ปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การการศึกษาการผลิตสปอร์และเอนไซม์บางชนิดในการเลี้ยงเชื้อ Bacillus subtilis ในอาหาร TSB ที่บ่มเพาะในสภาวะนิ่งและเขย่า

(Study of spores and enzyme production of Bacillus subtilis in Trypticase soy broth culture under still and shaking condition)

โดย

นาย กิตตินันท์ ศรีบุญ รหัสประจำตัวนักศึกษา 43040640

นาย พลพิพัฒน์ อภิรัตน์ธนาธร รหัสประจำตัวนักศึกษา 43040647

โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร

Faculty of Agricultural Industry

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า
เจ้าคุณทหารลาดกระบัง
กรุงเทพฯ 10520

King Mongkut's Institute of Technology
Ladkrabang
Bangkok 10520 Thailand

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่ 420

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาการผลิตสปอร์และเอนไซม์บางชนิดในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหาร TSB ที่บ่มเพาะในสภาวะนิ่งและเขย่า

(Study of spore and enzyme production of *Bacillus subtilis* in Trypticase soy broth culture under still and shaking condition)

T096634

นายกิตตินันท์ ศรีบุญ รหัสนักศึกษา 43040640

นายพลพิพัฒน์ อภิรัตน์ธนาธร รหัสนักศึกษา 43040647

ปพ.
ก673ก
2546

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 33634
วัน,เดือน,ปี 4 JUN 2003

โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต(อุตสาหกรรมเกษตร)

พ.ศ. 2546

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การศึกษาการผลิตสปอร์และเอนไซม์บางชนิดในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหาร TSB ที่บ่มเพาะในสภาวะนิ่งและเขย่า

(Study of spores and enzyme production of *Bacillus subtilis* in Trypticase soy broth culture under still and shaking condition)

โดย

นาย กิตตินันท์ ศรีบุญ รหัสประจำตัวนักศึกษา 43040640

นาย พลพิพัฒน์ อภิรัตน์ธนาธร รหัสประจำตัวนักศึกษา 43040647

ได้รับพิจารณาเห็นชอบจาก

.....ศิศร..... .....5/ม.ค./47..... **อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นายกิตตินันท์ ศรีบุญ และ นายพลพิพัฒน์ อภิรัตน์ธนาธร.: การศึกษาการผลิตสปอร์และเอนไซม์บางชนิดในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหาร TSB ที่บ่มเพาะในสภาวะนิ่งและเขย่า(Study of spore and enzyme production of *Bacillus subtilis* in Trypticase soy broth culture under still and shaking condition). ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง: ผศ.อดิศร เสวตวิวัฒน์

ในปัจจุบันนี้ได้มีการใช้แบคทีเรียในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ และโดยเฉพาะอย่างยิ่งในอุตสาหกรรมผลิตอาหารสัตว์ในรูปแบบของจุลินทรีย์โปรไบโอติก ซึ่งโดยมากจะประกอบไปด้วยจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียแลคติครวมไปถึงเชื้อในกลุ่มแบซิลลัส เช่น *Bacillus subtilis* นำมาผลิตเป็นจุลินทรีย์โปรไบโอติก จากการทดลองเพื่อทดสอบคุณสมบัติจากเชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* ซึ่งมีสายพันธุ์ในการเปรียบเทียบ 2 สายพันธุ์คือ GP522(DMST) และ GP525(เยิ้ม) ที่แยกได้จากอาหารสัตว์ ภายใต้ 2 สภาวะคือ สภาวะเขย่าและสภาวะนิ่ง โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB และมีเชื้อเริ่มต้นที่ 10^4 cfu/ml. เพื่อตรวจสอบ การสร้างสปอร์ พบว่าเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถสร้างสปอร์ในสภาวะเขย่าได้ดีกว่าสภาวะนิ่ง และเชื้อ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ GP525 สามารถสร้างสปอร์ได้ดีกว่า*B.subtilis* สายพันธุ์ GP522 ซึ่งเมื่อทำการวัดค่า Dissolved Oxegen(DO) จะเห็นว่าเชื้อต้องการอากาศในการเจริญเติบโต นอกจากนี้ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์โปรติเอสและอะไมเลสในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB พบว่าเชื้อ *B.subtilis* ทั้ง 2 สายพันธุ์ สามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอสได้ดีกว่าเอนไซม์อะไมเลส และในสภาวะเขย่าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ดีกว่าในสภาวะนิ่ง แต่ในส่วนของเอนไซม์อะไมเลส GP525 จะผลิตเอนไซม์ทั้งในสภาวะเขย่าและสภาวะนิ่งได้ดีกว่า GP522 จากคุณสมบัติดังกล่าวเมื่อเปรียบเทียบผลที่ได้จากการทดลองพบว่าเชื้อ *B.subtilis* GP525 มีการผลิตสปอร์และเอนไซม์ดังกล่าวได้ดีกว่า GP522 ดังนั้นจากข้อมูลดังกล่าว *B.sutilis* GP525 มีแนวโน้มที่จะพัฒนาไปสู่ระดับโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตโพรไบโอติกในอาหารสัตว์

