตับอ่อน
- ต้องคงตัว ไม่ถูกทำลายได้ง่ายจากกรรมวิธีการผลิต เช่น การบดละเอียด การได้รับความชื้น
- ต้องเข้ากันกับจุลินทรีย์ที่มีอยู่แล้วในทางเดินอาหาร และออกฤทธิ์ได้ดีกับทางเดินอาหารทุกส่วน
- ต้องไม่มีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติภายหลังจากเข้าไปอยู่ในตัวสัตว์แล้ว

Vibrio parahaemolyticus เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ลักษณะรูปร่างเป็นท่อนตรงหรือโค้งเล็กน้อย มีขนาดประมาณ 0.5-0.8×1.4-2.6 ไมครอน สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ไม่สร้างสปอร์ มีแคปซูล เมื่ออยู่ในอาหารเหลวเคลื่อนที่ด้วยแฟกเจลาที่ขั้วเซลล์ (single polar flagellum) เมื่อเจริญในอาหารแข็งสามารถสร้างแฟกเจลารอบเซลล์ (peritrichous flagella) เพื่อใช้ในการเคลื่อนที่ สามารถใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอน และพลังงาน สามารถสร้างเอนไซม์ catalase และ oxidase ได้ ไม่สารมารถหมักน้ำตาลซูโครส แต่หมักน้ำตาลกลูโคสได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ผลิตกรดแต่ไม่เกิดแก๊ส ดังนั้นลักษณะโคโลนีบนอาหาร Thiosulfate Citrate Bile salt Sucrose Agar (TCBS) จึงมีสีเขียวแกมน้ำเงิน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-3 มิลลิเมตร

โรคติดเชื้อ *Vibrio* spp. พบได้ทั่วโลก และเป็นปัญหาสำคัญอย่างหนึ่งของการเลี้ยงกุ้ง เกิดจากเชื้อ *Vibrio* spp. เช่น *V. parahaemolyticus, V. harveyi, V. vulnificus* เป็นต้น ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ ส่วนใหญ่รูปร่างท่อน ต้องการเกลือในการเจริญเติบโต (halophilic) เชื้อนี้พบได้ทั่วไปในน้ำทะเล แม้แต่ในกุ้งที่แข็งแรงก็สามารถพบเชื้อ *Vibrio* spp. ในทางเดินอาหารของกุ้งได้ และเชื้อ *Vibrio* spp. เกิดการดื้อยาต้านจุลินทรีย์ได้ง่ายมาก

การกระจายตัวของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในสิ่งแวดล้อมขึ้นกับฤดูกาล โดยพบว่าการตรวจพบเชื้อชนิดนี้มีความสัมพันธ์กับอุณหภูมิของน้ำทะเล กล่าวคือ เชื้อ *V. parahaemolyticus* จะถูกพบได้มากในช่วงฤดูร้อน เนื่องมาจากในช่วงฤดูหนาวที่น้ำทะเลมีอุณหภูมิต่ำ เชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ จะอาศัยอยู่ในตะกอนใต้พื้นน้ำ จากนั้นเมื่ออุณหภูมิของน้ำเพิ่มสูงขึ้น เชื้อจากตะกอนใต้พื้นน้ำจะแพร่กระจายเข้าสู่แพลงก์ตอนสัตว์ เมื่อสภาวะแวดล้อมเหมาะสมเชื้อ จะย่อยผนังเซลล์ของแพลงก์ตอนสัตว์ และเพิ่มจำนวนมากขึ้น ดังนั้นในเดือนที่มีอากาศอบอุ่น จะส่งผลให้มีการติดเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้สูงสำหรับการป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* สามารถทำได้โดยหลีกเลี่ยงการรับประทานอาหารทะเลดิบ หรือ ดิบ ๆ สุกๆ เลือกรับประทานอาหารทะเลที่ปรุงสุกใหม่ ๆ และควรแยกอาหารทะเลที่ปรุงสุก และยังไม่สุกออกจากกัน เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียสามารถผ่านจากอาหารดิบไปยังอาหารสุกได้ รวมทั้งแยกอุปกรณ์ในการประกอบอาหาร หรือทำความสะอาดอุปกรณ์ที่ใช้ในการประกอบอาหารทะเลก่อนนำไปใช้กับอาหารชนิดอื่น

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาลักษณะทางกายภาพของเชื้อโปรไบโอติก
2. เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อโปรไบโอติกในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน
3. เพื่อศึกษาผลกระทบของเชื้อโปรไบโอติกต่อเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ก่อโรคในกุ้ง

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อโปรไบโอติก ได้แก่ ลักษณะโคโลนี และรูปร่างของเชื้อ

2. ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อโปรไบโอติกในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลกลูโคส น้ำแป้งย่อย และน้ำเชื่อมจากโรงงาน

3. ศึกษาผลกระทบของเชื้อโปรไบโอติกต่อเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ก่อโรคในกุ้งโดยการเลี้ยงรวมกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

1.4 ประโยชน์คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อนำเชื้อโปรไบโอติกไปใช้ในการเลี้ยงกุ้งทางการเกษตรเพื่อการเพิ่มปริมาณผลผลิต

2. เพื่อนำเชื้อโปรไบโอติกไปใช้ในการรักษาโรคของกุ้ง โดยเชื้อโปรไบโอติกไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคและไม่ก่อให้เกิดสารพิษตกค้างอันเนื่องมาจากการใช้ยาปฏิชีวนะที่เป็นปัญหาสำคัญทางเศรษฐกิจอยู่ในขณะนี้

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 กุ้ง

กุ้งจัดอยู่ในไฟลัมสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง อยู่ในไฟลัม Arthropod คลาส Crustacean อันดับ Decapoda มีด้วยกันหลายวงศ์ กุ้งเป็นสัตว์น้ำ หายใจด้วยเหงือก ลำตัวยาว แบนหรือกลม แบ่งเป็นปล้องๆ เปลือกที่หุ้มท่อนหัว และอกคลุมมาถึงอกปล้องที่ 8 ส่วนใหญ่กรีมีลักษณะแบนก้าม และขาอยู่ที่ส่วนหัวและอก มี 10 ขา มีทั้งในน้ำจืดและน้ำเค็ม โดยปกติชอบหลบซ่อนตัวอยู่เงียบๆ ตามพื้นน้ำ จะออกหากินในเวลากลางคืน กุ้งกินทั้งพืชและสัตว์เป็นอาหาร เช่น กินกุ้งด้วยกันเอง ลูกปลา ไส้เดือน สัตว์หน้าดินขนาดเล็กชนิดต่างๆ ข้าว เนื้อมะพร้าว ตลอดจนซากสัตว์

2.1.1 กุ้งที่นิยมเลี้ยงเพื่อบริโภคในประเทศไทย

การเลี้ยงกุ้งแบบพัฒนาเริ่มขึ้นในปี 2528-2529 ในภาคกลางบริเวณ 3 จังหวัดของไทย คือ สมุทรสาคร สมุทรสงคราม และสมุทรปราการ พื้นที่ของ 3 จังหวัดมีอาณาเขตติดต่อกับอ่าวไทยตอนบน บริเวณนี้เดิมเคยเป็นพื้นที่มีการเลี้ยงกุ้งตามธรรมชาติ และการทำนาเกลืออยู่ก่อน การปรับเปลี่ยนพื้นที่เป็นนากุ้งแบบพัฒนาเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว ด้วยการนำวิธีการสร้างบ่อ ประตูระบายน้ำเข้าออก และวิธีการเลี้ยงแบบใต้หวัน ได้ผลผลิตสูง กุ้งราคาดี เกิดเศรษฐีใหม่ขึ้นมากมาย ภายในระยะเวลา 6 เดือน ภายหลังการเลี้ยงกุ้งแบบพัฒนาได้เพียง 3 ปี ก็เกิดการล่มสลายของนากุ้งบริเวณ 3 จังหวัด การเลี้ยงก็เคลื่อนย้ายไปทางภาคตะวันออก จังหวัดจันทบุรี ระยอง ตราด และมากขึ้น มีการใช้วิชาการ และขบวนการเลี้ยงพัฒนากว่าเดิม ทำให้การเลี้ยงมีผลผลิตสูง และต่อเนื่องยาวนานพร้อมๆกับการเลี้ยงในเขตตะวันออก ได้มีการขยายพื้นที่การเลี้ยงลงมาทางภาคใต้ที่มีพื้นที่ติดต่อกับชายทะเลเป็นระยะทางยาว ทั้งทางฝั่งอ่าวไทย และฝั่งอันดามัน จนปัจจุบันนี้ พ.ศ. 2543 คาดว่าพื้นที่การเลี้ยงกุ้งของไทยจะกำหนดอยู่ที่ 500,000 ไร่ (สถิติกรมประมง) และพื้นที่อาจจะเพิ่มมากขึ้น เมื่อมีการเปลี่ยนพื้นที่นาข้าวเป็นนากุ้งกันมากขึ้น กุ้งที่นิยมเลี้ยงในประเทศไทยมี 3 ชนิด คือ กุ้งกุลาดำ กุ้งขาวแวนาไม และกุ้งกร้ามกราม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ก. กุ้งกุลาดำ

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Penaeus monodon*

ลักษณะ กุ้งกุลาดำเป็นกุ้งทะเลขนาดใหญ่ยาวประมาณ20-25 เซนติเมตร ขอบด้านบนของกรีมีฟัน 6-8 ซี่ ลำตัวมีสีน้ำเงินเข้มปนม่วงแดง และมีลายคาดตามด้านขวางทางด้านบนเป็นปล้อง หนวดมีสีดำไม่มีลาย สันข้างแก้มอยู่ในแนวตรง ปลายหางและขาว่ายน้ำมีขนสีแดง (ดังแสดงในรูปที่ 2.1) การดูกุ้งว่าเจริญเติบโตหรือไม่ ให้สังเกตจากหนวดกุ้ง ถ้ากุ้งเจริญเติบโตดีหนวดกุ้งจะยาว หัวใจในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ก้นบ่อต้องสะอาดไม่มีเศษขยะหรือเศษอาหารกุ้งเน่า มีกังหันตีน้ำ เพื่อเพิ่มออกซิเจน ให้อาหารพอเหมาะกับจำนวนกุ้งที่เลี้ยง ดูแลตรวจสอบไม่ให้น้ำเปลี่ยนสีการเลี้ยงกุ้งไม่ควรทำให้กุ้งตกใจ เพราะจะทำให้กุ้งหยุดการเจริญเติบโต และตายในที่สุด

รูปที่ 2.1 กุ้งกุลาดำ

ที่มา : ศูนย์วิจัย และพัฒนาชายฝั่งเพรชบุรี การเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล http://www.fisheries.go.th/cf-phetchaburi/index.php?option=com_content&view=article&id=51&Itemid=82 (23 เมษายน 2556)

ข. กุ้งขาว

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Litopenaeus vannamei*

ลักษณะ กุ้งขาวแวนาไมมี 8 ปล้องตัว ลำตัวสีขาว อกใหญ่ การเคลื่อนไหวเร็ว ส่วนหัวมี 1 ปล้อง มีกรีอยู่ในระดับยาวประมาณ 0.8 เท่าของความยาวเปลือก หัวสันกรีสูง ปลายกรีแคบ ส่วนของกรีมีลักษณะเป็นสามเหลี่ยมมีสีแดงแกมน้ำตาล กรีด้านบนมี 8 ฟัน กรีด้านล่างมี 2 ฟัน ร่องบนกรีมองเห็นได้ชัด เปลือกหัวสีขาวอมชมพูถึงแดง ขาเดินมีสีขาวเป็นลักษณะที่ขาว่ายน้ำ 5 คู่ ส่วนหางมี 1 ปล้อง ปลายหางมีสีแดงเข้ม แพนหางมี 4 ใบ และ 1 กรีหาง ขนาดตัวโต (ดังแสดง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ในรูปที่ 2.2) กุ้งสายพันธุ์นี้จะมีขนาดที่เล็กกว่ากุ้งกุลาดำ โดยความยาวจากกรีหัวถึงปลายกรีหาง 230 มิลลิเมตร ความยาวจากโคนหัวถึงปลายกรีหัว 65 มิลลิเมตร ความยาวจากโคนหัวถึงปลายกรีหาง 165 มิลลิเมตร เส้นรอบวงหัว 94 มิลลิเมตร เส้นรอบวงตัว 98 มิลลิเมตร แพนหางยาว 35 มิลลิเมตร ตาห่างกัน 20 มิลลิเมตร น้ำหนักตัวเฉลี่ย 120 กรัม หากินทุกระดับความลึกของน้ำ ชอบว่ายโดยการล่องน้ำ ลอกคราบเร็วทุกๆสัปดาห์ ไม่หมกตัว ชอบน้ำกระด้างที่มีความกระด้างรวม 120 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าอัลคาไลน์ในช่วง 80-150 มิลลิกรัมต่อลิตร มีนิสัยที่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะของน้ำในบ่อเพาะเลี้ยง ตกใจง่าย เป็นกุ้งที่เลี้ยงได้ทิ้งในระบบธรรมชาติ และระบบกึ่งหนาแน่นโดยมีระดับน้ำประมาณ 1.0-1.5 เมตร

รูปที่ 2.2 กุ้งขาว

ที่มา : คุณภาพน้ำในการเลี้ยงกุ้งขาว http://www.mario-bp.com/498407/คุณภาพน้ำในการเลี้ยงกุ้งขาว (23 เมษายน 2556)

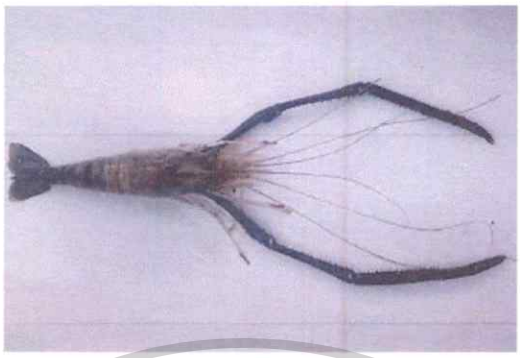
ค. <u>กุ้งก้ามกราม</u>

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Macrobrachium rosenbergii*

ลักษณะ ลำตัวแบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ ส่วนหัว ส่วนลำตัว ส่วนหาง ส่วนหัวประกอบด้วยขาเดิน 3 คู่ และขาที่มีลักษณะเป็นก้ามอีก 2 คู่ อยู่ทางส่วนหน้า ขาคู่ที่ 1 ใช้ในการป้อนอาหารเข้าปาก และทำความสะอาดร่างกาย ขาคู่ที่ 2 มีความยาว และใหญ่กว่าคู่ที่ 1 ซึ่งใช้ประโยชน์ในการต่อสู้ และจับเหยื่อ ส่วนปลายสุดของกุ้งก้ามกรามประกอบด้วยกรีมีลักษณะแบนข้างส่วนโคนของกรีหนา และนูนเรียวแหลมไปทางส่วนปลาย ตรงกลางกรีโค้งแอ่นลง ส่วนปลายงอนขึ้น ที่สันกรีด้านบน และล่างมีหนามคล้ายฟันเลื่อย จำนวนหนามบนสันกรีล่าง 8-14 ซี่ สันกรีบนมี 12-15 ซี่ ตาอยู่ส่วนได้ โคนกรีอยู่บนก้านซึ่งยาวยื่นออกมา และเคลื่อนไหวได้ ส่วนลำตัวแบ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ออกเป็นปล้องๆ รวม 6 ปล้อง ด้านล่างของส่วนลำตัวมีขาว่ายน้ำ 5 คู่ หางประกอบด้วยแพนหางข้างละ 1 คู่ ตรงส่วนกลางเป็นปลายหางแหลม (ดังแสดงในรูปที่ 2.3)



รูปที่ 2.3 กุ้งก้ามกราม
ที่มา : การเลี้ยงกุ้งก้ามกราม, 2010 http://blog.taradkaset.com/การเลี้ยงกุ้งก้ามกราม/ (23 เมษายน 2556)

2.1.2 คุณค่าทางโภชนาการของกุ้ง

กุ้งเป็นสัตว์ที่นิยมบริโภคกันทั่วโลก เนื่องจากมีคุณค่าทาง โภชนาการสูง และมีรสชาติที่อร่อย สามารถนำมาปรุงอาหารได้หลายประเภท กุ้งต้มประมาณ 4.00 ออนซ์ หรือ น้ำหนัก 113.40 g ประกอบไปด้วยสารอาหารต่างๆ แสดงดังตารางที่ 2.1 ดังนี้

ตารางที่ 2.1 แสดงข้อมูลโภชนาการของกุ้งต้ม

Nutrients in Shrimp 4.00 oz-wt (113.40 grams)	
Nutrient	%Daily Value
tryptophan	103.1%
selenium	64.1%
protein	47.4%
vitamin B12	28.1%
choline	21.5%
iron	19.4%
phosphorus	15.5%
omega-3 fats	15.4%
vitamin B3	14.7%
zinc	11.8%
copper	11%
magnesium	9.6%
Calories (112)	6%