.....		
.....	.....	5 พ.ค. 47
ลายมือชื่อนักศึกษา	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา	วัน เดือน ปี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณผศ. อดิศร เสวตวิวัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ ที่ได้สละเวลาให้ความรู้ ความเข้าใจ คำปรึกษา การนำเสนอและข้อเสนอแนะต่างๆที่เป็นประโยชน์ต่อการทำปัญหาพิเศษในครั้งนี้เป็นอย่างยิ่ง รวมทั้งได้ตรวจแก้ไขปัญหาพิเศษจนเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ให้ทุนทรัพย์เพื่อใช้จ่ายในการทำปัญหาพิเศษในครั้งนี้ตลอดจนกำลังใจต่างๆที่มีให้ด้วยดีเสมอมา ขอบคุณพี่ตาลเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการที่ให้คำปรึกษาและช่วยให้ทำการทดลองสำเร็จได้ด้วยดี และขอขอบคุณเพื่อนๆทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือในด้านข้อมูล และข้อเสนอแนะอันเป็นประโยชน์

ทางคณะผู้จัดทำใคร่ขอวิงวอนคุณพระศรีรัตนตรัย จงบันดาลให้ทุกท่านทั้งหลาย จงมีแต่ความสุข ความเจริญตลอดไป

คณะผู้จัดทำ

5 มกราคม 2547

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ค
กิตติกรรมประกาศ	ง
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ฌ
บทที่ 1	1
บทนำ	1
วัตถุประสงค์	1
ขอบเขตการทดลอง	2
บทที่ 2	3
วารสารปริทัศน์	3
2.1 ข้อมูลเบื้องต้นของโปรไบโอติก	3
2.2 โปรไบโอติกกับอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์บก	8
2.3 โปรไบโอติกกับอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	9
2.4 ข้อมูลเบื้องต้นของ *Bacillus subtilis* (Bs)	18
2.5 ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ในด้านโปรไบโอติกและการบำบัดน้ำเสีย	20
บทที่ 3	21
ขั้นตอนการดำเนินการทดลอง	21
3.1 อุปกรณ์	21
3.2 วัตถุดิบ	21
3.3 การเตรียมกล้าเชื้อ	21
3.4 การเลี้ยงเชื้อ	21
3.5 การวิเคราะห์ตัวอย่าง	22
บทที่ 4	27
ผลการทดลอง	27
4.1 ผลการตรวจนับปริมาณเชื้อทั้งหมดที่สภาวะนิ่งและเขย่า	27
4.2 ผลการตรวจนับปริมาณสปอร์ที่สภาวะนิ่งและเขย่า	30
4.3 ผลการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส	31
4.4 ผลการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส	32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5 33
สรุปผลการทดลอง 33
เอกสารอ้างอิง 35
ภาคผนวก 37
ภาคผนวก ก. การวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์ 38
ภาคผนวก ข. การวิเคราะห์ทางเคมี 39
ภาคผนวก ค. ตารางแสดงการวิเคราะห์ 43
ประวัติผู้เขียน 47

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 คุณสมบัติและการออกฤทธิ์ของโปรไบโอติกเทียบกับยาปฏิชีวนะ	8
ตารางที่ 2 แสดงปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดของเชื้อ *Bacillu subtilis* GP522 และ GP525 ที่สภาวะนิ่งและเขย่า	27
ตารางที่ 3 แสดงปริมาณสปอร์ของเชื้อ *Bacillus subtilis* GP522 และ GP525 ที่สภาวะนิ่งและเขย่า	30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1 ตัวอย่างการตรวจนับเชื้อจุลินทรีย์โดย Spread plate technique ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA 27

รูปที่ 2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเชื้อทั้งหมด log(cfu/ml.)กับเวลา(ชั่วโมง) ที่สภาวะนิ่งและเขย่า 28

รูปที่ 3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD_{600} กับเวลา(ชั่วโมง)ที่สภาวะนิ่งและเขย่า 29

รูปที่ 4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าDO กับเวลา(ชั่วโมง)ที่สภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า 29

รูปที่ 5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสปอร์ log(cfu/ml)กับเวลา(ชั่วโมง) ที่สภาวะนิ่งและเขย่า 31

รูปที่ 6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่ากิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสกับเวลา(ชั่วโมง) ที่สภาวะนิ่งและเขย่า 31

รูปที่ 7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสกับเวลา(ชั่วโมง) ในสภาวะนิ่งและเขย่า 32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

ในสภาวะการณ์ปัจจุบันจุลินทรีย์โพรไบโอติก (probiotic) ได้เข้ามามีบทบาทสำคัญ และเป็นที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในอุตสาหกรรมผลิตอาหารสัตว์ ไม่ว่าจะเป็นสัตว์บกหรือสัตว์น้ำ มีการนำโพรไบโอติกมาทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะกันอย่างแพร่หลายในการเลี้ยงสัตว์ แต่ผลเสียที่ติดตามมาของการใช้ยาปฏิชีวนะคือ การตกค้างของสารต่าง ๆ ที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพและชีวิตของผู้บริโภค ในขณะที่จุลินทรีย์โพรไบโอติกไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อมนุษย์และสัตว์เลี้ยง ในทางตรงกันข้ามกลับมีประโยชน์ในแง่ของการก่อให้เกิดสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร และสร้างสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น และขับออกมานอกเซลล์ โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์จะนำโพรไบโอติกมาใช้ในรูปสารละลายหรือเสริมกับอาหารสัตว์ โดยสามารถลดความเครียดของสัตว์ เพิ่มความต้านทานโรค ทำให้สัตว์เจริญเติบโตได้อย่างแข็งแรง ด้วยเหตุนี้ผู้ทดลองจึงได้ทำการศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเชื้อ *Bacillus subtilis* 2 สายพันธุ์ ในระดับห้องปฏิบัติการโดยทำการผลิตในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB 100 มิลลิลิตร เพื่อให้เชื้อจุลินทรีย์มีการสร้างสปอร์และตัวเซลล์รวมถึงเอนไซม์อะไมเลสและโปรติเอสซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ โดยทำการเปรียบเทียบระหว่างสภาวะที่มีการให้อากาศกับไม่ให้อากาศ

วัตถุประสงค์

1.1 ศึกษาสภาวะที่ให้อากาศและไม่ให้อากาศในการสร้างสปอร์ของเชื้อ *Bacillus subtilis*(GP522) และ *Bacillus subtilis*(GP525)ในระดับห้องปฏิบัติการเพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาไปสู่ระดับโรงงานอุตสาหกรรมต่อไป

1.2 เพื่อตรวจหาเอนไซม์อะไมเลสและโปรติเอสในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการเลี้ยงเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขอบเขตการทดลอง

การทดลองนี้ได้ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างสปอร์และวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์จากเชื้อ *Bacillus subtilis* 2 สายพันธุ์ คือ *B. subtilis* GP522 และ GP525 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB โดยเปรียบเทียบระหว่างสภาวะเขย่าและสภาวะนิ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
วารสารปริทัศน์

ข้อมูลเบื้องต้นของโปรไบโอติก (Probiotic)

Probiotic หรือสารเสริมชีวนะ จัดเป็นวัตถุที่เติมในอาหารสัตว์ ตามประกาศของกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่มีประโยชน์ต่อร่างกายสัตว์ ทำให้จุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารอยู่ในสมดุล ช่วยให้ระบบย่อยอาหารดีขึ้น การเจริญเติบโตดีขึ้น ไม่มีปัญหาต่อสิ่งแวดล้อม การเปลี่ยนแหลงทางพันธุกรรม การดื้อยา หรือสารตกค้าง ใช้ได้กับสัตว์หลายประเภท

คำจำกัดความของโปรไบโอติก

Parker (1974) เป็นคนแรกที่ใช้คำว่า Probiotic เพื่ออธิบายถึงจุลินทรีย์ที่ใช้ป้อนสัตว์โดยให้คำจำกัดความว่า "จุลินทรีย์หรือสารซึ่งเป็นตัวทำให้จุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารอยู่ในสมดุล"

ปี 1989 สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ประเทศสหรัฐอเมริกาให้คำจำกัดความว่า Probiotic เป็น "ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ซึ่งเป็นอาหารที่กินได้โดยตรง" และจัดเป็น Generally Recognized As Safe (GRAS) ingredients เป็น Food and Feed additive ที่ปลอดภัยสามารถใช้เป็นอาหารมนุษย์ได้โดยผ่านการพิจารณาจากเภสัชกรและนักพิษวิทยาแล้ว

Fuller (1989) ทบทวนคำจำกัดความ และกล่าวว่า Probiotic คือ "อาหารเสริมซึ่งเป็น จุลินทรีย์มีชีวิต เป็นประโยชน์ต่อร่างกายสัตว์ โดยปรับปรุงจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารสัตว์ให้สมดุล"

Stark and Wilkinson (1989) จากสหราชอาณาจักรอังกฤษให้คำจำกัดความว่า "เป็นผลิตภัณฑ์ที่ประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่มีชีวิตไม่ก่อให้เกิดโรค สามารถให้สัตว์กินเพื่อปรับปรุงอัตราการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหารและทำให้สุขภาพดี"

โปรไบโอติกในความหมายของ ศิริรัตน์(2540) ผู้นำเสนอผลงาน "Probiotic BS-11" ซึ่งเป็นโปรไบโอติกที่ใช้ในบ่อกุ้ง ได้กล่าวให้ความหมายไว้ว่า "โปร" คือ การเตรียม "ไบโอติก" คือชีวิต ดังนั้นความหมายของโปรไบโอติกคือ การเตรียมพร้อมให้สิ่งมีชีวิตมีสุขภาพแข็งแรง ซึ่งก็คือจุลินทรีย์โดยทั่วไปจะเป็นแบคทีเรีย สามารถเข้าไปยึดเกาะบริเวณผิวหน้าของทางเดินอาหารโดยที่ยังมีชีวิตอยู่แล้วจะให้สารบางอย่าง เพื่อเป็นการทดแทน หรือเป็นการแก่งแย่งกับจุลินทรีย์ที่ก่อโรคที่เข้ามาสู่ทางเดินอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะการทำงานของโปรไบโอติกที่ดี