ที่มา : Shrimp an important message about shrimp, 2003 http://www.whfoods.com/genpage.php?tname=foodspice&dbid=107 (23 เมษายน 2556)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

2.1.3 คุณค่าทางเศรษฐกิจของกุ้ง

ภาคการผลิต ประเทศไทยเป็นประเทศผู้ผลิต และส่งออกกุ้งอันดับ 1 ของโลก โดยปี 2555 มีปริมาณผลผลิต 540,000 ตัน ลดลง 10% จากปี 2554 ซึ่งมีปริมาณ 600,000 ตัน มีสาเหตุมาจากปัญหาโรคระบาด และสภาพ ภูมิอากาศที่เปลี่ยนแปลงไป คาดว่าปริมาณผลผลิตกุ้งปี 2556 ซึ่งจะใกล้เคียงกับหรือลดลงเล็กน้อยจากปีที่ผ่านมา แสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 แสดงปริมาณผลผลิตกุ้งของโลกปี 2549-2555

ประเทศ/ปี	2549	2550	2551	2552	2553	2554	2555	%เปลี่ยนแปลง (54/55)
ไทย	500	530	495	563	640	600	540	-10%
จีน	400	480	523	560	600	565	450	-20%
เวียดนาม	150	170	200	200	215	240	170	-29%
อินโดนีเซีย	260	210	230	180	140	150	105	-30%
อินเดีย	103	110	87	100	137	170	190	+12%
มาเลเซีย	42	62	68	92	105	73	57.4	-21%
ฟิลิปปินส์	36	38	29	35	40	42	40	-5%
อเมริกา กลาง-ใต้	395	395	397	412	410	422	432	+2%
อื่นๆ	55	55	55	50	65	65	45	-31%
รวม	1,941	2,050	2,084	2,192	2,352	2,317	2,024.5	-13%

หมายเหตุ : หน่วย :พันตัน

ที่มา : อุตสาหกรรมกุ้งไทย ปี 2554 และแนวโน้ม ดร.สมศักดิ์ ปณีตัธยาศัย นายก สมาคมกุ้งไทย www.thaichamber.org/userfiles/file/7(1).pdf (23 เมษายน 2556)

ภาคการส่งออก ตลาดหลักของสินค้ากุ้งไทย ประกอบด้วย สหรัฐฯ ญี่ปุ่น และสหภาพยุโรป ซึ่งรวมปริมาณการส่งออกไปยัง 3 ตลาดหลัก ประมาณ 76% อย่างไรก็ตามจากข้อมูลการส่งออกปี 2555 การส่งออกกุ้งไทยไปยังตลาดหลักทั้ง 3 มี แนวโน้มลดลง ซึ่งเป็นผลมาจากปัญหาเศรษฐกิจ และมาตรการการกีดกันการค้า แสดงในตารางที่ 2.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ตารางที่ 2.3 การส่งออกกุ้งไทยปี 2545-2555 (มกราคม-ตุลาคม)

ประเทศ/ กลุ่มประเทศ	ม.ค. – ต.ค. 54		ม.ค. – ต.ค. 55		% แตกต่าง	
	ปริมาณ	มูลค่า	ปริมาณ	มูลค่า	ปริมาณ	มูลค่า
เอเชีย	**90,332**	**25,371**	**101,866**	**28,238**	**12.78**	**11.30**
- จีน	3,737	762	4,472	923	19.67	21.13
- ญี่ปุ่น	64,570	19,779	66,328	21,109	2.72	6.72
- อื่นๆ	22,015	4,830	31,066	6,206	41.11	28.49
สหรัฐอเมริกา	**149,718**	**42,486**	**107,224**	**29,510**	**-28.38**	**-30.54**
อียู	**51,092**	**13,545**	**43,668**	**12,070**	**-14.53**	**-10.89**
ออสเตรเลีย	**7,706**	**2,037**	**8,548**	**2,510**	**10.93**	**23.22**
อื่นๆ	**26,463**	**7,176**	**23,958**	**6,806**	**-9.47**	**-5.16**
รวม	**325,301**	**90,615**	**285,264**	**79,134**	**-12.31**	**-12.67**

หมายเหตุ : หน่วย ปริมาณ:ตัน มูลค่า:ล้านบาท

ที่มา : อุตสาหกรรมกุ้งไทย ปี 2554 และแนวโน้ม ดร.สมศักดิ์ ปณีตัธยาศัย นายก สมาคมกุ้งไทย www.thaichamber.org/userfiles/file/7(1).pdf (23 เมษายน 2556)

2.1.4 โรคในกุ้ง

ปัญหาเรื่องโรคติดเชื้อในกุ้ง ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญที่สุดของเกษตรกรผู้เลี้ยง ที่ทำให้ผลผลิตกุ้งเสียหายอย่างรุนแรง สามารถแยกได้ดังนี้คือ (ชลอ, 2533)

ก <u>โรคที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัส</u> เช่น

- โรคหัวเหลือง เกิดจากเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองที่เรียกว่า Yellow head virus (YHV) หัวกุ้งที่ป่วยมีสีเหลือง ซึ่งเกิดจากเหงือก และเปลือกกุ้งที่มีสีเหลือง รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา พบการตายของเนื้อเยื่อต่างๆจำนวนมาก (extensive multifocal และ diffuse necrosis ของเนื้อเยื่อชั้นนอก และ เนื้อเยื่อชั้นกลาง) เช่น เหงือก เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เนื้อเยื่อ hematopoietic tissue lymphoid organ เป็นต้น รอยโรคเกิดจากการตายของเซลล์ที่ติดเชื้อ ซึ่งมีนิวเคลียสขยายใหญ่หรือหดตัวลง บางครั้งพบนิวเคลียสแตกตัว

- โรคตัวแดงดวงขาวเกิดจากเชื้อ White spot syndrome virus (WSSV) หรือ White spot virus (WSV) โดยเชื้อจะเข้าทำลายระบบเนื้อเยื่อชั้นนอก และเนื้อเยื่อชั้นกลาง โดยจะพบการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่ออย่างชัดเจนบริเวณเนื้อเยื่อผิวใต้เปลือก เหงือก และ Lymphoid organ โดยจะทำให้นิวเคลียสของเซลล์บวมโต บริเวณใต้เปลือกกุ้งตลอดทั้งตัวจะมีสีแดงเรื่อๆชมพู

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ถึงเข้ม บางครั้งจะเป็นสีส้ม และมีจุดขาวขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.1-2 มิลลิเมตร โดยเฉพาะบริเวณส่วนหัว และด้านข้างลำตัวส่วนหาง บางครั้งกุ้งจะลอกคราบไม่ออก หรือลอกคราบแล้วเปลือกไม่แข็ง ทำให้เกิดการตายของกุ้งสูงถึง 80-100 % ภายใน 4-5 วัน กุ้งจะเกยขอบบ่อเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ โดยที่อัตราการกินอาหารยังปกติ ลักษณะของกุ้งที่มาเกยขอบบ่อในระยะแรกจะมีอาการตัวแดง เปลือกนิ่ม บาง โดยเฉพาะส่วนหัวและบริเวณสันหลังตลอดแนวลำตัวมีสีแดงก่อนส่วนอื่น ต่อมาประมาณ 3-4 วัน จะพบกุ้งที่มีอาการตัวแดงในยอ โดยจะมีจำนวน เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ และกุ้งจะเริ่มกินอาหารน้อยลง ต่อมา 5-7 วัน จะมีอัตราการตายมากขึ้นอย่างรวดเร็ว

ข. <u>โรคที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย</u> เช่น

- โรคติดเชื้อ *Vibrio* spp. แบ่งได้เป็น 3 แบบ ได้แก่ 1) โรคติดเชื้อภายนอก พบกลุ่มแบคทีเรียที่ cuticle จำนวนมาก 2) โรคติดเชื้อ *Vibrio* spp. ในทางเดินอาหาร พบกลุ่มแบคทีเรียที่ ภายในcuticle เช่น บริเวณปาก หลอดอาหาร กระเพาะอาหาร การลอกหลุดของเซลล์เยื่อบุ hepatopancreas และลำไส้ส่วนกลาง การอักเสบชนิด hemocytic inflammation และ melanization และ 3) โรคติดเชื้อ *Vibrio* spp. แบบแพร่กระจาย (systemic infection) พบ septicemia hemocytic nodules กล้ามเนื้อฝ่อ (muscle atrophy) หรือ septic hepatopancreatic necrosis การติดเชื้อ *Vibrio* spp.เป็นสาเหตุของโรคมากมาย เช่น hatchery vibriosis, sea gull syndrome, septic hepatopancreatic necrosis (SHPN), luminescent vibriosis, swollen hidgut syndrome, shell disease, appendage necrosis (rot), splinters

ค. <u>โรคที่เกิดจากโปรโตซัว</u> เช่น

- กุ้งที่มีเชื้อ Zoothamnium ตามลำตัว และเหงือก จะมีลักษณะคล้ายกับตะกอน หรือเส้นใยตามลำตัว ถ้ามีในปริมาณที่มากลูกกุ้งจะลอยบริเวณผิวน้ำ แทนที่จมตัวลงสู่พื้นบ่อ การรักษาในกรณีที่ Zoothamnium บริเวณเหงือกเป็นจำนวนมาก จนทำให้เหงือกมีสีแดง และกุ้งเริ่มอ่อนแอ เนื่องจากการหายใจไม่สะดวก ลูกกุ้งจะเริ่มกินอาหารลดลงและตายได้

2.1.5 การรักษาโรคในกุ้ง

วิธีการรักษาโรคในกุ้งที่นิยมทำส่วนใหญ่มี 2 วิธี คือ การรักษาโดยการใช้ยาต้านจุลินทรีย์ และการรักษาโดยการใช้โปรไบโอติก ซึ่งแต่ละวิธีจะมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกันไป แต่ปัจจุบันนิยมใช้โปรไบโอติกมากกว่า เนื่องส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ตัวกุ้ง และผู้บริโภคน้อยกว่าการใช้ยาต้านจุลินทรีย์ (ชลอ, 2533)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้นำเอกสารนี้ไปเผยแพร่ต่อ และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ก. <u>ยาต้านจุลินทรีย์</u>

ยาต้านจุลินทรีย์ (Antimicrobial drug) หมายถึง สารประกอบเคมีที่ได้จากธรรมชาติ เช่น จากเชื้อรา หรือจากการสังเคราะห์ขึ้นมา ซึ่งยานี้จะมีผลไปทำลายหรือต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ เป็นยาที่ใช้กันมากในคน และสัตว์ ในด้านการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เกษตรกรรู้จักการใช้ประโยชน์ของยาต้านจุลินทรีย์ในการเลี้ยงปลา และเลี้ยงกุ้งมาหลายปีแล้ว การใช้ยาได้แพร่หลายอย่างรวดเร็วทั้งชนิดของยา และปริมาณการใช้ ในการเกิดโรคหรือความผิดปกติในสัตว์น้ำ เกิดจาก 2 สาเหตุใหญ่ๆก็คือ โรคเกิดจากการติดเชื้อ ได้แก่ เชื้อไวรัส แบคทีเรีย เชื้อรา โปรโตซัว เป็นต้น และโรคที่ไม่ได้เกิดจากการติดเชื้อ เช่น เกิดจากการจัดการที่ไม่ดี การได้รับปริมาณตลอดจนคุณค่าทางอาหารไม่เพียงพอ เป็นต้น โรคติดเชื้อจากแบคทีเรียนั้นแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ โรคที่ติดเชื้อจากเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้แก่ *Streptococcus* spp. และ *Mycobacterium* spp. เป็นต้น และโรคที่ติดเชื้อจากแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Vibrio* spp., *Aeromonas hydrophila* และ *Fiexibacter columnaris* การป้องกันหรือควบคุมไม่ให้เกิดโรคจากเชื้อแบคทีเรียมีหลายวิธี เช่น มีการจัดการที่ดีการให้อาหารที่มีคุณภาพในปริมาณที่พอเพียง เป็นต้น เชื่อกันว่าการป้องกันไม่ให้เกิดโรคดีกว่าการรักษาโรคที่เกิดขึ้นแล้ว เพราะการรักษานั้นนอกจากจะทำให้สิ้นเปลืองทั้งเวลา และค่ารักษาแล้ว ยังต้องสูญเสียสัตว์น้ำไปบางส่วนจากการตายด้วย

ข. <u>ยาต้านจุลินทรีย์ที่ใช้ในปัจจุบันมีฤทธิ์ต่อจุลินทรีย์</u>ได้ 2 ทาง คือ

- ยาที่สามารถไปฆ่าหรือทำลายเชื้อจุลินทรีย์ เรียกว่า Bacteriocidal ทำให้จุลินทรีย์ตาย และสลายตัวไปในที่สุด

- ยาที่ไปยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ เรียกว่า Bacteriostatic เมื่อยาไปยับยั้งการเจริญเติบโตของแล้ว จุลินทรีย์เหล่านั้นจะถูกทำลายโดยขบวนการป้องกันตัวในร่างกาย เช่น เกิดการย่อยสลายโดยเซลเม็ดเลือดขาว หรือถูกขับออกจากร่างกายโดยตรง

ค. <u>ผลกระทบของการใช้ยาต้านจุลินทรีย์</u>

การใช้ยาต้านจุลินทรีย์ ผลกระทบที่เห็นได้ชัดคือ ถ้ามีการใช้ยาในปริมาณที่มากเกินไปหรือบ่อยครั้งก็จะเป็นอันตรายต่อตัวกุ้ง โดยจะมีผลต่ออัตราการเจริญเติบโต แล้วถ้าใช้ในปริมาณที่น้อยเกินไปจะทำให้ผลในการรักษาไม่ดีเชื้อโรคอาจดื้อยาได้ นอกจากนี้ปัญหาอีกอย่างหนึ่งคือ ปัญหาการตกค้างของยาต้านจุลินทรีย์ และยาปฏิชีวนะในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ซึ่งถือว่าเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ปัญหาที่มีความสำคัญมาก โดยถ้ามีการบริโภคกุ้งที่มีสารตกค้าง จะก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคได้ ซึ่งได้เป็นปัญหาในการส่งออกกุ้งไปยังต่างประเทศได้

การตกค้างของยาในน้ำ ส่งผลให้แบคทีเรียมีความสามารถในการปรับตัว จึงเกิดปัญหาการดื้อยาตามมา ดังนั้นจึงทำให้การรักษาในคราวต่อไป จำเป็นต้องมีการเพิ่มปริมาณยาให้มากขึ้นตามไปด้วย นอกจากนี้การตกค้างของยาจะทำให้ความสมดุลต่างๆ รวมทั้งวัฏจักรในการย่อยสลายของเสียต่างๆเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งก่อให้เกิดการกระทบกระเทือนต่อสิ่งมีชีวิตต่างๆที่อยู่ในน้ำ

2.2 โปรไบโอติก

คำว่าโปรไบโอติก หมายถึง อาหารเสริมที่เป็นจุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิต เมื่อรับประทานเข้าไปแล้ว ช่วยให้ร่างกายผู้นั้นมีสุขภาพที่ดีขึ้น ซึ่งอาจช่วยป้องกันหรือรักษาโรคต่างๆ ที่เกิดขึ้น เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในร่างกาย (Salminen และคณะ, 1998) ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียที่เคยมีในลำไส้ใหญ่ในสมัยเป็นเด็กทารก

โปรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งที่ได้ผล คือ วิวัฒนาการเลี้ยงโดยใช้จุลินทรีย์ เพื่อปรับปรุงคุณภาพชีวิตสัตว์เลี้ยง และสิ่งแวดล้อมรอบตัวสัตว์เลี้ยง ซึ่งการเลี้ยงกุ้งจะหมายถึงสุขภาพกุ้ง คุณภาพน้ำเลี้ยง และคุณภาพพื้นบ่อ ความหมายของโปรไบโอติกนี้ก็คือ จุลินทรีย์โดยเฉพาะแบคทีเรียที่มีชีวิต ไม่ว่าจะเป็นแบคทีเรียชนิดเดียวหรือหลายชนิดก็ตาม รวมทั้งผลิตภัณฑ์จากสิ่งมีชีวิต เช่น น้ำย่อย และกรดอินทรีย์ ที่เป็นประโยชน์ต่อการดำรงชีวิตของสัตว์เลี้ยงนั้นๆ แต่เดิมการใช้โปรไบโอติกจะใช้เฉพาะเติมลงในอาหารสัตว์ เป็นสารเสริมชีวนะที่เพิ่มลงในอาหารสัตว์เพื่อปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในตัวสัตว์ ซึ่งบางครั้งจะรวมเอาน้ำย่อยเติมลงในอาหารสัตว์ด้วย ลักษณะการเสริมสารโปรไบโอติก คือ การให้สัตว์ได้รับจุลินทรีย์โดยตรง ด้วยวิธีการกินจุลินทรีย์ที่ได้รับการคัดเลือกสายพันธุ์มาแล้วอย่างดี มีลักษณะการทำงานที่คงทนต่อสิ่งแวดล้อมในตัวสัตว์ ทนอุณหภูมิ และไม่มีพิษต่อสัตว์นั้นๆ

ถึงแม้ผลการใช้โปรไบโอติกจะให้ผลดี แต่ต้องระมัดระวัง และรู้จักวิธีใช้ เพราะขบวนการในร่างกายสัตว์จะทำลายจุลินทรีย์นั้นๆได้ ยิ่งไปกว่านั้น ปัจจุบันยังมีการคิดค้นหาจุลินทรีย์ที่แยกจากธรรมชาติ หรือที่พบในบ่อกุ้ง มาปรับปรุงพันธุ์ให้มีคุณสมบัติจำเพาะมากขึ้น และทำงานได้ดีในสภาวะการเลี้ยงกุ้งที่มีความเค็มของน้ำหลายระดับ หลายค่าพีเอช และดำรงชีวิตแพร่ขยายพันธุ์ในตัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

กุ้งได้ อีกทั้งพยายามเก็บรักษาจุลินทรีย์นี้ในรูปผง และน้ำ ที่เกิดจากขบวนการหมักให้จุลินทรีย์อยู่และทำงานได้นานที่สุด เพื่อสะดวกในการใช้งานตลอดเวลา

2.2.1 ตัวอย่างโปรไบโอติกที่มีใช้อยู่ในปัจจุบัน

โดยปกติแล้วแบคทีเรียโปรไบโอติกที่ใช้ในอุตสาหกรรมนมเปรี้ยวส่วนใหญ่ คือ แบคทีเรียในกลุ่ม Lactobacilli และ Streptococci แต่จากการศึกษาคุณสมบัติในการส่งเสริมสุขภาพของแบคทีเรียในลำไส้ จากอดีตจนถึงปัจจุบันพบว่า Bifidobacteria สามารถเป็นอีกหนึ่งทางเลือกในอุตสาหกรรมประเภทนี้ ประเทศญี่ปุ่น ซึ่งเป็นหนึ่งในผู้นำในทางการศึกษาแบคทีเรียในลำไส้ ได้เป็นผู้บุกเบิกในการผลิตโยเกิร์ต และนมเปรี้ยวที่ได้จากหมักของ Bifidobacteria ซึ่งแม้ว่ารสชาติจะไม่ดีเท่าผลิตภัณฑ์ที่หมักจาก Lactobacilli แต่ด้วยประโยชน์ที่มากกว่า จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจสำหรับผู้รักสุขภาพ และในเมืองไทยก็มีโยเกิร์ตที่หมักโดย Bifidobacteria วางจำหน่ายแล้ว นอกจากใช้ในอุตสาหกรรมอาหารแล้ว โปรไบโอติก ก็ยังถูกใช้ในการรักษาโรคทางเดินอาหาร ในการทดลองทางการแพทย์อย่างแพร่หลาย อาทิ การใช้ *Lactobacillus rhamnosus* GG ในการบรรเทา และป้องกันอาการท้องร่วงในเด็กทารก การใช้ Bifidobacteria และ Lactobacilli รวมกันในการรักษาอาการท้องร่วงอย่างรุนแรง และช่วยลดอัตราการเจ็บป่วยด้วยโรคทางเดินอาหารและการเสียชีวิตในทารกที่คลอดก่อนกำหนด นอกจากนี้ยังมีหลักฐานจากงานวิจัยทางการแพทย์อีกหลายชิ้นที่ยืนยันว่า Bifidobacteria สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันในร่างกายได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ตัวอย่างโปรไบโอติกที่มีใช้อยู่ในปัจจุบัน (พ.ศ. 2547) กลุ่ม Lactobacilli ได้แก่ *L. acidophilus, L. casei, L. delbrueckii, L. reuteri, L. brevis, L. rhamnosusg* เป็นต้น กลุ่ม Gram-positive cocci ได้แก่ *Lactococcus lactis, Enterococcus faecium* เป็นต้น กลุ่ม Bifidobacteria ได้แก่ *B. bifidum, B. adolescentis, B. animalis, B. infantis, B. longum, B. thermophilum* เป็นต้น

2.2.2 ประโยชน์ของโปรไบโอติกต่อกุ้ง

ก. <u>ช่วยส่งเสริมการดำรงชีวิตให้กุ้งดีขึ้น</u> โดยการช่วยย่อย หรือสร้างน้ำย่อยไปย่อยอาหารให้มีขนาดเล็ก จนกุ้งดูดซึมไปใช้ได้เร็วกว่าการย่อยอาหารตามปกติ จึงทำให้กุ้งเจริญเติบโตเร็ว อัตราแลกเนื้อดี เช่น *Bacillus* spp. ที่ใช้เป็นโปรไบโอติก ช่วยให้กุ้งขาวแวนาไมมีน้ำหนัก และการรอดชีวิตที่สูงขึ้น และปริมาณเชื้อ *Vibrio* spp.ในตัวกุ้งน้อยกว่ากลุ่มที่ไม่ได้เลี้ยงโปรไบโอติก เมื่อใช้ผสมอาหารในการเลี้ยง (ยุทธพล และนงนุช, 2554)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ข. <u>เสริมสร้างระบบความต้านทาน</u> หรือภูมิคุ้มกันของตัวกุ้ง เพื่อป้องกันการติดเชื้อก่อโรคที่ติดเข้ามาทางระบบทางเดินอาหารของกุ้ง เช่น

- การรวมกันของเชื้อ *Brevibacillus parabrevis*, *B. velezensis*, *B. amyloliquifaciens*, *B. subtilis*, *B. megaterium* สามารถยับยั้งเชื้อ *Vibrio harveyi* ในกุ้งขาวแวนนาไม เมื่อใช้ผสมอาหารในการเลี้ยง (ปาจรีย์ และคณะ, 2554)

- เชื้อ*V. alginolyticus* UTM 102, *B. subtilis* UTM 126, *R. gallaeciensis* SLV 03 และ *P. aestumarina* SLV22 ที่ใช่เป็นโปรไบโอติก ที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันการติดโรคจากเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในกุ้ง (Balcazar และคณะ, 2007)

ค. ช่วยปรับสมดุลสภาพแวดล้อในบ่อกุ้ง เช่น แบคทีเรียในกลุ่ม Bacillus ที่ใช้เป็นโพรไบโอติกนั้นสามารถปรับปรุงคุณภาพน้ำ โดยควบคุมปริมาณแอมโมเนียที่เกิดจากกุ้งขับถ่ายออกมา ไม่ให้อยู่ในระดับที่มากเกินไป (มนฑกานต์ และคณะ, 2547)

2.3 เชื้อ *Vibrio* spp.

โรคติดเชื้อ *Vibrio* spp.พบได้ทั่วโลก และเป็นปัญหาสำคัญของการเลี้ยงกุ้ง เกิดจากเชื้อ *Vibrio* spp. เช่น *V. parahaemolyticus, V. harveyi, V. vulnificus* เป็นต้น เชื้อนี้พบได้ทั่วไปในน้ำทะเล แม้แต่ในในกุ้งที่แข็งแรงก็สามารถพบเชื้อ *Vibrio* spp.ในทางเดินอาหารของกุ้งได้ และเชื้อ *Vibrio* spp.นี้เกิดการดื้อยาต้านจุลินทรีย์ได้ง่ายมาก

2.3.1 ลักษณะและคุณสมบัติของเชื้อ *V. parahaemolyticus*

V. parahaemolyticus เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างท่อน ลักษณะเป็นท่อนตรงหรือโค้งเล็กน้อย 0.5-0.8×1.4-2.6 ไมครอน (Inglis และคณะ, 1993) สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน ไม่สร้างสปอร์มีแคปซูล เมื่ออยู่ในอาหารเหลวเคลื่อนที่ เพื่อใช้ในการเคลื่อนที่ สามารถใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอน และพลังงาน สามารถสร้างเอนไซม์ catalase และ oxidase ได้ ไม่สามารถหมักน้ำตาลซูโครส แต่หมักน้ำตาลกลูโคสได้ สร้างกรดแต่ไม่เกิดแก๊ส ดังนั้นลักษณะโคโลนีบนอาหาร TCBS จึงมีสีเขียวแกมน้ำเงิน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-3 มิลลิเมตร

V. parahaemolyticus เจริญได้ที่อุณหภูมิระหว่าง 15-42 องศาเซลเซียส อุณหภูมิต่ำที่สุดที่สามารถเจริญได้คือ 5 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูงสุดที่สามารถเจริญได้คือ 44 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ระหว่าง 30-35 องศาเซลเซียส *V. parahaemolyticus* สามารถเจริญได้ในช่วง pH ที่ค่อนข้างกว้างคือ 4.8-11.0 แต่ pH ที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ในช่วง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

7.6-8.6 นอกจากนี้โซเดียมคลอไรด์ก็เป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการเจริญของเชื้อ ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เชื้อเจริญเติบโตได้อยู่ในช่วง 0.5-8.0% ความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 2.0-3.0% (Lee, 1990)

2.3.2 อาการของกุ้งที่ติดเชื้อ *Vibrio* spp.

โรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียในกุ้ง ส่วนมากจะเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ซึ่งโดยธรรมชาติแล้ว เชื้อ *Vibrio* spp. นี้จะเป็นเชื้อปรกติที่พบตามตัวกุ้ง เหงือก และทางเดินอาหารอยู่แล้ว แต่จะทำให้เกิดโรคได้เมื่อสภาวะแวดล้อมต่างๆ ไม่เหมาะสม เช่นขาดสารอาหาร สภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสม กุ้งเครียด อ่อนแอ หรือแสดงอาการร่วมกับไวรัสชนิดอื่น สาเหตุเกิดจากเชื้อ *V. parahaemolyticus, V. harveyi, V. alginilyticus* อาการของกุ้งจะกินอาหารน้อยลง ลำไส้ขาว ตับตับอ่อนผิดปรกติ สีเนื้อจะขุ่น ขึ้นมาเกาะขอบบ่อตัวสกปรก มีตะกอนเกาะตามผิว ตัวหลวม เมื่อนำตับและตับอ่อนมาเพาะเชื้อจะพบเชื้อเป็นจำนวนมาก หากปล่อยไว้นานอาการจะรุนแรงรักษายาก

2.3.3 รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาทำให้แยกการติดเชื้อ *Vibrio* spp. ได้เป็น 3 แบบ ได้แก่

ก. โรคติดเชื้อ *Vibrio* spp. ภายนอก พบกลุ่มแบคทีเรียที่ cuticle จำนวนมาก

ข. โรคติดเชื้อ *Vibrio* spp. ในทางเดินอาหาร พบกลุ่มแบคทีเรียที่ cuticle ภายใน internal cuticle เช่น บริเวณปาก หลอดอาหาร กระเพาะอาหาร การลอกหลุดของเซลล์เยื่อบุตับ และลำไส้ส่วนกลาง การอักเสบชนิด hemocytic inflammation และ melanization

ค. โรคติดเชื้อ *Vibrio* spp. แบบแพร่กระจาย พบ septicemia hemocytic nodules กล้ามเนื้อฝ่อ (muscle atrophy) หรือ septic hepatopancreatic necrosis การติดเชื้อ *Vibrio* spp. เป็นสาเหตุของโรคมากมาย เช่น hatchery vibriosis, sea gull syndrome, septic hepatopancreatic necrosis (SHPN), luminescent vibriosis, swollen hidgut syndrome, shell disease, appendage necrosis (rot), splinters

2.3.4 การควบคุมและป้องกัน

- ฆ่าเชื้อโรคและพักบ่อระหว่างการเลี้ยงแต่ละครั้ง
- ฆ่าเชื้อที่อาจมากับไข่กุ้ง นอร์เพลียสทั้งของกุ้ง และของไรอาร์ทีเมีย
- ใช้การจัดการที่ดี เช่นดูแลการให้อาหาร ความหนาแน่น อุณหภูมิน้ำ เป็นต้น
- ใช้โปรไบโอติก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

- ใช้ยาต้านจุลินทรีย์ เมื่อจำเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
129778
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติก รหัส BL BM BP BS BP2 และเชื้อ *V. parahaemolyticus* ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร. สุดารัตน์ สวนจิตร และ ผศ.นิสา ไกรรักษ์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี

3.2 สารเคมี

3.2.1 โซเดียมโปแตสเซียมทาร์เทรท ($C_4H_4KNaO_6.4H_2O$)

3.2.2 โซเดียมไบคาร์บอเนต ($NaHCO_3$)

3.2.3 โซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4)

3.2.4 Conc. Sulfulic acid

3.2.5 $CuSO_4\,5H_2O$

3.2.6 (Na_2CO_5)

3.2.7 α-amylase (Thermamyl, Novozymes)

3.2.8 แป้งมันสำปะหลัง ตราปลามังกร (บริษัท ตงจั่น,ประเทศไทย)

3.2.9 น้ำเชื่อมจากโรงงาน (บริษัท สหพัฒนพิบูล,ประเทศไทย)

3.3 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.3.1 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow)

3.3.2 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)

3.3.3 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)

3.3.4 เครื่องนึ่งความดันไอ (Autoclave)

3.3.5 เครื่องอบความร้อนแห้ง (Hot air oven)

3.3.6 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)

3.3.7 เครื่องกวนสาร (magnetic stirrer)

3.3.8 ไมโครปิเปต (Micropipette Pipette) ขนาด 100-1000 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ และการเตรียมเชื้อเริ่มต้น

ก. <u>การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ</u>

- เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปกติเพื่อแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ และเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น จะใช้อาหารดังนี้ อาหารแข็งและอาหารเหลว YM เพื่อเลี้ยงเชื้อโปรไบโอติก อาหารแข็งและอาหารเหลว LB เพื่อเลี้ยงเชื้อ *V. parahaemolyticus* (ภาคผนวก ก)

- เตรียมอาหารดัดแปลงเพื่อใช้ในการเลี้ยงเชื้อ ในการศึกษาความสามารถของเชื้อโปรไบโอติกในการย่อยแป้ง จะใช้อาหารเหลว YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นแป้งมันสำปะหลัง ในศึกษาการเจริญของเชื้อโปรไบโอติกในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนต่างๆ จะใช้อาหารเหลว YM ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างกัน ในศึกษาผลกระทบของเชื้อโปรไบโอติกต่อเชื้อ *V. parahaemolyticus* จะเลี้ยงชุดทดลองเชื้อผสม ด้วยอาหารเหลวผสม ส่วนอาหารเหลว YM ที่มีความเข้มข้นของเกลือ 0.5% เพื่อใช้เลี้ยงชุดควบคุมเชื้อโปรไบโอติก และอาหารเหลว LB ที่มีความเข้มข้นของเกลือ 0.5% เพื่อใช้เลี้ยงชุดควบคุมเชื้อ *V. parahaemolyticus* (ภาคผนวก ก)

ข. <u>การเตรียมเชื้อโปรไบโอติก</u>

นำเชื้อโปรไบโอติก มา streak ลงบนหลอดอาหารวุ้นเอียง YM บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อเก็บเป็นเชื้อบริสุทธิ์และเตรียมเชื้อเริ่มต้นเพื่อใช้ในการทดลอง เตรียมสารละลายเชื้อบริสุทธิ์ (ภาคผนวก ก) เพื่อทดสอบการเจริญในอาหาร YM ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างๆ เตรียมสารละลายเชื้อผสม (ภาคผนวก ก) เพื่อทดสอบผลการยับยั้งเชื้อ *V. parahaemolyticus*

ค. <u>การเตรียมเชื้อ *V. parahaemolyticus*.</u>

นำเชื้อ *V. parahaemolyticus* มา streak ลงบนอาหารแข็ง TCBS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำโคโลนีเดี่ยวสีเขียวไป streak ลงบนอาหารวุ้นเอียง LB เพื่อเก็บเป็นเชื้อบริสุทธิ์ และเตรียมเชื้อเริ่มต้นเพื่อใช้ในการทดลอง (ภาคผนวก ก)

3.4.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

นำเชื้อโปรไบโอติกทั้ง 5 ชนิด มาศึกษาลักษณะโคโลนีและรูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยวิธีย้อมแกรม (ภาคผนวก ข)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

3.4.3 การศึกษาความสามารถของเชื้อโปรไบโอติกในการย่อยแป้ง

นำเชื้อโปรไบโอติก มา streak บนอาหารแข็ง YM ที่มีแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทดสอบด้วยสารละลายไอโอดีน ลงในจานเพาะเลี้ยง ตรวจดูบริเวณที่มีการเจริญของเชื้อโปรไบโอติก ถ้าสีอาหารไม่เปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินแสดงว่าเชื้อมีความสามารถในการย่อยแป้งได้