1. เป็นสายพันธุ์ที่ให้ประโยชน์ทำให้สัตว์มีการเจริญเติบโตมากขึ้นและมีความต้านทานต่อโรคดีขึ้น
2. ไม่ทำให้เกิดโรค และไม่เป็นพิษ (non-pathogenic, non-toxic)
3. เป็นเซลล์ที่มีชีวิตและมีจำนวนมากพอควรที่จะเดินทางไปจนถึงทางเดินอาหารส่วนท้ายได้
4. ทนต่อสภาพกรดในกระเพาะและน้ำดีในลำไส้ แต่สามารถย่อยสลายในลำไส้ได้ดี
5. มีความคงตัวและมีชีวิตอยู่ได้นานในสภาพเก็บรักษาและการใช้งานจริงในฟาร์ม
6. มีความคงตัวและมีชีวิตอยู่ได้นานในการผสมอาหารสัตว์ เนื่องจากการผลิตอาหารสัตว์บางชนิด ต้องผ่านกระบวนการความร้อน, แรงอัดเพื่อการอัดเม็ด และสภาพเป็นกรด หรือการ extrusion และ oxidation เช่น วัตถุที่เติมในอาหารสัตว์บางชนิด ซึ่งช่วยในการถนอมคุณภาพอาหารสัตว์
7. ไม่ตกค้างในซากสัตว์
8. ราคาไม่แพง
9. ไม่ถูกดูดซึมในระบบทางเดินอาหาร
10. ไม่เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรม
11. ไม่ทำให้เกิดการแพ้
12. เป็นสายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตจำนวนมากในระดับอุตสาหกรรมได้

หลักการทำงานของโปรไบโอติกที่ดี

1. ลดจำนวนจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค โดย
   - สร้างสาร Antibacterial substance
   - ขัดขวางเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค
   - สามารถจับกับผนังของลำไส้ ทำให้จุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคไม่สามารถเกาะ และก่อตัวในทางเดินอาหาร
2. ช่วยระบบย่อยอาหาร โดย
   - สร้าง Lactic acid ทำให้กระเพาะมีสภาพเป็นกรดมากขึ้น การย่อยอาหารดีขึ้น
   - สร้าง Beta-galactosidase ทำให้การใช้น้ำตาลกาแลคโตสในน้ำนมดีขึ้น
   - สร้างน้ำย่อย เช่น Pectinase, Cellulase

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ลดพิษของ amine และแอมโมเนีย

3. กระตุ้นภูมิคุ้มกันโรค โดย
   - มีการสร้างสารแอนติบอดี้มากขึ้น
   - เพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของ Macrophage ซึ่งเป็นเซลล์ชนิดหนึ่งทำหน้าที่กินจุลินทรีย์ที่ทำให้ เกิดโรคหรือสารแปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกาย

ประโยชน์ของการใช้โปรไบโอติกผสมอาหารสัตว์

1. ใช้เป็นสารเร่งการเจริญเติบโตแทนยาปฏิชีวนะและเคมีภัณฑ์ซึ่งอาจจะพบปัญหาการดื้อยาและสารตกค้าง
2. ช่วยให้ระบบการย่อยอาหารในสัตว์ดีขึ้นทำให้การใช้น้ำตาลแลคโตสในนมดีขึ้น
3. ใช้ป้องกันโรคต่าง ๆ เนื่องจากโปรไบโอติกทำให้สัตว์มีภูมิคุ้มกันสูงขึ้น ลดการเกิดโรคท้องเสียในสัตว์เมื่อสัตว์เกิดความเครียดจะมีผลทำให้สูญเสียสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้
4. ยับยั้งหรือป้องกันการเกิดเนื้องอกโดยโปรไบโอติกจะช่อยยับยั้งการสร้างเซลล์เนื้องอกและลดการสร้างน้ำย่อยที่ใช้ในการสร้างสารไนโตรซามิน
5. ยับยั้งการสร้างคลอเรสเตอรอล
6. ใช้ได้กับสัตว์ทุกชนิด ทุกระยะ (ยกเว้นเป็ด เนื่องจากไม่มีข้อแนะนำให้ใช้สำหรับเป็ด)
7. FDA ยอมรับว่าเป็น GRAS (Gencally Recognized as Safe)

การกำหนดการใช้โปรไบโอติกในกฎหมายของประเทศไทย

โปรไบโอติกที่สามารถนำมาใช้เป็นวัตถุที่เติมในอาหารสัตว์ และเป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปเพื่อขายได้ในอัตราส่วนไม่น้อยกว่า $1x10^5$ CFU ต่ออาหารสัตว์ 1 กิโลกรัม ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดชื่อ ประเภท ชนิด หรือลักษณะของวัตถุที่เติมในอาหารสัตว์ที่ให้ใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตอาหารสัตว์เพื่อขาย ตลอดจนอัตราส่วนหรือปริมาณที่ให้ใช้หรือห้ามมิให้ใช้วัตถุนั้นเกินกำหนด พ.ศ. 2539 ซึ่งออกตามพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. 2525 ได้แก่