3.4.4 การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อเจริญของเชื้อโปรไบโอติก

นำสารละลายเชื้อบริสุทธิ์ที่เตรียมได้ (ภาคผนวก ก) เลี้ยงในอาหาอาหาร YM ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างๆ ได้แก่ กลูโคส น้ำย่อยแป้ง และน้ำเชื่อม (ภาคผนวก ก) ที่มีปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างเชื้อทุก 48 ชั่วโมง จนครบชั่วโมงที่ 144 ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเชื่อม และน้ำแป้งย่อย และเก็บตัวอย่างเชื้อทุก 3 ชั่วโมง จนครบชั่วโมงที่ 78 ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส ซึ่งจะเก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสออก และล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกรอบ นำส่วนของตะกอนเซลล์มาวิเคราะห์การเจริญของเชื้อโปรไบโอติกโดยวัดค่าความขุ่นของเซลล์ (ภาคผนวก ก) นำส่วนใส มาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดย วิธี phenol-sulfuric และวิธี Somogyi-Nelson (ภาคผนวก ข) ตามลำดับ

3.4.5 การศึกษาผลกระทบของเชื้อโปรไบโอติกต่อ *V.parahaemolyticus.*

นำเชื้อโปรไบโอติกผสม (ภาคผนวก ก) ความเข้มข้น 5% มาเลี้ยงรวมกันกับเชื้อ *V.parahaemolyticus* ความเข้มข้น 3% ในอาหารผสม (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 100 มิลลิลิตรที่มีความเข้มข้นของเกลือเท่ากับ 0.5% โดยให้เป็นชุดทดลองเชื้อผสม เลี้ยงเชื้อโปรไบโอติกผสมที่มีความเข้มข้น 5% ในอาหารเหลว YM มีความเข้มข้นของเกลือ 0.5% โดยให้เป็นชุดควบคุมเชื้อโปรไบโอติก และเลี้ยงเชื้อ *V.parahaemolyticus*. ความเข้มข้น 3% ในอาหารเหลว LB ที่มีความเข้มข้นของเกลือ 0.5% โดยให้เป็นชุดควบคุมเชื้อ *V.parahaemolyticus*. จากนั้นนำฟลาสก์ทดลองทั้ง 3 ชุด ไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง เก็บผลทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 6 วัน โดยเก็บที่ 0 24 48 64 96 และ 110 ชั่วโมง และทำการวิเคราะห์ผลโดยวิธีการ spread plate เพื่อนับจำนวนโคโลนี ในแต่ละชุดการทดลองดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ก. <u>ชุดทดลองเชื้อผสม</u>

วิเคราะห์ผลโดยนับจำนวนโคโลนีของเชื้อโปรไบโอติก ด้วยวิธี spread plate บนอาหารแข็งYM บ่มที่ 24 ชั่วโมงและนับปริมาณเชื้อ *V.parahaemolyticus*. บนอาหารแข็ง TCBS บ่มที่ 24 ชั่วโมง

ข. <u>ชุดควบคุมเชื้อโปรไบโอติก</u>

วิเคราะห์ผลโดยนับจำนวนโคโลนีของเชื้อโปรไบโอติก ด้วยวิธี spread plate บนอาหารแข็ง YM บ่มที่ 24 ชั่วโมง

ค. <u>ชุดควบคุมเชื้อ *V.parahaemolyticus*</u>.

วิเคราะห์ผลโดยนับจำนวนโคโลนีของเชื้อ *V.parahaemolyticus*. ด้วยวิธี spread plate บนอาหารแข็ง TCBS บ่มที่ 24 ชั่วโมง

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

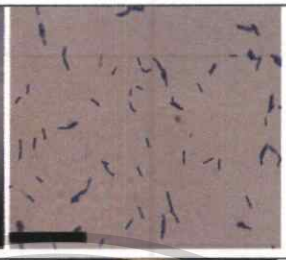
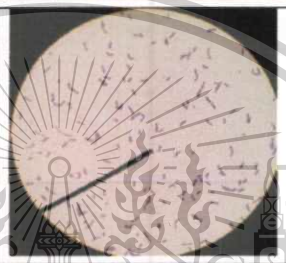
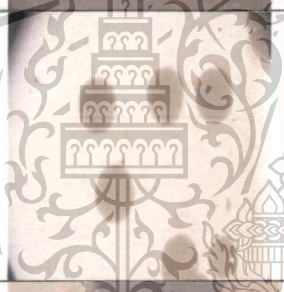
4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อเชื้อจุลินทรีย์โปรไบโอติก รหัส BL BM BP BP2 และ BS

นำเชื้อโปรไบโอติกทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ รหัส BL BM BP BP2 และ BS มาศึกษาลักษณะรูปร่างของเชื้อ ด้วยวิธีย้อมแกรม (ดังแสดงผลในตารางที่ 4.1)

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ตารางที่ 4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อโปรไบโอติก รหัส BL BM BP BP2 และ BS

ชนิดของโปรไบโอติก	ลักษณะโคโลนี	รูปร่างของเซลล์ (1000 เท่า)	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา
เชื้อ BL			-โคโลนี : มีสีขาว ลักษณะกลม โค้งนูน ขอบหยัก มันวาว - รูปร่างเซลล์ : มีลักษณะเป็นท่อน
เชื้อ BM			- โคโลนี : มีสีขาว ลักษณะกลม โค้งนูน ขอบหยัก มันวาว - รูปร่างเซลล์ : มีลักษณะเป็นท่อน
เชื้อ BP			- โคโลนี : มีสีขาว ลักษณะกลม โค้งนูน ขอบเรียบ มันวาว - รูปร่างเซลล์ : มีลักษณะเป็นท่อน
เชื้อ BP2			- โคโลนี : มีสีขาว ลักษณะกลม โค้งนูน ขอบเรียบ - รูปร่างเซลล์ : มีลักษณะเป็นท่อน
เชื้อ BS			- โคโลนี : มีสีขาว ลักษณะกลม แบนราบ ขอบหยัก - รูปร่างเซลล์ : มีลักษณะเป็นท่อน

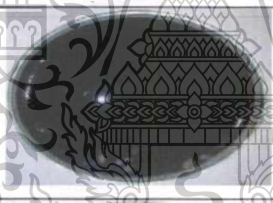
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

4.2 การทดสอบเชื้อโปรไบโอติกในการย่อยแป้ง

นำเชื้อโปรไบโอติก มา streak บนอาหารแข็ง YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นแป้งมันสำปะหลัง บ่ม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทดสอบด้วยสารละลายไอโอดีนลงในจานเพาะเลี้ยง เพื่อตรวจสอบความสามารถในการย่อยแป้งของเชื้อโปรไบโอติก ผลการทดลองที่ได้แสดงในตารางที่ 4.1 ดังต่อไปนี้

ตารางที่ 4.2 ผลการทดสอบความสามารถในการย่อยแป้ง

ชนิดของ	รูปผลการทดลอง	ความสามารถในการย่อยแป้ง
เชื้อ BM		ย่อยแป้งได้
เชื้อ BS		ย่อยแป้งได้
เชื้อ BL		ย่อยแป้งได้เล็กน้อย
เชื้อ BP		ย่อยแป้งได้
เชื้อ BP2		ย่อยแป้งได้

จากตารางที่ 4.2 เชื้อ BM ไม่มีโคโลนีเกิดขึ้นบนผิวหน้าอาหาร และเมื่อทดสอบด้วยสารละลายไอโอดีนลงบนอาหาร สีของอาหารไม่เปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน แสดงว่าเชื้อ BM ไม่มีความสามารถในการย่อยแป้ง เชื้อ BS BL BP และBP2 มีโคโลนีเกิดขึ้นบนอาหาร และเมื่อทดสอบด้วยสารละลายไอโอดีนลงบนอาหาร สีของอาหารบริเวณที่ไม่มีเชื้อเจริญ จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน ส่วนบริเวณที่มีโคโลนีของเชื้อเจริญขึ้น อาหารจะไม่เปลี่ยนสี ซึ่งแสดงว่าเชื้อ BS BL BP และBP2 มีความสามารถในการย่อยแป้งได้

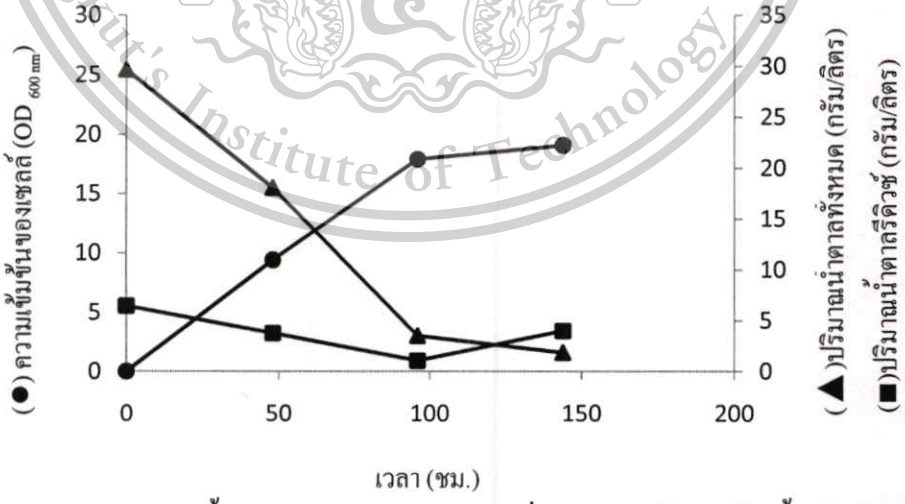
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ในการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

4.3 การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อโปรไบโอติกในอาหารเหลว

4.3.1 การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อโปรไบโอติก ในอาหารเหลว YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำแป้งย่อย

นำเชื้อโปรไบโอติก รหัส BL BM BP BP2 และ BS ที่คัดแยกเชื้อบริสุทธิ์แล้ว ถ่ายเชื้อโปรไบโอติกทั้ง 5 ชนิด ลงหลอดอาหารวุ้นเอียง YM บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อ BM BP และBL มาเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 5 มิลลิลิตร ส่วนเชื้อ BS และ BP2 เติมสารละลาย tween80 ความเข้มข้น 0.3% ลงไปปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วเขย่าจนผสมเป็นเนื้อเดียวกัน นำสารละลายเชื้อโปรไบโอติกแต่ละชนิด ปริมาณ 1% ใส่ในอาหารเหลว YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำแป้งย่อย ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที และเก็บตัวอย่างโดยนำไปวัดค่าความขุ่นของเซลล์ วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และวัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

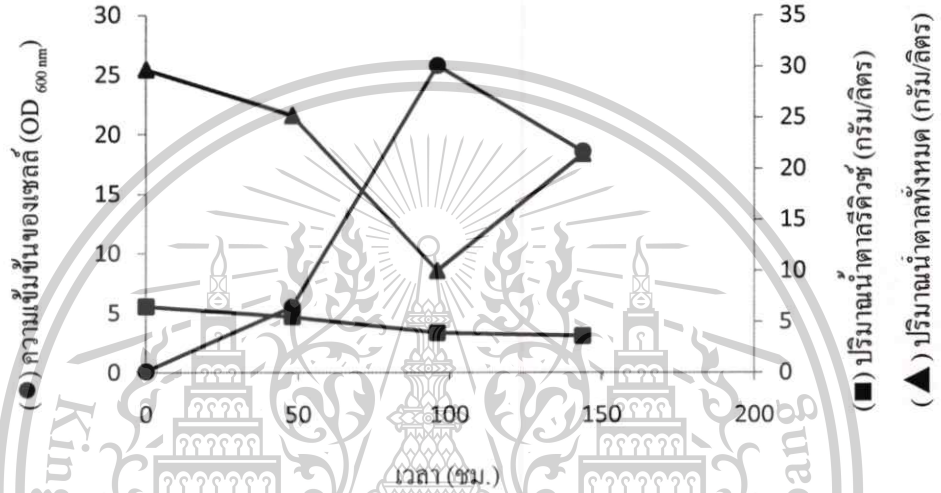
จากรูปที่ 4.1 จากการวัดการเจริญของเชื้อ BM ในอาหารเหลว YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำแป้งย่อย พบว่าชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 48 เชื้อ BM มีการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว จากนั้นมีการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างช้า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์พบว่าชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 96 ลดลงอย่างรวดเร็ว จากนั้นค่อยๆลดลง และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดพบว่าชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 96 ลดลงอย่างรวดเร็ว และคงที่จนกระทั่งสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 4.1 แสดงการเจริญของเชื้อ BM ในอาหารเหลว YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำแป้งย่อย โดยวัดการเปลี่ยนแปลงเซลล์ (●) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (■) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (▲)

เอกสารนี้เป็นการเผยแพร่เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

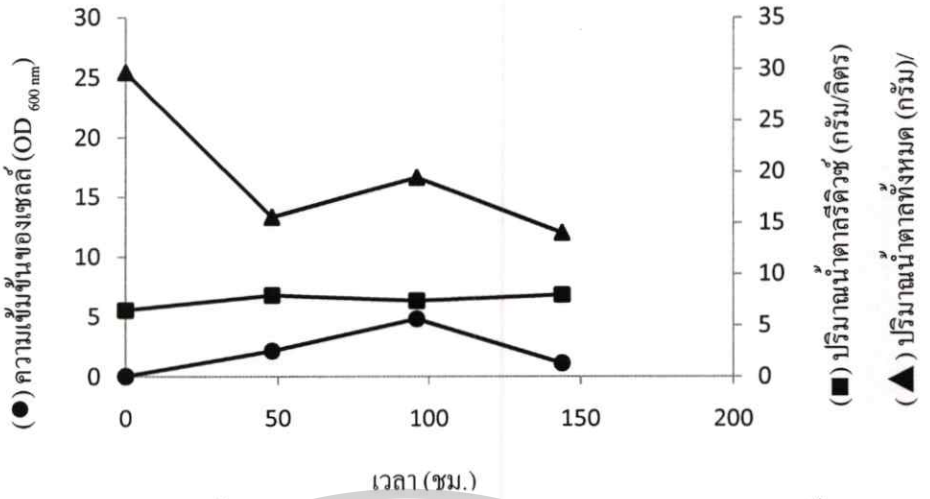
จากรูปที่ 4.2 จากการวัดการเจริญของเชื้อ BP อาหารเหลวดัดแปลงสูตร YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำแป้งย่อย พบว่าชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 96 เชื้อ BP มีการเจริญอย่างรวดเร็ว จากนั้นมีการเจริญคงที่จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์พบว่าชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 96 ลดลงอย่างรวดเร็ว และปริมาณน้ำตาทั้งหมดพบว่าชั่งโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 96 ลดลงอย่างรวดเร็ว จากนั้นสูงขึ้น เนื่องจากเชื้อ BP ชั่วโมงที่ 100-144 เซลล์ลดลง เนื่องจากการตายของเซลล์ อาจทำให้วัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดได้เพิ่มขึ้น



รูปที่ 4.2 แสดงการเจริญของเชื้อ BP ในอาหารเหลว YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำแป้งย่อย โดยวัดการเปลี่ยนแปลงเซลล์ (●) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (■) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (▲)

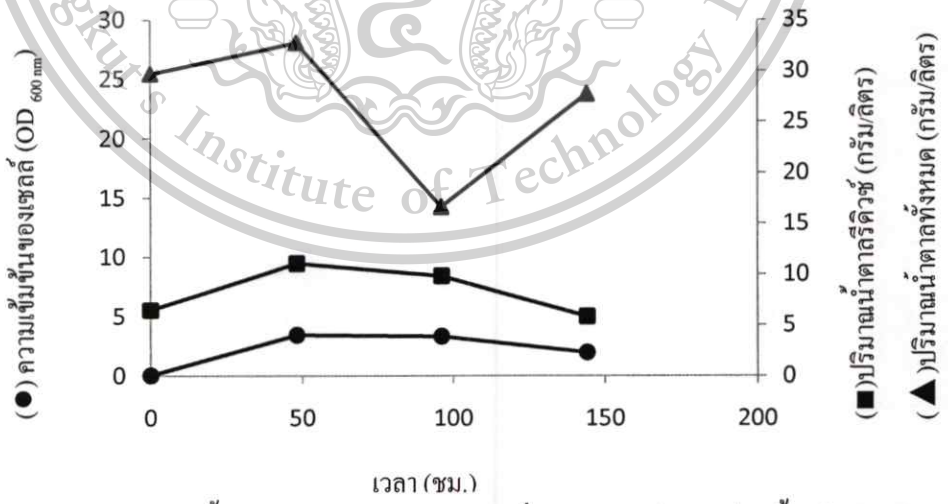
จากรูปที่ 4.3 จากการวัดการเจริญของเชื้อ BP2 อาหารเหลว YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำแป้งย่อย พบว่าชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 96 เชื้อ BP2 มีการเจริญสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว จากนั้นลดลง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์พบว่ามีแนวโน้มสูงขึ้นเรื่อยๆ และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดพบว่าชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 48 ลดลงต่ำสุด จากนั้นเพิ่มขึ้นถึงชั่วโมงที่ 96 จากนั้นลดลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.



รูปที่ 4.3 แสดงการเจริญของเชื้อ BP2 ในอาหารเหลว YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำแป้งย่อย โดยวัดการเปลี่ยนแปลงเซลล์ (●) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (■) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (▲)

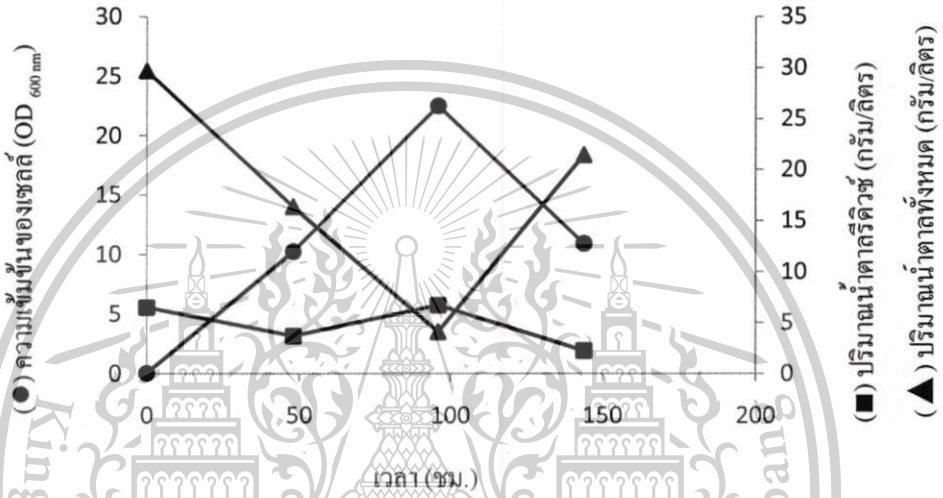
จากรูปที่ 4.4 จากการวัดการเจริญของเชื้อ BS อาหารเหลวดัดแปลงสูตร YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำแป้งย่อย พบว่าชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 48 เชื้อ BS มีการเจริญอย่างรวดเร็ว จากนั้นมีการเจริญคงที่ถึงชั่วโมงที่ 96 จากนั้นค่อยๆลดลง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่าชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 48 มีปริมาณเพิ่มขึ้นจากนั้นลดลง และปริมาณน้ำตาทั้งหมด พบว่าชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 48 มีปริมาณเพิ่มขึ้นจากนั้นลดลงต่ำสุดถึงชั่วโมงที่ 96 จากนั้นเพิ่มขึ้น เนื่องจากเชื้อ BS ชั่วโมงที่ 100-144 เซลล์ลดลง เนื่องจากการตายของเซลล์อาจทำให้วัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดได้เพิ่มขึ้น



รูปที่ 4.4 แสดงการเจริญของเชื้อ BS ในอาหารเหลว YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำแป้งย่อย โดยวัดการเปลี่ยนแปลงเซลล์ (●) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (■) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (▲)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

จากรูปที่ 4.5 จากการวัดการเจริญของเชื้อ BL ในอาหารเหลว YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำแป้งย่อย พบว่าชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 96 เชื้อมีการเจริญอย่างรวดเร็ว จากนั้นมีการเจริญสูงสุดถึงชั่วโมงที่ 96 จากนั้นลดลง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่าชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่46 มีปริมาณลดลง จากนั้นเพิ่มขึ้นจนถึงชั่วโมงที่ 96 จากนั้นมีปริมาณลดลง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด พบว่าชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 96 มีปริมาณลดลง จากนั้นเพิ่มขึ้น เนื่องจากเชื้อ BL ชั่วโมงที่ 100-144 เซลล์ลดลง เนื่องจากการตายของเซลล์อาจทำให้วัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดได้เพิ่มขึ้น



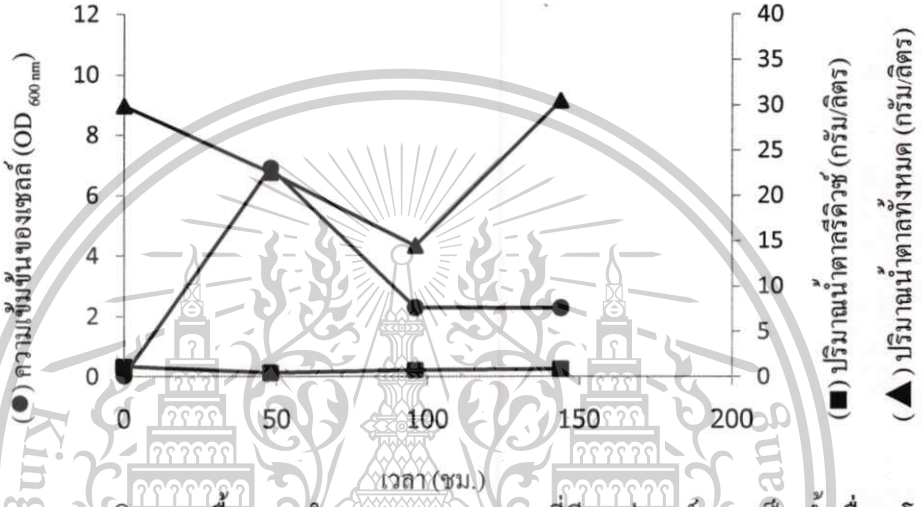
รูปที่ 4.5 แสดงการเจริญของเชื้อ BL ในอาหารเหลว YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำแป้งย่อย โดยวัดการเปลี่ยนแปลงเซลล์ (●) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (■) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (▲)

4.3.2 การศึกษาการเจริญของเชื้อโปรไบโอติก ในอาหารเหลว YM ที่ใช้แหล่งคาร์บอนเป็นเชื่อมจากโรงงาน

นำเชื้อโปรไบโอติก รหัส BL ,BM, BP, BP2 และ BS ที่คัดแยกเชื้อบริสุทธิ์แล้ว ถ่ายเชื้อโปรไบโอติกทั้ง 5 ชนิด ลงหลอดอาหารวุ้นเอียง YM บ่ม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อ BM, BP และBL มาเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 5 มิลลิลิตร ส่วนเชื้อ BS และ BP2 เติมสารละลาย tween80 ความเข้มข้น 0.3% ลงไปปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วเขย่าจนผสมเป็นเนื้อเดียวกัน นำสารละลายเชื้อโปรไบโอติกแต่ละชนิด ปริมาณ 1% ใส่ในอาหารเหลว YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเชื่อม ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มล. แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที และเก็บตัวอย่างเชื้อทุก 48 ชั่วโมง จนครบชั่วโมงที่ 144 เพื่อนำไปวัดค่าความขุ่นของเซลล์ วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และวัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

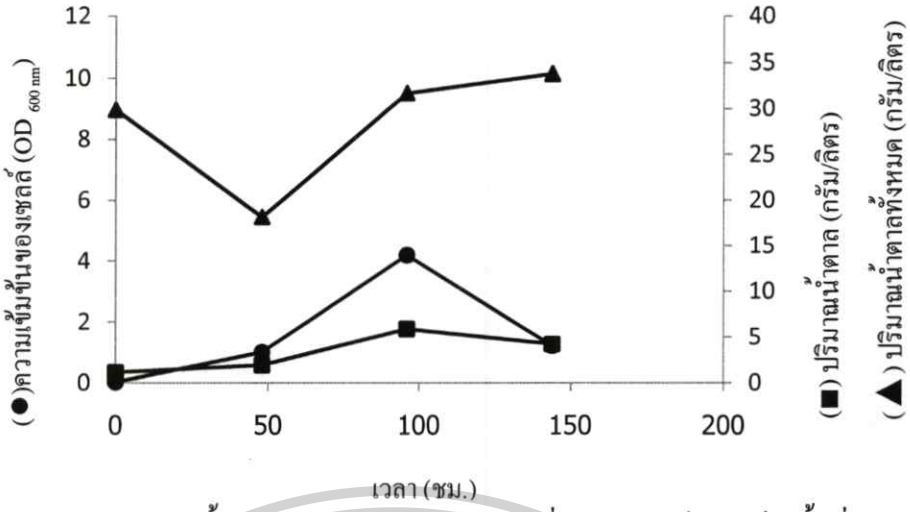
จากรูปที่ 4.6 จากการวัดการเจริญของเชื้อ BM อาหารเหลวดัดแปลงสูตร YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเชื่อม พบว่าชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 48 มีการเจริญอย่างรวดเร็ว จากนั้นมีจากนั้นค่อยๆลดลง จกนั้นมีการเจริญคงที่ไปจนสิ้นสุดการทดลอง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่าชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 96 มีปริมาณสูงขึ้น จากนั้นคงที่ ปริมาณน้ำตาทั้งหมด พบว่าชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 48 มีปริมาณเพิ่มขึ้น จากนั้นลดลงถึงชั่วโมงที่ 96 จากนั้นเพิ่มขึ้น



รูปที่ 4.6 แสดงการเจริญของเชื้อ BM ในอาหารเหลว YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเชื่อม โดยวัดการเปลี่ยนแปลงเซลล์ (●) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (■) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (▲)

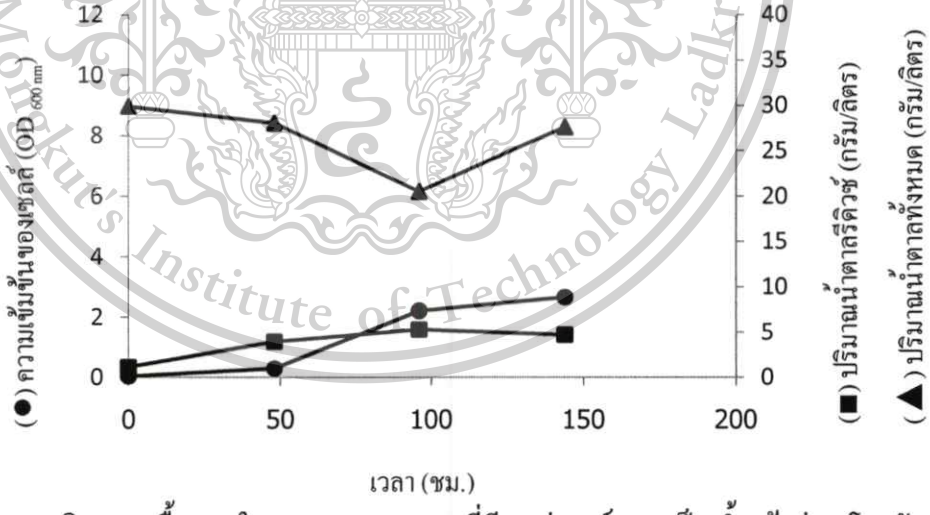
จากรูปที่ 4.7 จากการวัดการเจริญของเชื้อ BP2 YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเชื่อม พบว่าชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 96 มีการเจริญอย่างรวดเร็ว จากนั้นมีการเจริญลดลง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่าชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 96 มีปริมาณสูงขึ้น จากนั้นลดลง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด พบว่าชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 48 มีปริมาณลดลง จากนั้นสูงขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.



รูปที่ 4.7 แสดงการเจริญของเชื้อ BP2 ในอาหารเหลว YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเชื่อม โดยวัดการเปลี่ยนแปลงเซลล์ (●) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (■) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (▲)

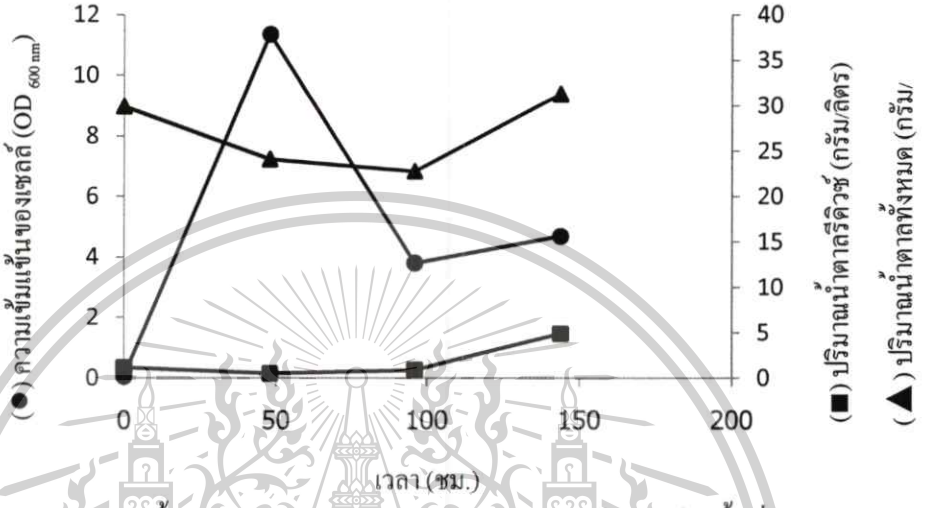
จากรูปที่ 4.8 จากการวัดการเจริญของเชื้อ BS ในอาหารเหลวYM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเชื่อม พบว่าชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 96 เชื้อมีการเจริญอย่างรวดเร็ว จากนั้นคงที่ไปจนสิ้นสุดการทดลอง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่าชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 96 มีปริมาณสูงขึ้น และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด พบว่าชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 96 มีปริมาณลดลง จากนั้นสูงขึ้น



รูปที่ 4.8 แสดงการเจริญของเชื้อ BS ในอาหารเหลว YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำแป้งย่อย โดยวัดการเปลี่ยนแปลงเซลล์ (●) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (■) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (▲)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

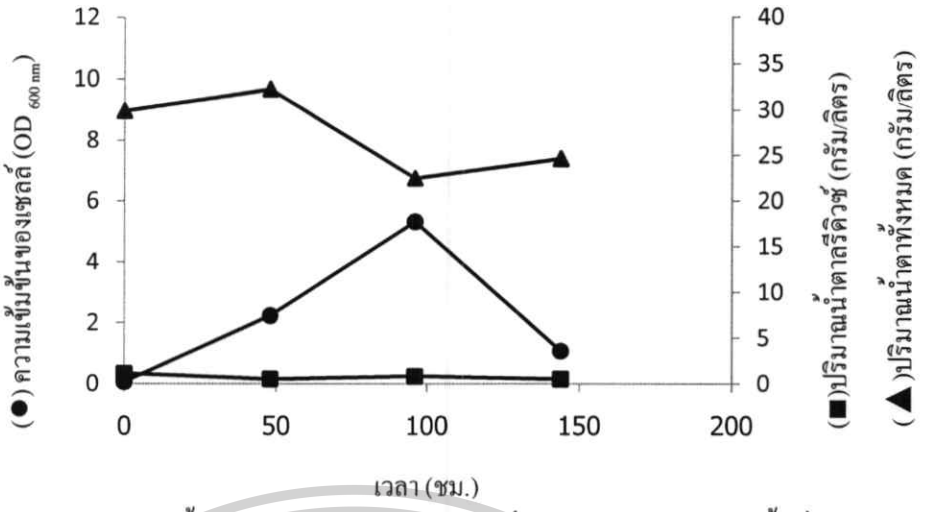
จากรูปที่ 4.9 จากการวัดการเจริญของเชื้อ BL ในอาหารเหลว YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเชื่อม พบว่าชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 48 เชื้อมีการเจริญอย่างรวดเร็ว จากนั้นลดลงถึงชั่วโมงที่ 96 จากนั้นสูงขึ้น ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ มีปริมาณสูงขึ้นเรื่อยๆไปจนสิ้นสุดการทดลอง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด พบว่าชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 96 มีปริมาณลดลงจากนั้นสูงขึ้น



รูปที่ 4.9 แสดงการเจริญของเชื้อ BL ในอาหารเหลว YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเชื่อม โดยวัดการเปลี่ยนแปลงเซลล์ (●) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (■) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (▲)

จากรูปที่ 4.10 จากการวัดการเจริญของเชื้อ BP ในอาหารเหลว YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเชื่อม พบว่าชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 96 เชื้อมีการเจริญอย่างรวดเร็ว จากนั้นลดลง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่ามีปริมาณคงที่ไปจนสิ้นสุดการทดลอง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด พบว่าชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 96 มีปริมาณสูงขึ้นจากนั้นลดลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.