(ก) จำพวกแบคทีเรีย

1. บาซิลลัส โคแอกูแลน (*Bacillus coagulan*)
2. บาซิลลัส เลนตัส (*Bacillus lentus*)
3. บาซิลลัส ไลเคนิเฟอร์มิส (*Bacillus licheniformis*)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. บาซิลลัส พูมิลัส (*Bacillus pumilus*)
5. บาซิลลัส ซับติลิส (สเตรนที่ไม่สร้างยาปฏิชีวนะ) (*Bacillus subtilis*) (nonantibiotic producing strains only)
6. บาซิลลัส ซับติสิส สเตรน บีเอ็น (*Bacillus subtilis* strain BN)
7. สเตรปโทค็อกคัส ฟีเซียม บาซิลลัส โท โยอิ (*Bacillus toyoi*)
8. แบคทีรอยเดส แอมิโรพิลัส (*Bacteroides amylophilus*)
9. แบคทีรอยเดส คาฟิลโลซัส (*Bacteroides capillosus*)
10. แบคทีรอยเดส รูมิโนโคลา (*Bacteroides ruminicola*)
11. แบคทีรอยเดส ซูอิส(*Bacteroides suis*)
12. ไบฟิโดแบคทีเรียม แอนิมาลิส (*Bifidobbactirium animatis*)
13. แบคทีรอยเดส แอโดเลสเซนติส (*Bacteroides adolescentis*)
14. แบคทีรอยเดส ไบฟีดัม (*Bacteroides bifidum*)
15. แบคทีรอยเดส อินแฟนติส (*Bacteroidesinfantis*)
16. แบคทีรอยเดส ลองกัม (*Bacteroides longum*)
17. แบคทีรอยเดส เทอร์โมฟีลัม (*Bacteroides thermophilum*)
18. แลกโตบาซิลลัส แอซิโดฟีลัส (*Lactobacillus acidophilus*)
19. แลกโตบาซิลลัส เบรวิส (*Lactobacillus brevis*)
20. แลกโตบาซิลลัส บัลการิคัส (*Lactobacillus bulgaricus*)
21. แลกโตบาซิลลัส เคซีไอ (*Lactobacillus casei*)
22. แลกโตบาซิลลัส เซลโลไบโอซัส (*Lactobacillus cellobiosus*)
23. แลกโตบาซิลลัส เคอร์วาตัส (*Lactobacillus curvatus*)
24. แลกโตบาซิลลัส เดลบรูคิไอ (*Lactobacillus delbruekii*)
25. แลกโตบาซิลลัส เฟอร์เมนตัม (*Lactobacillus fermentum*)
26. แลกโตบาซิลลัส เฮลวีคัส (*Lactobacillus helveticus*)
27. แลกโตบาซิลลัส แล็กติส (*Lactobacillus lactis*)
28. แลกโตบาซิลลัส แพลนทาลัม (*Lactobacillus plantarum*)
29. แลกโตบาซิลลัส ริวเทอริไอ (*Lactobacillus reuterii*)
30. ลิวโคนอสตอก มีเซนเทอรอยเดส (*Leuconostoc mesenteroides*)
31. พีดิโอค็อกคัส แอซิดีแล็กทิซิไอ (*Pediococcus acidilacticii*)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

32. พีดิโอค็อกคัส เซอรีวิซิอี ดอมโนซัส (*Pediococcus cerevisiae*) (damnosus)
33. พีดิโอค็อกคัส เพนโทซาเซียส (*Pediococcus pentosaceus*)
34. โพรพิโอนิแบคทีเรียม เชอร์มานิไอ (*Prorionibacterium sheranii*)
35. โพรพิโอนิแบคทีเรียม ฟริวเดนไรซิไอ (*Prorionibacterium freudenreichii*)
36. สเตรปโทค็อกคัส ครีโมริส (*Streptococcus cremoris*)
37. สเตรปโทค็อกคัส ฟีเซียม (*Streptococcus faecuim* เซอร์เนลล์ 68 (*Streptococcus faecuim cernelle 68*)
38. สเตรปโทค็อกคัส อินเตอร์มีเดียส (*Streptococcus intermedius*)
39. สเตรปโทค็อกคัส แล็กติส (*Streptococcus lactis*)
40. สเตรปโทค็อกคัส เทอร์โมฟีลัส (*Streptococcus thermophilus*)

(ข) จำพวกรา

1. แอสเพอร์จิลลัส ไนเกอร์ (*Aspergillus niger*)
2. แอสเพอร์จิลลัส ออไรซี (*Aspergillus auryzae*)
3. แคนดิดาพินโทเลเพสซิ (*Candida pintolepessi*)
4. พีดิโอคูเซียส สปีชีส์ (*Pediocuceus spp.*)
5. แซ็กคาโลไมเซส เซอรีวิซิอี (*Saccharomyces cerevisiae*)
6. ยีสต์ (Ycast)

การใช้ร่วมกันระหว่างโปรไบโอติกและยาปฏิชีวนะ

โดยหลักการแล้วไม่ควรใช้ยาปฏิชีวนะร่วมกับโปรไบโอติกเพราะยาปฏิชีวนะอาจทำลายโปรไบโอติก แต่ถ้ามีความจำเป็นต้องใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อป้องกันหรือรักษาโรคเนื่องจากสัตว์ป่วยหรือเกิดมีโรคระบาดจะต้องทำการทดสอบปฏิกิริยาของโปรไอโอติกกับฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะแต่ละชนิดเพื่อไม่ให้ยาปฏิชีวนะทำลายโปรไบโอติกและจุลชีพในระบบทางเดินอาหารที่มีอยู่ตามธรรมชาติ (Normal flore) ของร่างกาย ดังนั้นการเติมโปรไบโอติกในอาหารสัตว์ควรให้สัตว์ได้รับจุลชีพที่เหมาะสมเข้าไปด้วย จะทำให้ร่างกายสัตว์ฟื้นคืนสู่สภาพปกติได้รวดเร็วขึ้น มีผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกหลายชนิด ที่มีส่วนประกอบของจุลินทรีย์หลายตัวรวมกัน ซึ่งสามารถใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะบางตัวได้ เนื่องจากไม่มีการออกฤทธิ์ขัดขวางหรือทำลายซึ่งกันและกัน ดังนั้นการเลือกใช้โปรไบโอติกร่วมกับยาปฏิชีวนะจึง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ควรพิจารณาข้อบ่งใช้ให้ถี่ถ้วนซึ่งจะพบคุณสมบัติที่แตกต่างกันระหว่างโปรไบโอติกและยาปฏิชีวนะ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 คุณสมบัติและการออกฤทธิ์ของโปรไบโอติกเทียบกับยาปฏิชีวนะ