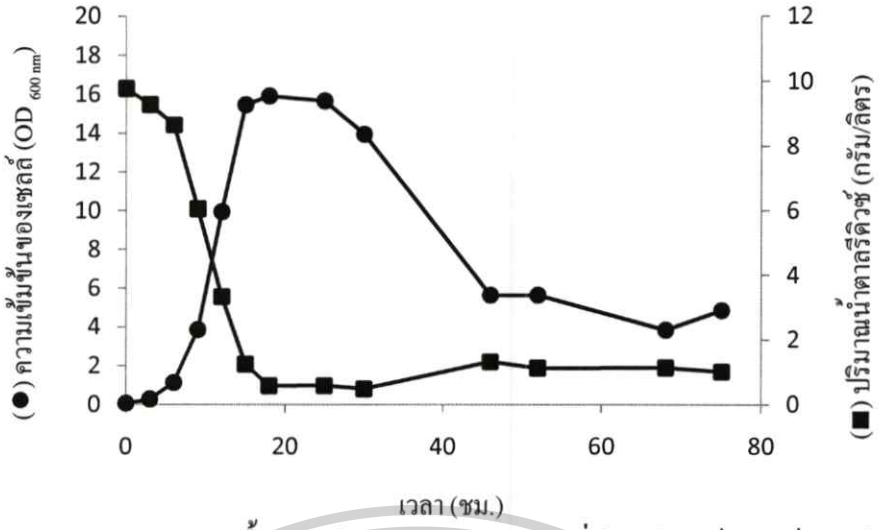
รูปที่ 4.10 แสดงการเจริญของเชื้อ BP ในอาหารเหลว YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเชื่อม โดยวัดการเปลี่ยนแปลงเซลล์ (●) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (■) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (▲)

4.3.3 การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อโปรไบโอติกในอาหารเหลว YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส

นำเชื้อโปรไบโอติก รหัส BL BM BP BP2 และ BS ที่คัดแยกเชื้อบริสุทธิ์แล้ว ถ่ายเชื้อโปรไบโอติกทั้ง 5 ชนิด ลงหลอดอาหารวุ้นเอียง YM บ่ม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อ BM BP และ BL มาเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 5 มิลลิลิตร ส่วนเชื้อ BS และ BP2 เติมสารละลาย tween80 ความเข้มข้น 0.3% ลงไปปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วเขย่าจนผสมเป็นเนื้อเดียวกัน นำสารละลายเชื้อโปรไบโอติกแต่ละชนิด ปริมาณ 1% ใส่ในอาหารเหลว YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มล. แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที และเก็บตัวอย่างเชื้อทุก 48 ชั่วโมง จนครบชั่วโมงที่ 144 เพื่อนำไปวัดค่าความขุ่นของเซลล์ และวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

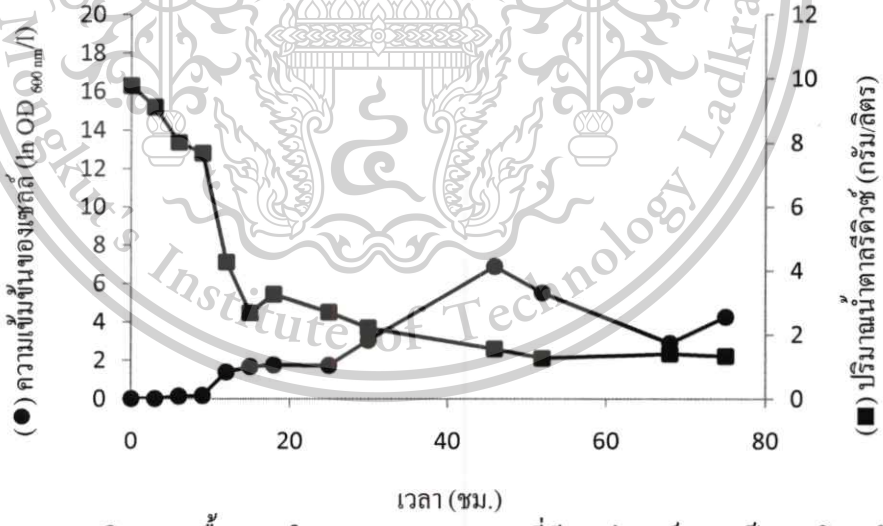
จากรูปที่ 4.11 จากการวัดการเจริญของเชื้อ BM ในอาหารเหลว YM พบว่าชั่วโมงที่ 0 ถึง ชั่วโมงที่18 เชื้อมีการเจริญอย่างรวดเร็ว และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่าชั่วโมงที่ 0 ถึง ชั่วโมงที่18 มีปริมาณลดลงอย่างรวดเร็ว จากนั้นคงที่ไปจนสิ้นสุดการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.



รูปที่ 4.11 แสดงการเจริญของเชื้อ BM ในอาหารเหลว YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส โดยวัดการเปลี่ยนแปลงเซลล์ (●) และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (■)

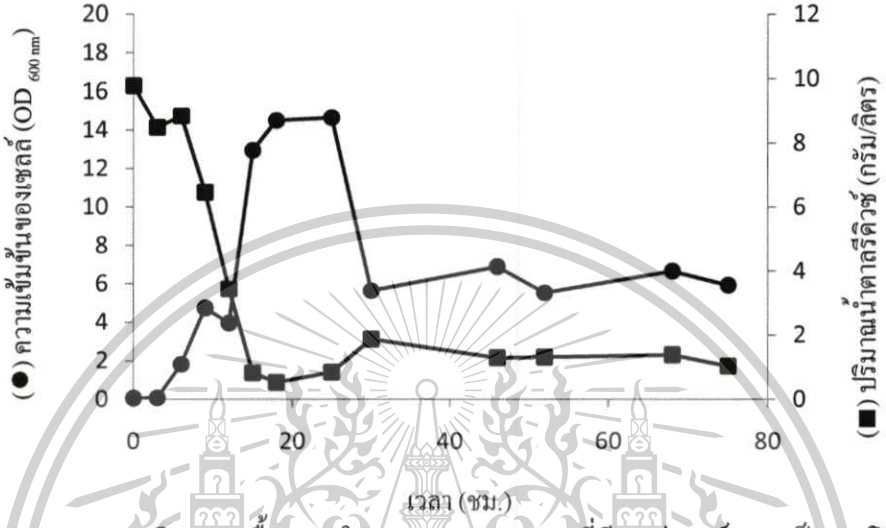
จากรูปที่ 4.12 จากการวัดการเจริญของเชื้อ BS ในอาหารเหลว YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส พบว่าชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 46 เชื้อมีการเจริญอย่างรวดเร็ว และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์พบว่า พบว่าชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 46 มีปริมาณลดลงอย่างรวดเร็ว จากนั้นคงที่ไปจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง



รูปที่ 4.12 แสดงการเจริญของเชื้อ BS ในอาหารเหลว YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส โดยวัดการเปลี่ยนแปลงเซลล์ (●) และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (■)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

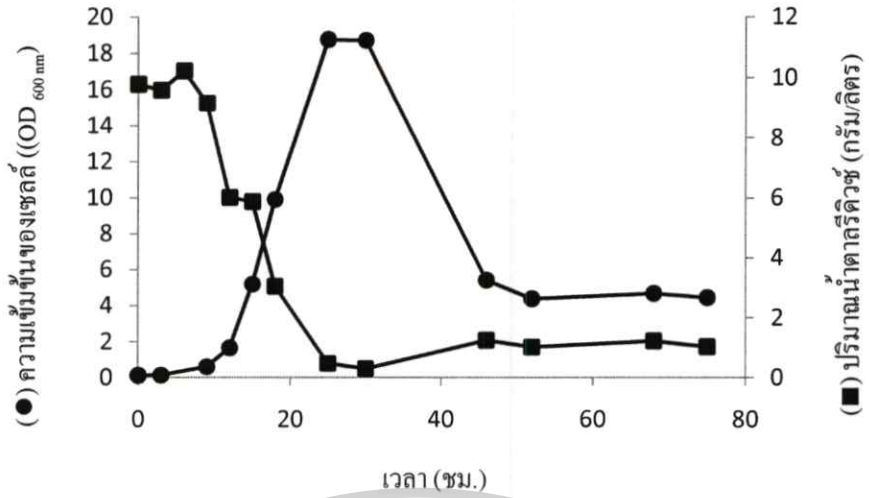
จากรูปที่ 4.13 จากการวัดการเจริญของเชื้อ BL ในอาหารเหลว YMที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส พบว่าชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 18 เชื้อมีการเจริญอย่างรวดเร็ว และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์พบว่า ชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 18 มีปริมาณลดลงอย่างรวดเร็ว จากนั้นคงที่ไปจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง



รูปที่ 4.13 แสดงการเจริญของเชื้อ BL ในอาหารเหลว YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส โดยวัดการเปลี่ยนแปลงเซลล์ (●) และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (■)

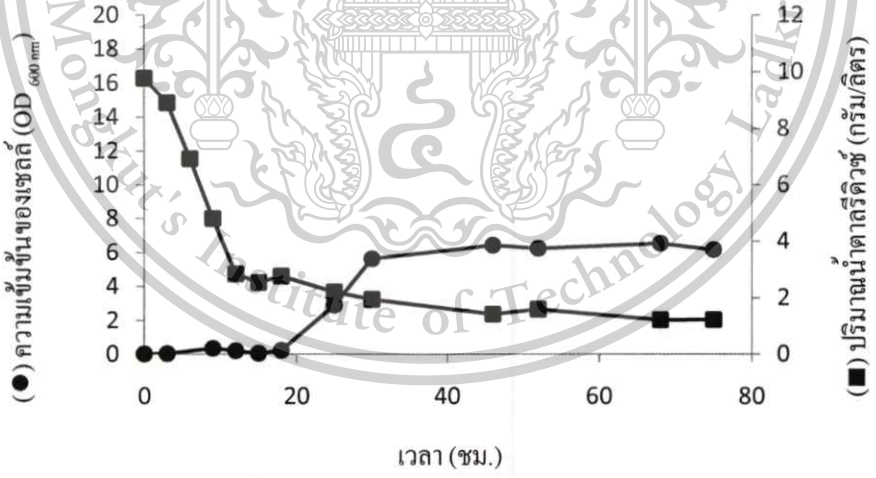
จากรูปที่ 4.14 จากการวัดการเจริญของเชื้อ BP ในอาหารเหลว YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส พบว่าชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 25 เชื้อมีการเจริญอย่างรวดเร็ว และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์พบว่า ชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 25 มีปริมาณลดลงอย่างรวดเร็ว จากนั้นคงที่ไปจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.



รูปที่ 4.14 แสดงการเจริญของเชื้อ BP ในอาหารเหลว YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส โดยวัดการเปลี่ยนแปลงเซลล์ (●) และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (■)

จากรูปที่ 4.15 จากการวัดการเจริญของเชื้อ BP2 ในอาหารเหลวสูตร YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส พบว่าชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 30 เชื้อมีการเจริญอย่างรวดเร็ว และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์พบว่า ชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 30 มีปริมาณลดลงอย่างรวดเร็ว จากนั้นคงที่ไปจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง



รูปที่ 4.15 แสดงการเจริญของเชื้อ BP2 ในอาหารเหลว YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส โดยวัดการเปลี่ยนแปลงเซลล์ (●) และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (■)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

4.3.4 การเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อโปรไบโอติกทั้ง 5 ชนิด ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อโปรไบโอติกทั้ง 5 ชนิด ในอาหารเหลวสูตร YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส อาหารเหลว YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำแป้งย่อย และอาหารเหลว YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเชื่อม จากหัวข้อที่ 4.3.4 4.3.2 และ4.3.3 ตามลำดับ นำมาคำนวณหาค่า μ และ $Y_{x/s}$ เพื่อเปรียบเทียบว่าเชื้อโปรไบโอติกแต่ละชนิด เจริญในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดใดได้ดีที่สุด ผลแสดงในตารางที่ 4.3 ดังต่อไปนี้

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ตารางที่ 4.3 แสดงการเปรียบเทียบ อัตราการเจริญจำเพาะ(μ) และผลได้เซลล์ ($Y_{x/s}$) ของเชื้อโปรไบโอติกทั้ง 5 ชนิด ในอาหารเหลวสูตร YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส อาหารเหลว YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำแป้งย่อย และอาหารเหลว YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเชื่อม

เชื้อโปรไบโอติก	แหล่งคาร์บอน	A_1	A_2	B_1	B_2	C_1	C_2	D_1	D_2	μ	$(Y_{x/s})$
BM	น้ำแป้งย่อย	0	96	0.0041	17.9250	-5.4968	2.8862	29.6588	3.5208	0.0873	0.6856
	น้ำเชื่อมจาก	0	48	0.0320	6.9100	-3.4420	1.9330	29.8788	22.4988	0.1120	0.9320
	กลูโคส	0	18	0.0510	15.9000	-2.9759	2.7663	9.7721	0.5690	**0.3190**	**1.7221**
BS	น้ำแป้งย่อย	0	48	0.0325	0.2905	-3.4265	0.7884	29.6588	20.4788	0.0439	0.2305
	น้ำเชื่อม	0	96	0.0325	2.6600	-3.4265	0.9783	29.8788	27.5588	0.0306	**1.1325**
	กลูโคส	0	46	0.0240	6.8900	-3.7290	1.9301	9.7721	1.5562	**0.1230**	0.8357
BL	น้ำแป้งย่อย	0	96	0.0387	22.5	-3.2519	3.1135	29.6588	4.0548	0.0663	0.8772
	น้ำเชื่อมจาก	0	48	0.0390	11.3350	-3.2442	2.4280	29.8788	24.0788	0.1182	**1.9476**
	กลูโคส	0	18	0.0550	14.5000	-2.9004	2.6741	9.7721	0.5231	**0.3097**	1.5618
BP	น้ำแป้งย่อย	0	96	0.0773	25.7500	-2.5601	3.2484	29.6588	9.9628	0.0605	-1.3034
	น้ำเชื่อม	0	96	0.015	5.3100	-2.5759	1.6696	29.8788	22.4788	0.0484	0.7107
	กลูโคส	0	25	0.1090	18.7500	-2.2164	2.9311	9.7721	0.4674	**0.2059**	**2.0034**
BP2	น้ำแป้งย่อย	0	96	0.0140	4.7800	-4.2687	1.5644	29.6588	19.3988	0.0607	0.4645
	น้ำเชื่อม	0	96	0.0220	4.1800	-3.8167	1.4303	29.8788	31.6788	0.0547	-2.3100
	กลูโคส	0	46	0.0150	6.43	-4.1197	1.8610	9.7721	1.4272	**0.1317**	**0.5758**

หมายเหตุ

A_1 = เวลาเริ่มต้น

A_2 = เวลาที่เชื้อเจริญสูงสุด

B_1 = ค่าความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้น

B_2 = ค่าความเข้มข้นของเชื้อสูงสุด

C_1 = ค่า ln (OD) เริ่มต้น

C_2 = ค่า ln (OD) สูงสุด

D1 = ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเริ่มต้น

D2 = ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เชื้อเจริญสูงสุด

$\mu = \frac{C2-C1}{A2-A1}$ (ต่อชั่วโมง)

$(Y_{x/s}) = \frac{B2-B1}{D2-D1}$ (OD ต่อกรัมสับสเตรท)

King Mongkut's Institute of Technology

จากตารางที่ 4.2 เลี้ยงเชื้อ BM ในอาหารเหลว YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น น้ำแป้งย่อย น้ำเชื่อม และกลูโคส ได้ค่า $Y_{x/s}$ (OD ต่อกรัมสับสเตรท) เท่ากับ 0.6856 0.9320 และ1.7221 ตามลำดับ ได้ค่า μ เท่ากับ 0.0873 0.1120 และ 0.3190 ตามลำดับ โดยเมื่อเปรียบเทียบกันทั้ง 3 แหล่งคาร์บอน พบว่ากลูโคส จะได้ค่า μ และ $Y_{x/s}$ สูงที่สุด

เลี้ยงเชื้อ BS ในอาหารเหลว YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น น้ำแป้งย่อย น้ำเชื่อม และกลูโคส ได้ค่า $Y_{x/s}$ (OD ต่อกรัมสับสเตรท) เท่ากับ 0.2305 1.1325 และ 0.8357 ตามลำดับ ได้ค่า μ เท่ากับ 0.0439 0.0306 และ 0.1230 ตามลำดับ โดยเมื่อเปรียบเทียบกันทั้ง 3 แหล่งคาร์บอนแล้ว พบว่าน้ำเชื่อมจะได้ค่า $Y_{x/s}$ สูงที่สุด และกลูโคสจะได้ค่า μ สูงที่สุด

เลี้ยงเชื้อ BL ในอาหารเหลว YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น น้ำแป้งย่อย น้ำเชื่อม และกลูโคส ได้ค่า $Y_{x/s}$ (OD ต่อกรัมสับสเตรท) เท่ากับ 0.8772 1.9476 และ 1.5618 ตามลำดับ ได้ค่า μ เท่ากับ 0.0663 0.1182 และ 0.3097 ตามลำดับ โดยเมื่อเปรียบเทียบกันทั้ง 3 แหล่งคาร์บอนแล้ว พบว่าน้ำเชื่อมจะได้ค่า $Y_{x/s}$ สูงที่สุด และในแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสจะได้ค่า μ สูงที่สุด

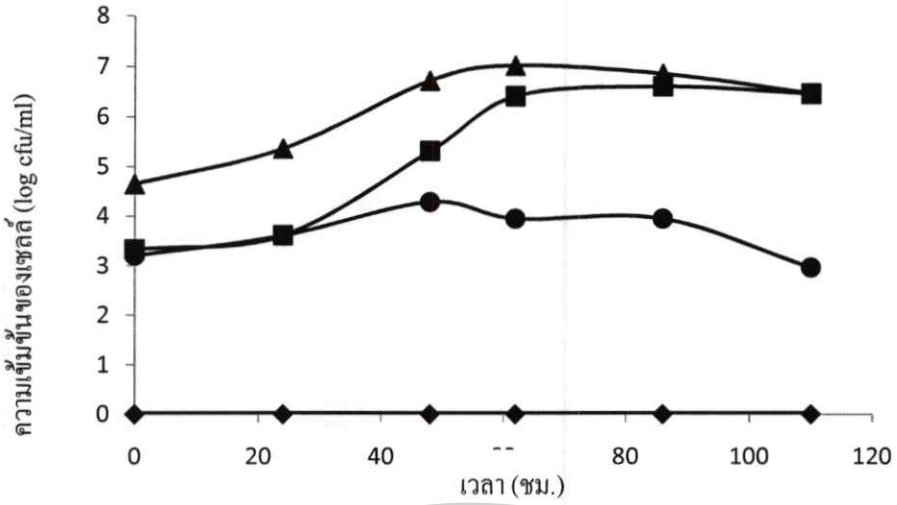
เลี้ยงเชื้อ BP ในอาหารเหลว YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น น้ำแป้งย่อย น้ำเชื่อม และกลูโคส ได้ค่า $Y_{x/s}$ (OD ต่อกรัมสับสเตรท) เท่ากับ -1.3031 0.7107 และ 2.0034 ตามลำดับ ได้ค่า μ เท่ากับ 0.0605 0.0484 และ 0.2059 ตามลำดับ โดยเมื่อเปรียบเทียบกันทั้ง 3 แหล่งคาร์บอนแล้ว พบว่า กลูโคสจะได้ค่า $Y_{x/s}$ และ μ สูงที่สุด

เลี้ยงเชื้อ BP2 ในอาหารเหลว YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น น้ำแป้งย่อย น้ำเชื่อม และกลูโคส ได้ค่า $Y_{x/s}$ (OD ต่อกรัมสับสเตรท) เท่ากับ 0.4645 -2.3100 และ 0.5758 ตามลำดับ ได้ค่า μ เท่ากับ 0.0607 0.0547และ 0.1317ตามลำดับ โดยเมื่อเปรียบเทียบกันทั้ง 3 แหล่งคาร์บอนแล้ว กลูโคสจะได้ค่า $Y_{x/s}$ และ μ สูงที่สุด

4.4 การศึกษาผลกระทบของเชื้อโปรไบโอติกที่มีต่อเชื้อ *V. parahaemolyticus*

นำเชื้อโปรไบโอติกผสมมาเลี้ยงรวมกันกับเชื้อ *V. parahaemolyticus* ซึ่งเลี้ยงในอาหารผสมที่มีความเข้มข้นของเกลือ 0.5% โดยให้เป็นชุดทดลองเชื้อผสม ส่วนชุดควบคุมเชื้อโปรไบโอติก จะเลี้ยงเชื้อโปรไบโอติกผสม ในอาหารเหลว YM มีความเข้มข้นของเกลือ 0.5% และชุดควบคุมเชื้อ *V. parahaemolyticus* จะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว LB ที่มีความเข้มข้นของเกลือ 0.5% นำมานับจำนวนโคโลนีด้วยวิธี spread plate โดยนับเชื้อโปรไบโอติกบนอาหารแข็ง YM นับเชื้อ *V. parahaemolyticus* บนอาหารแข็ง TCBS โดยเก็บผลทุก 24 ชั่วโมง แสดงผลดังภาพต่อไปนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.



รูปที่ 4.16 แสดงการเจริญของเชื้อกลุ่มทดลอง คือ โปรไบโอติกที่เลี้ยงรวมกันกับเชื้อ *V.parahaemolyticus* (◆)และกลุ่มควบคุมคือโปรไบโอติกที่เลี้ยงเดี่ยวๆ (■) และ *V.parahaemolyticus* (●)ที่เลี้ยงเดี่ยวๆ

จากรูปที่ 4.16 จากการทดลองพบว่า ชุดทดลองเชื้อผสม เมื่อนำมานับจำนวนโคโลนีของเชื้อโปรไบโอติกพบว่ามีการเจริญได้ดีกว่ากลุ่มควบคุมเชื้อโปรไบโอติก และเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในชุดทดลองเชื้อผสมไม่มีการเจริญ แต่กลุ่มควบคุม เชื้อ *V. parahaemolyticus* เจริญดี แสดงให้เห็นว่าเชื้อโปรไบโอติกมีผลยับยั้งเชื้อ *V. parahaemolyticus*

จากการทดลองของ Khannita และ Tipparat (2011) ได้ทำการทดสอบผลกระทบของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* MRO 3.12 ต่อเชื้อ *Vibrio harveyi* โดยการเลี้ยงรวมกันในอาหารผสมระหว่างอาหารเหลว MRS และอาหารเหลว TSB ปริมาณเชื้อละ 10^5 CFU/ml โดยให้เป็นกลุ่มทดลอง เลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* MRO 3.12 ในอาหารเหลว TSB และเลี้ยงเชื้อ *V. harveyi* ในอาหารเหลว TSBโดยให้เป็นกลุ่มควบคุม ผลการทดลองพบว่า *L. plantarum* MRO 3.12 เริ่มยับยั้งเชื้อ*V. harveyi* ในชั่วโมงที่ 18 และยับยั้งสมบูรณ์ภายใน 24 ชั่วโมง ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าเชื้อโปรไบโอติก มีผลในการยับยั้งเชื้อ *Vibrio* spp. ที่ก่อให้เกิดโรคในกุ้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

บทที่ 5

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อโปรไบโอติกทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ รหัส BL ,BM, BP, BP2 และ BS โดยนำมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง YM พบว่าเชื้อรหัส BL มีรูปร่างเซลล์เป็นท่อน ติดสีแกรมบวก มีโคโลนีสีขาว ลักษณะกลม โค้งนูน ขอบหยัก มันวาว เชื้อรหัส BM มีรูปร่างเซลล์เป็นท่อน ติดสีแกรมบวก มีโคโลนีสีขาว ลักษณะกลม โค้งนูน ขอบหยัก มันวาว เชื้อรหัส BP มีรูปร่างเซลล์เป็นท่อน ติดสีแกรมบวก มีโคโลนีสีขาว ลักษณะกลม โค้งนูน ขอบเรียบ มันวาว เชื้อรหัส BP2 มีรูปร่างเซลล์เป็นท่อน ติดสีแกรมบวก มีโคโลนีสีขาว ลักษณะกลม โค้งนูน ขอบเรียบ และเชื้อรหัส BS มีรูปร่างเซลล์เป็นท่อน ติดสีแกรมบวก มีโคโลนีสีขาว ลักษณะกลม แบนราบ ขอบหยัก

การเจริญของเชื้อโปรไบโอติกในอาหารแข็ง YM ที่ใช้แหล่งคาร์บอนเป็นแป้งมันสำปะหลัง พบว่าเชื้อ BM ไม่เจริญเป็นโคโลนีเกิดขึ้นบนผิวหน้าอาหาร และเมื่อทดสอบด้วยสารละลายไอโอดีนบนอาหารแข็ง พบว่าสีของอาหารไม่เปลี่ยนแปลง แสดงว่าเชื้อ BM ไม่สามารถเจริญ และย่อยแป้ง ส่วนเชื้อโปรไบโอติก BS BL BP และ BP2 สามารถเจริญเป็นโคโลนีบนอาหารแข็ง YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นแป้งมันสำปะหลัง และเมื่อทดสอบด้วยสารละลายไอโอดีน พบว่าบริเวณใสรอบๆ โคโลนีของเชื้อโปรไบโอติก แสดงว่าเชื้อโปรไบโอติกรหัส BS BL BP และBP2 มีความสามารถในการเจริญ และใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนได้

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อโปรไบโอติกทั้ง 5 ชนิด ในอาหารเหลวสูตร YM แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำแป้งย่อย น้ำเชื่อม และกลูโคส พบว่าเชื้อ BM เจริญในอาหารเหลว YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส จะได้ค่า μ และ $Y_{x/s}$ สูงที่สุด เชื้อ BS พบว่าในอาหารเหลว YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเชื่อมจะได้ค่า $Y_{x/s}$ สูงที่สุด และแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสจะได้ค่า μ สูงที่สุด เชื้อ BL ในอาหารเหลว YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเชื่อมจะได้ค่า $Y_{x/s}$ สูงที่สุด และในแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสจะได้ค่า μ สูงที่สุด เชื้อ BP ในอาหารเหลว YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสจะได้ค่า $Y_{x/s}$ และ μ สูงที่สุด และเชื้อ BP2 ในอาหารเหลว YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสจะได้ค่า $Y_{x/s}$ และ μ สูงที่สุด

ผลกระทบของเชื้อโปรไบโอติกที่มีต่อเชื้อ *V. parahaemolyticus* โดยการเลี้ยงร่วมกัน ซึ่งทดสอบโดยเลี้ยงเชื้อโปรไบโอติก ร่วมกับ *V. parahaemolyticus* (กลุ่มทดลองเชื้อผสม) เลี้ยงเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

โปรไบโอติก แบบเดี่ยวๆ (กลุ่มควบคุมเชื้อโปรไบโอติก) และเลี้ยงเชื้อ *V. parahaemolyticus* แบบเดี่ยวๆ (กลุ่มควบคุม *V. parahaemolyticus*) พบว่ากลุ่มทดลองเชื้อผสม มีการเจริญของเชื้อโปรไบโอติกดีกว่ากลุ่มควบคุม และเชื้อ *V. parahaemolyticus* ไม่มีการเจริญเติบโต แต่กลุ่มควบคุมเจริญเติบโตดี แสดงให้เห็นว่าเชื้อโปรไบโอติกมีผลยับยั้งเชื้อ *V. parahaemolyticus*

ข้อเสนอแนะ

การทดลองเลี้ยงเชื้อโปรไบโอติกทั้ง 5 ชนิด เพื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตในอาหารเหลวสูตร YM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำแป้งย่อย น้ำเชื่อม และกลูโคส ควรเลี้ยงในสภาวะเดียวกัน ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนปริมาณเท่ากัน และเก็บตัวอย่างทุกๆ 3 ชั่วโมง ในอาหารทั้ง 3 ชนิด

การทดสอบการศึกษาผลกระทบของเชื้อโปรไบโอติกที่มีต่อเชื้อ *V. parahaemolyticus* อาหารชุดทดลอง และอาหารชุดควบคุม ควรเป็นอาหารชนิดเดียวกัน และควบคุม pH ให้มีค่าเท่ากัน

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

เอกสารอ้างอิง

กิจจา อุไรรงค์, ธวัชชัย ศักดิ์ภู่อร่าม, วรวิทย์ วัชชวัลคุ และ ปรียพันธุ์ อุดมประเสริฐ. 2537. การควบคุม และป้องกันโรคที่สำคัญในประเทศไทย. กรุงเทพฯ: คณะสัตวแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน. 273 น.

กรมศุลกากร, 2551 , สถิติการนำเข้า - ส่งออก: HS 030613 www customs go th /สถิติ/ index . jsp

ชลอ ลิ้มสุวรรณ. 2533. การป้องกันและรักษาโรคกุ้ง. เอกสารประกอบการสอน วิชาชีววิทยาประมง 332. ภาควิชาชีววิทยาประมง. คณะประมง., มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปาจรีย์ จือเหลียง, ชลอ ลิ้มสุวรรณ, นิติ ชูเชิด, วัชริยา ภูรีวิโรจน์กุล และ พรเลิศ จันทร์รัชชกูล. 2554. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ครั้งที่ 49: สาขาประมง. กรุงเทพฯ, หน้า 27-34 (553 หน้า)

มนฑกานต์ สมบรูณ์, ชลอ ลิ้มสุวรรณ, นิติ ชูเชิด และ พรเลิศ จันทร์รัชชกูล. 2547. ผลของการใช้จุลินทรีย์กลุ่ม *Bacillus* ที่แตกต่างกัน 3 กลุ่มต่อแบคทีเรียวิบริโอ (*Vibrio* spp.). คุณภาพน้ำและอัตรารอดตายในการอนุบาลลูกกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*). ใน รายงานการประชุมวิชาการ. ครั้งที่ 47 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. เล่มที่ 4. สาขาประมง. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ยุทธพล คงกระจ่าง และ นงนุช เฉาะวิสุทธิ์ 2554. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 49. สาขาประมง. กรุงเทพฯ, หน้า 400-407 (553 หน้า)

สถาบันอาหาร. 2548 . ภาวะการผลิตกุ้งของประเทศไทย ระบบจัดการการเพาะเลี้ยงกุ้ง.วารสารสถาบันอาหาร: 4-5

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2551 ข้อมูลพื้นฐานเศรษฐกิจการเกษตรปี 2551 88-89 .

Balcazar, J.L., T. Rojas-Luna and D. Cunningham. 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.

Cabello F.C. 2006 Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment.Environmental Microbiology 8,1137–1144.

Fuller, R. 1989. Probiotic in man and animal. J. Appl. Bacteriol. 66: 365-378.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

เอกสารอ้างอิง(ต่อ)

Graslund S. and Bengtsson B.E. 2001 Chemical and biological products used in South-East Asia shrimp farming, and their potential impact on the environment – a review.Science of the Total Environment 280,93–131

Inglis, V., R.J. Roberts and N.R. Bromage. 1993. Bacterial Diseases of Fish. Institute of Aquaculture. The university press, cambridge.

Lee, J.V. 1990. Vibrio, aeromonas and plesiomonas In: Parker, M.T. and Duerden, B.I.. (eds.). Principles of Bacteriology, Virology and Immunity, 8th ed. Vol II. p. 514-527 Philadephia: BC Decke

Nicolas J.L., Robic E. and Ansquer D. 1989 Bacterial flora associated with a trophic chain consisting of microalgae, rotifers and turbot larvae: influence of bacteria on larval survival. Aquaculture 83,237–248

Rengpipat S., Rukpratanporn S., Piyatiratitivorakul S. and Menasveta P. 1998 Probiotics in aquaculture: a case study of probiotics for larvae of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). In: Advances in Shrimp Biotechnology (ed. by T.W.Flegel), pp. 177–181. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok.

Sissons, J.W. 1989. Potential of probiotic organisms to prevent diarrhea and promote digestion in farm animals. J. Sci. Food. Agri. 49; 1-13.

Salminen S, Bouley C, Boutron-Ruault MC, Cummings JH, Franck A, Gibson GR, Isolauri E, Moreau MC, Roberfroid M. and Rowland I. 1998. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. Br J Nutr Aug; 80 Suppl 1:S147-71

Tournut, J. 1989. Applications of probiotics to animal husbandry. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 8: 551-566.