โปรไบโอติก	ยาปฏิชีวนะ
คุณสมบัติ 1. เป็นจุลินทรีที่มีชีวิต 2. ไม่ถูกดูดซึมในระบบทางเดินอาหาร 3. ส่งเสริมการเจริญเติบโตและเพิ่มประสิทธิภาพการใช้อาหาร 4. ไม่มีสารตกค้างในอวัยวะต่างๆ 5. ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์	**คุณสมบัติ** 1. เป็นสารประกอบเคมีบริสุทธิ์ 2. ดูดซึมในระบบทางเดินอาหาร 3. ส่งเสริมการเจริญเติบโตและเพิ่มประสิทธิภาพการใช้อาหาร 4. อาจมีสารตกค้างในอวัยวะต่างๆ 5. อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์
การออกฤทธิ์ 1. สร้างกรดและลด pH ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค 2. ทำงานเจาะจงเฉพาะที่ 3. แบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้ในระบบทางเดินอาหารและแย่งจับพื้นที่ทางเดิกอาหารกับจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค	**การออกฤทธิ์** 1. ยับยั้งการสร้างโปรตีน DNA , RNA ของเซลล์มีชีวิต 2. มีการทำงานกว้างขวาง 3. ไม่มีการเพิ่มจำนวน

ที่มา : คนึงนิจ (2540)

โปรไบโอติกกับอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์บก

มีการใช้โปรไบโอติกกันมานานในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์บกในประเทศสหภาพยุโรปและผู้เลี้ยงสัตว์ในประเทศไทย เริ่มมีผู้หันมาให้ความสนใจใช้โปรไบโอติกผสมอาหารสัตว์บ้าง เช่น ในไก่, สุกร, และโค ซึ่งยังไม่มีข้อแนะนำสำหรับผู้ใช้ในเป็ด แต่อย่างไรก็ตาม การใช้โปรไบโอติกผสมอาการสัตว์ในสัตว์บกยังไม่เป็นที่แพร่หลายนักในประเทศไทย สาเหตุหนึ่งเนื่องจากราคาปศุสัตว์มีผลต่อการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นิยมใช้ นั่นคือการจะใช้โปรไบโอติกหรือไม่ ขึ้นกับราคาเนื้อสัตว์เป็นสำคัญ ถ้าตลาดเนื้อสัตว์ดี เกษตรกรจะให้ความสนใจในการใช้วัตถุที่เติมในอาหาร เพื่อเร่งการเจริญเติบโตเพื่อลดจำนวนวันที่เลี้ยงสัตว์ แต่ถ้าราคาเนื้อสัตว์ตกต่ำ เกษตรกรจะลดต้นทุนการผลิต ทำให้ลดการใช้วัตถุดิบที่เติมในอาหารสัตว์บางชนิดที่ไม่จำเป็นลง

ประวัติการใช้โปรไบโอติกในสัตว์บก

Eilie Metchnikoff (1907) ได้สันนิษฐานว่า Probiotics เป็นยาป้องกันรักษาโรคโดยเขาอ้างว่าชาวนาบัลกาเรียบางคนอายุยืน เนื่องจากกิน Fermented milk หรือ Yogurt ที่มีแบคที่เรียชื่อ *Lactobacillus bulgaricus* ตั้งแต่นั้นมามีการอ้างอิงมากมายที่ใช้ Probiotics เพื่อสุขภาพมนุษย์ (Kopeloff และ Beerman, 1925; Rettger, 1929; Alm, 1983) นอกจากนี้ยังมีการอ้างผลดีของการใช้ Lactobacillus เป็นอาหารเสริมในอาหารสัตว์ (Tortuero, 1973; Francis และคณะ, 1978; Pollmann และคณะ, 1980) Nurmi และ Rantala (1973) ได้สาธิตผลของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในทางเดินอาหารที่ช่วยป้องกันไก่ฟักแรกเกิด โดยให้กินอุจจาระของไก่ผู้ใหญ่ ปรากฏว่าไก่มีความต้านทานต่อ *Salmonella infantis* และ ผลนี้จะยังคงมีอยู่แม้จะนำเอาอุจจาระมาเลี้ยงเชื้อในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน แต่การเอาอุจจาระมาเลี้ยงเชื้อในสภาพที่มีออกซิเจน จะทำลายผลดีนี้ไป Fuller และคณะ (1986) ได้ทำการทดลองยืนยันผลการป้องกันเชื้อ *Salmonella* spp. และ เชื้อโรคทางเดินอาหารอื่นๆ ของจุลินทรีย์ในลำไส้ไก่

โปรไบโอติกกับอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในประเทศไทยที่สำคัญ และสามารถทำเงินรายได้เข้าประเทศอยู่ในอันดับต้นๆ ทุกปี ได้แก่อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ในปี 2543 ประเทศไทยสามารถผลิตกุ้งได้ถึง 300,000 ตัน ซึ่งเป็นอันดับหนึ่งของโลกติดต่อกันมานานถึง 9 ปี ประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์ ของกุ้งที่เลี้ยงได้ทั้งหมด ส่งไปขายในต่างประเทศ ในรูปของ กุ้งแช่แข็ง กุ้งกระป๋อง กุ้งต้ม และอื่นๆ เมื่อรวมผลิตภัณฑ์ของกุ้งทุกประเภทที่ส่งออก ปี 2542 สามารถทำรายได้สูงถึง 107,000 ล้านบาท ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับอาชีพเกษตรกรรมอื่นๆแล้ว กุ้งกุลาดำเป็นสินค้าส่งออกที่มีมูลค่าสูงที่สุด สามารถกระตุ้นเศรษฐกิจของประเทศได้เป็นอย่างดี เมื่อเปรียบเทียบกับหลายๆอุตสาหกรรมที่นำเงินรายได้เข้าประเทศเป็นจำนวนมาก และเมื่อเปรียบเทียบกับประเทศอื่นๆแล้ว ประเทศไทยเป็นผู้นำในด้านการผลิตมาตลอด โดยเฉพาะ 10 ปีที่ผ่านมา รวมถึงห้องเย็นจำนวนมากที่มีมาตรฐานสูง ต่างประเทศยอมรับประเทศไทยมีส่วนแบ่งของตลาดสูงมาก ทั้งในตลาดสหรัฐอเมริกา และญี่ปุ่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปัญหาที่มีผลกระทบต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำของไทย

การเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่ผ่านมา ประสบปัญหาต่างๆมากมายต่อเนื่อง จำเป็นต้องมีการค้นคว้าวิจัยเพื่อหาแนวทางในการป้องกันและลดความเสียหาย เนื่องจากกุ้งกุลาดำนับเป็นสัตว์น้ำที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ และเป็นธุรกิจที่ให้ผลตอบแทนสูง จึงทำให้มีการขยายตัวของพื้นที่การเพาะเลี้ยงขึ้นเรื่อยๆ อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงประสิทธิภาพของการผลิตต่อหน่วยพื้นที่ กลับลดลงเป็นอย่างมาก จากเดิมที่มีผลผลิตประมาณ 1.5-2.5 ตัน/ไร่ เหลือเพียง 700-1000 กิโลกรัม/ไร่ ซึ่งปัจจัยที่สำคัญที่ทำให้มีการลดลงอย่างมากของผลผลิตนี้ก็คือ

1. เชื้อโรค

ปรากฏการเกิดโรคในกุ้ง ที่ส่งผลกระทบอย่างรุนแรงต่อภาพรวมของเศรษฐกิจของประเทศ เริ่มปรากฏขึ้นตั้งแต่ปี 2543 โดยเริ่มพบ Yellow head virus ที่เป็นสาเหตุของโรคหัวเหลือง (Boonyaratpalin และคณะ 1993) และการตรวจพบ White spot syndrome virus ที่เป็นสาเหตุของโรคตัวแดงดวงขาวในปี 2538 (Kasornchanda และคณะ 1995) ซึ่งโรคชนิดนี้ เกิดกับกุ้งทุกชนิดทั่วโลกโรคไวรัสดวงขาวนี้มีความสำคัญต่อการผลิตกุ้ง และราคากุ้งทั่วโลก ตัวอย่างเช่น ประมาณปี 2537 เกิดโรคไวรัสดวงขาว ทำให้กุ้งที่เลี้ยงในประเทศจีนตายเป็นจำนวนมาก ผลผลิตกุ้งในประเทศจีนลดลงหลายหมื่นตัน ทำให้ราคากุ้งทั่วโลกสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ในระยะต่อมามีการเลี้ยงกุ้งเพิ่มขึ้นทุกประเทศ ทำให้ราคาเริ่มอ่อนตัวลงจนกระทั่งประมาณปี 2542 ประเทศเอควาดอร์ ซึ่งอยู่ในทวีปอเมริกาใต้ ในขณะนั้นสามารถผลิตกุ้งได้เป็นอันดับสองรองจากประเทศไทย ประสบปัญหากุ้งตายจากไวรัสดวงขาว ทำให้ผลผลิตลดลงจาก 130,000 ตัน เหลือเพียง 50,000 ตันมีผลทำให้ราคากุ้งเพิ่มสูงมากขึ้น เป็นต้น นอกจากนี้ ยังพบว่าเชื้อ *Vibrio* spp. โดยเฉพาะสายพันธุ์ที่เรืองแสง ได้แก่ *Vibrio harveyi* เป็นแบคทีเรียสำคัญที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคในกุ้ง และเมื่อศึกษาย้อนกลับไปภายในระยะเวลาเพียง 10 ปี จะพบว่ายิ่งเราตรวจพบสาเหตุของการเกิดโรคมากขึ้นเท่าไร ประสิทธิภาพการผลิตกลับลดต่ำลงเรื่อยๆ ในขณะที่ต้นทุนการผลิตกลับเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะต้นทุนของสารเคมี และยาที่ใช้ในการป้องกันโรค รวมไปถึงสภาวะความเสี่ยงในการลงทุนก็มีมากขึ้นด้วย

2. ผลกระทบของการใช้ยาต้านจุลชีพและยาปฏิชีวนะต่อกุ้งและสิ่งแวดล้อม

การใช้ยาต้านจุลชีพและยาปฏิชีวนะ ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ไม่ว่าจะเป็นยาอะไร ผลกระทบที่เห็นได้ชัดเจน คือถ้ามีการใช้ยาในปริมาณที่มากเกินไปหรือบ่อยครั้งก็จะเป็นอันตรายต่อตัวกุ้งโดยจะมีผลต่ออัตราการเจริญเติบโต และถ้าใช้ในปริมาณที่น้อยเกินไปก็จะทำให้ผลในการรักษาไม่ดีเชื้อโรคอาจดื้อยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้ นอกจากนี้ปัญหาอีกอย่างหนึ่งคือปัญหาการตกค้างของยาต้านจุลชีพและยาปฏิชีวนะในเนื้อกุ้งกุลาดำ ซึ่งถือว่าเป็นปัญหาที่มีความสำคัญมาก โดยถ้ามีการบริโภคกุ้งที่มีสารตกค้างก็สามารถทำให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคได้ ซึ่งได้ก่อให้เกิดปัญหาในการส่งออกกุ้งไปยังต่างประเทศได้