Tanasomwang, V., Nakai, T., Nishimura, Y.and Muroga, K. 1998. Vibrio-inhibiting marine bacteria isolated from black tiger shrimp hatchery. Fish Pathol. 33 (5): 459-466

Wilkenfeld J. 1992 Commercial hatchery status report: an industry panel viewpoint. In: Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming (ed. by J. Wyban), pp. 71–86. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

เอกสารอ้างอิง(ต่อ)

[online].Available:ศูนย์วิจัย และพัฒนาชายฝั่งเพรชบุรี การเพราะเลี้ยงกุ้งทะเล http://www.fisheries.go.th/cf-phetchaburi/index.php?option=com_content&view=article&id=51&Itemid=82

[online].Available: คุณภาพน้ำในการเลี้ยงกุ้งขาว, 2012 http://www.mario-bp.com/498407/คุณภาพน้ำในการเลี้ยงกุ้งขาว

[online].Available : การเลี้ยงกุ้งก้ามกราม, 2010 http://blog.taradkaset.com/การเลี้ยงกุ้งก้ามกราม/

[online].Available : Shrimp an important message about shrimp, 2003 http://www.whfoods.com/genpage.php? tname=foodspice&dbid=107

[online].Available : อุตสาหกรรมกุ้งไทย ปี 2554 และแนวโน้ม ดร.สมศักดิ์ ปณีตัธยาศัย นายกสมาคมกุ้งไทย http://www.thaichamber.org/userfiles/file/7(1).pdf

[online].Available : ดัชนีบทความ โปรไบโอติก ใช้ให้เป็นก็เป็นประโยชน์ ,2013 http://eastasiaaquaculture.com/index.php?option=com_content&view=article&id=61:2012-05-01-06-10-33&catid=35:2012-05-01-06-03-22&Itemid=196

[online].Available : สถาบันวิจัย และพัฒนากุ้งทะเล http://www.coastalaqua.com/thaiqualityshrimp/index.php/technology/shrimp-farm-development/biological-systems

[online].Available : โรคกุ้งที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย.http://www.farmrachan.com/shrimpknowledge/โรคกุ้งที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย.html

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ภาคผนวก ก

การเตรียมเชื้อ และอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. การเตรียมสารละลายเชื้อ

1.1 เตรียมสารละลายบริสุทธิ์เชื้อโปรไบโอติก

1.1.1 ทำการ streak เชื้อโปรไบโอติก บนหลอดอาหารวุ้นเอียง YM บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.1.2 นำเชื้อ BM BP และ BL มาเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ส่วนเชื้อ BS และ BP2 เติมสารละลาย tween80 ความเข้มข้น 0.3% ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เป็นสารละลายผสม

1.1.2 ถ่ายสารละลายเชื้อโปรไบโอติกแต่ละชนิดลงสู่หลอดทดลองปลอดเชื้อ เพื่อใช้ในการทดลอง

1.2 เตรียมสารละลายเชื้อผสมโปรไบโอติก

1.2.1 นำสารละลายบริสุทธิ์เชื้อโปรไบโอติก ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เลี้ยงในอาหารเหลว YM ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที โดยเชื้อ BM BS BL BP และ BP2 เก็บเชื้อที่เวลา 12 12 15 18 และ25 ตามลำดับ

1.2.2 นำเชื้อแต่ละชนิดไปวัดค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ปรับค่าความขุ่นของเซลล์ให้มีค่าเท่ากันด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ จากนั้นนำเชื้อทั้ง 5 ชนิด ผสมกันในอัตราส่วน 1:1

1.3 เตรียมสารละลายเชื้อ *V. parahaemolyticus*

1.3.1 ทำการ streak เชื้อ *V. parahaemolyticus* บนหลอดอาหารวุ้นเอียง LB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

1.3.2 ใช้ลูปแตะเชื้อมา 1 ลูป เลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

1.3.3 นำสารละลายเชื้อไปวัดความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ปรับค่าความขุ่นของเซลล์ให้มีค่าเท่ากับสารละลายเชื้อโปรไบโอติกด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ จากนั้นนำเชื้อไปใช้ในการทดลอง ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำการทดลอง

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1 Yeast Malt Medium (YM) Agar ประกอบด้วย

Yeast extract	3	กรัมต่อลิตร
Malt extract	3	กรัมต่อลิตร
Peptone	5	กรัมต่อลิตร
Glucose	10	กรัมต่อลิตร
Agar	15	กรัมต่อลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 15 นาที

2.2 Yeast Malt Medium (YM) Broth ประกอบด้วย

Yeast extract	3	กรัมต่อลิตร
Malt extract	3	กรัมต่อลิตร
Peptone	5	กรัมต่อลิตร
Glucose	10	กรัมต่อลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 15 นาที

2.3 Luria-Bertani (LB) Agar ประกอบด้วย

Tryptone	10	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	5	กรัมต่อลิตร
NaCl	5	กรัมต่อลิตร
Agar	15	กรัมต่อลิตร

ปรับความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีค่าเท่ากับ pH 7.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

2.4 Luria-Bertani (LB) broth ประกอบด้วย

Tryptone	10	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	5	กรัมต่อลิตร
NaCl	5	กรัมต่อลิตร

ปรับความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีค่าเท่ากับ pH 7.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 15 นาที

2.5 อาหารดัดแปลง Luria-Bertani (LB) broth ผสม Yeast Malt Medium (YM) Broth ที่มีความเข้มข้นของเกลือ 5%

LB broth

Tryptone	10	กรัมต่อ 500 มิลลิลิตร
Yeast extract	15	กรัมต่อ500 มิลลิลิตร
NaCl	2.5	กรัมต่อ500 มิลลิลิตร

YM broth

Yeast extract	3	กรัมต่อ500 มิลลิลิตร
Malt extract	3	กรัมต่อ500 มิลลิลิตร
Peptone	5	กรัมต่อ500 มิลลิลิตร
Glucose	10	กรัมต่อ500 มิลลิลิตร

แยกนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำมาเทรวมกันในสภาวะปลอดเชื้อ

2.6 อาหารดัดแปลง Yeast Malt Medium (YM) Broth ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำแป้งย่อย ประกอบด้วย

Yeast extract	3	กรัมต่อลิตร
Malt extract	3	กรัมต่อลิตร
Peptone	5	กรัมต่อลิตร
น้ำแป้งย่อย	30	กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 15 นาที

*** **หมายเหตุ** น้ำแป้งย่อย 1 ลิตร มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 350.20 กรัม และมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 72.10 กรัม

2.7 อาหารดัดแปลง Yeast Malt Medium (YM) Broth ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำน้ำเชื่อม ประกอบด้วย

Yeast extract	3	กรัมต่อลิตร
Malt extract	3	กรัมต่อลิตร
Peptone	5	กรัมต่อลิตร
น้ำเชื่อมจากโรงงาน	30	กรัมต่อลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 15 นาที

*** **หมายเหตุ** น้ำแป้งย่อย 1 ลิตร มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 186.80 กรัม และมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 7.24 กรัม

2.8 สูตรอาหาร Yeast Malt Medium (YM) Broth ที่มีความเข้มข้นของเกลือ 5%

Yeast extract	3	กรัมต่อลิตร
Malt extract	3	กรัมต่อลิตร
Peptone	5	กรัมต่อลิตร
Glucose	10	กรัมต่อลิตร
NaCl	2.5	กรัมต่อลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 15 นาที

2.9 อาหารดัดแปลง Luria-Bertani (LB) broth ที่มีความเข้มข้นของเกลือ 5%

Tryptone	10	กรัมต่อ 500 มิลลิลิตร
Yeast extract	15	กรัมต่อ500 มิลลิลิตร
NaCl	2.5	กรัมต่อ500 มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

2.10 อาหารดัดแปลง Yeast Malt Medium (YM) Broth ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นแป้งมันสำปะหลัง ประกอบด้วย

Yeast extract	3	กรัมต่อลิตร
Malt extract	3	กรัมต่อลิตร
Peptone	5	กรัมต่อลิตร
แป้งมันสำปะหลัง	10	กรัมต่อลิตร
Agar	15	กรัมต่อลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 15 นาที

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ภาคผนวก ข

สารเคมีและวิธีวิเคราะห์

1. สารเคมี

1.1 การเตรียมสารละลายมาตราฐานกลูโคส

1.1.1 ชั่งกลูโคสมาตราฐาน 1 กรัม นำมาอบที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

1.1.2 นำมาละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางให้มี ความเข้มข้นเป็น 200 µg/ 100 ml

1.1.3 ปิเปต 1 มิลลิลิตรเจือจางให้มีความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในน้ำกลั่น บรรจุในหลอดทดสอบหลอดละ 1.0 มิลลิลิตร

1.2 การเตรียมน้ำแป้งย่อยด้วยเอนไซม์ Termanyl

1.2.1 ชั่งแป้ง 30 กรัม ละลายน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

1.2.2 ให้ความร้อนโดยตั้งบนเครื่อง Metertic sterer จนมีอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียล

1.2.3 เติมเอนไซม์ termanyl ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร

1.2.4 ให้ความร้อนจนอุณหภูมิคงที่ กวนให้เข้ากันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำแป้งย่อย ประกอบไปด้วยปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 341.2 กรัม/ลิตร และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 72.1 กรัม/ลิตร

1.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบน้ำเชื่อมจากโรงงาน

การวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำเชื่อม ประกอบไปด้วยปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 186.8 กรัม/ลิตร และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 7.2 กรัม/ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

1.4 การเตรียมสารละลาย Copper reagent

1.3.1 ละลาย Na2HPO4.12H2O 71.0 กรัม และโปรแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรต 40.0 กรัม ในน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร

1.3.2 เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1.0 นอร์มอล จำนวน 100 มิลลิลิตร ตามด้วยสารละลาย CuSO4.5H2O ความเข้มข้นร้อยละ 10.0 นอร์มอล จำนวน 80 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน ทำให้ร้อน

1.3.3 เติมโซเดียมซัลเฟต 180.0 กรัม ละลายให้เข้ากันแล้วเติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1.0 ลิตร เก็บในขวดสีชา ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ถ้ามีตะกอนกรองออกก่อนนำไปใช้

1.5 การเตรียมสารละลาย Nelson reagent

1.4.1 ละลาย $(NH_4)6Mo_7O_{24}.4H_2O$ 50 กรัม ในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร1.4.2 เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 21 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน

1.4.2 เติม $AsHNa_2O_4.7H_2O$ 6 กรัม ซึ่งละลายในน้ำกลั่นลงไป คนให้เข้ากัน เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ้ามีตะกอนกรองก่อนนำมาใช้

2. วิธีวิเคราะห์

2.1 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) โดยวิธี Somogyi-Nelson (ตามวิธีของ Nelson , 1994)

2.1.1 เตรียมสารละลายมาตราฐานของน้ำตาลกลูโคส โดยอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียล ประมาณ 1-2 ชั่วโมง ความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80, 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในน้ำกลั่น บรรจุในหลอดทดสอบหลอดละ 1.0 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ

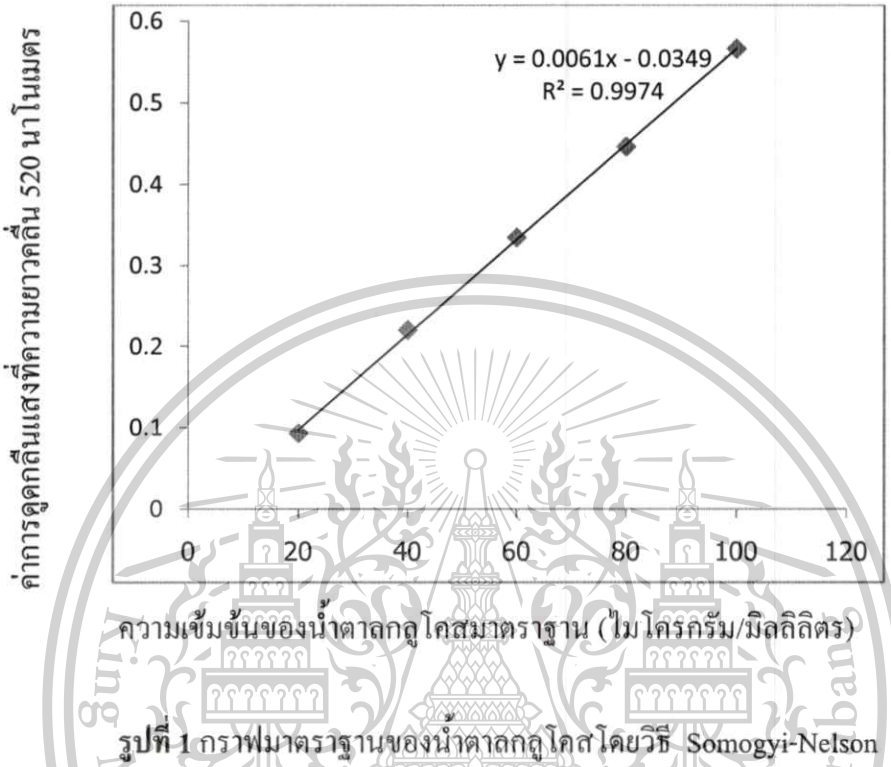
2.1.2 เติม Copper reagent 1.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยทำให้น้ำเย็นจัด

2.1.3 เติม Nelson reagent 1.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทันที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที

2.1.4 เติมน้ำกลั่น 5.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลกลูโคส และค่าการดูดกลืนแสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

2.1.5 การวิเคราะห์ตัวอย่าง ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างที่มีน้ำตาลกลูโคส จำนวน 1.0 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดสอบ แล้วนำไปวิเคราะห์ตามวิธีการ เตรียมกราฟมาตราฐานของน้ำตาลกลูโคสข้างต้น



รูปที่ 1 กราฟมาตราฐานของน้ำตาลกลูโคสโดยวิธี Somogyi-Nelson

2.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar)โดยวิธี ฟีนอล-ซัลฟูริก (ตามวิธีของ Nelson , 1956)

2.2.1 เตรียมสารละลายมาตราฐานของน้ำตาลกลูโคส โดยอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียล ประมาณ 1-2 ชั่วโมง ความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80, 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในน้ำกลั่น บรรจุในหลอดทดสอบหลอดละ 1.0 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ

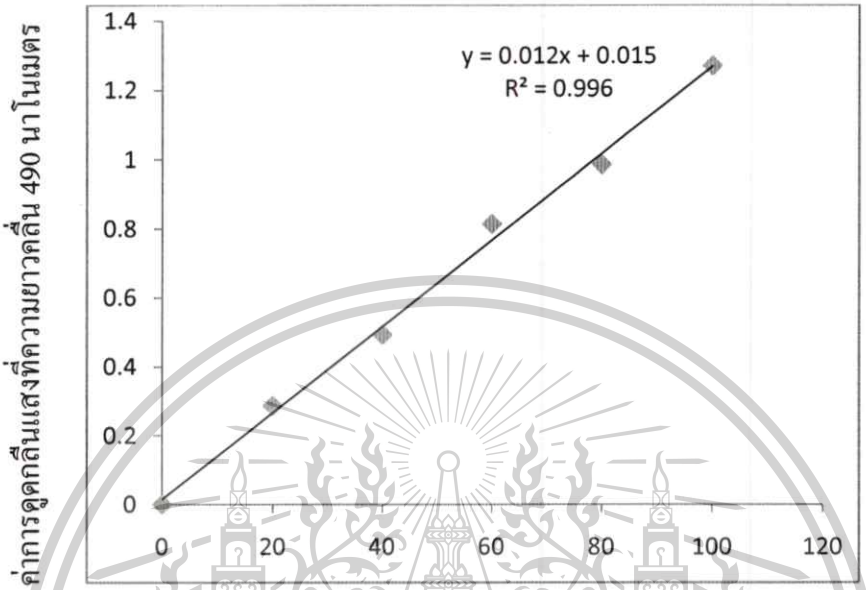
2.2.2 นำสารละลายตัวอย่างละ 1.0 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดสอบ เติมสารละลายฟีนอลความเข้มข้นร้อยละ 5 ลงไป 1.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

2.2.3 เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 98.0 ปริมาตรา 5.0 มิลลิลิตร ลงไปอย่างรวดเร็วภายใต้ตู้ดูดควัน โดยปล่อยกรดลงไปที่ผิวหน้าของเหลวโดยตรง จะทำให้การผสมที่ดีมากกว่าการค่อยๆปล่อยลงข้างหลอด

2.2.4 ตั้งหลอดทดสอบของผสมทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นนำมาเขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้อีก 10-20 นาทีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

2.2.5 นำไปแช่เย็น เป็นเวลา 20 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร เขียนกราฟมาตราฐาน ระหว่าง ค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณน้ำตาล เปรียบเทียบกับกราฟมาตราฐาน



รูปที่ 2 กราฟมาตราฐานน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธีฟีนอล-ซัลฟูริก

2.3 วิธีการย้อมแกรม

2.3.1 หยดน้ำลงบนไสด์ 1 หยด

2.3.2 จากนั้นใช้ลูปแตะเชื้อ เพื่อนำมาสเมียร์ (Smear) ลงบนแผ่นไสด์ เกลี่ยให้เป็นฟิล์มบางๆ ทิ้งไว้จนรอยสเมียร์แห้ง ตรึงไสด์โดยผ่านเปลวไฟ 2-3 นาที

2.3.3 หยดสีคริสตัลไวโอเลต (Cystal violet) ให้ท่วมรอยสเมียร์ ทิ้งไว้เป็นเวลา1 นาที

2.3.4 ล้างด้วยน้ำยาแกรมไอโอดีน (Gram iodine) ให้ท้วมรอยสเมียร์ ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที

2.3.5 ล้างด้วยแอลกอฮอล์ 95% ไม่เกิน 30 วินาที

2.3.6 ล้างด้วยน้ำก๊อก หยดสีซาฟรานิน(Safranin) ให้ท่วมรอยสเมียร์ ทิ้งไว้เป็น เวลา 1 นาที

2.3.7 ล้างด้วยน้ำก๊อก ทิ้งไว้ให้แห้งในอากาศ จากนั้นสังเกตลักษณะและรูปร่างของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.