การตกค้างของยาในดินและในน้ำส่งผลให้แบคทีเรียมีความสามารถในการปรับตัว จึงเกิดปัญหาการดื้อยาตามมา ดังนั้นจึงทำให้การรักษาในคราวต่อไปจึงจำเป็นต้องมีการเพิ่มปริมาณยาให้มากขึ้นตามไปด้วย นอกจากนี้การตกค้างของยาสามารถที่จะทำให้ความสดุลย์ต่างๆรวมทั้งวัฏจักรในการย่อยสลายของเสียต่างๆเปลี่ยนไป ซึ่งก่อให้เกิดการกระทบกระเทือนต่อสิ่งมีชีวิตต่างๆที่อยู่ในน้ำ

จากงานวิจัยของ Moriarty (1999) ได้รายงานว่า เมื่อมีการใช้ยาปฏิชีวนะในการควบคุมโรคเรืองแสงที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ซึ่งเป็นแบคทีเรียสำคัญที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคในกุ้ง พบว่านอกจากเชื้อแบคทีเรียนี้จะดื้อต่อยาปฏิชีวนะทุกชนิดที่เคยใช้มา ซึ่งได้แก่ Chloramphenical, furazolidone, oxytetracyclin และ streptomycin แล้ว ยังพบอีกว่ามีความรุนแรงของโรคมากขึ้นกว่าปีที่ผ่านๆ มาอีกด้วย และ ในปี 2542 เกษตรกรที่มีการใช้สารแขวนลอย silver ผสมกับอาหารกุ้งทุกชนิดล้วนแล้วแต่ประสบกับปัญหากุ้งตายเพิ่มขึ้นจากโรคเรืองแสง นี่เป็นเพราะการแก้ปัญหาแบบเฉพาะหน้าโดยการเติม norfloxacin ลงไปในอาหารทุกชนิดที่ใช้เลี้ยงกุ้ง แต่อย่างไรก็ตามเมื่อหยุดใช้ยาปริมาณมากๆ กุ้งจะตายหมดทั้งบ่อภายใน 2 วัน ซึ่งเป็นที่ชัดเจนแล้วว่า *Vibrio* สายพันธุ์ที่เรืองแสง ได้มีการพัฒนาความรุนแรงของโรคให้รุนแรงขึ้นเพื่อตอบโต้กับการใช้ silver และยาปฏิชีวนะ นอกจากนี้ยังพบว่ามีการใช้คลอรีนในบ่อเพาะฟัก และในบ่อเลี้ยงกุ้งกันอย่างแพร่หลาย แต่พบว่าตังคลอรีนเองไปกระตุ้นการพัฒนาการแบ่งตัวของยีนที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรีย เกษตรกรไทยบางราย ได้ข้อมูลว่า เมื่อใช้คลอรีนในบ่อกุ้งเพื่อฆ่าแพลงตอนสัตว์ก่อนที่จะทำการจับกุ้ง หลังการบำบัดคลอรีนออกไปแล้ว พบว่าจะมีการเพิ่มปริมาณของ *Vibrio harveyi* ขึ้นอย่างรวดเร็ว ซึ่งเป็นการคาดเดาได้ว่า เชื้อ*Vibrio* มีอัตราการเจริญเติบโตที่รวดเร็วมาก และการใช้คลอรีน จะไปลดจำนวนคู่แข่งขันอื่นๆ ที่จะไปแย่งสารอาหารกับ *Vibrio* และ ยังฆ่าสาหร่ายอีกด้วย ดังนั้นจึงเป็นการเพิ่มแหล่งอาหารให้กับเชื้อ *Vbrio* นอกจากนี้ *Vibrio* ที่รอดชีวิตหลังการบำบัดคลอรีนออกไป ไม่เพียงแต่จะดื้อยาปฏิชีวนะมากขึ้นเท่านั้น แต่ยังก่อโรคได้อีกด้วย ดังนั้นการใช้สารประกอบต่างๆ เพื่อไปยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ เป็นการทำให้ปัญหาต่างๆที่มีอยู่ ยิ่งทวีความรุนแรงมากขึ้น เพราะถ้ายาปฏิชีวนะ หรือยาฆ่าเชื้อ ถูกใช้เพื่อฆ่าเชื้อแบคทีเรียจะมีแบคทีเรียบางตัวที่รอดชีวิต ทั้งสายพันธุ์ที่ก่อโรคและไม่ก่อโรค เพราะมันมียีนที่ดื้อยาอยู่ในเซลล์เชื้อเหล่านี้จะเจริญอย่างรวดเร็ว เพราะคู่แข่งของมันถูกกำจัดออกไปหมดแล้ว จึงสามารถใช้อาหารที่มีอยู่ได้อย่างเต็มที่ เชื้อก่อโรครุนแรงหลายชนิด ที่กลับเข้ามาในบ่อดิน หรือบ่อเพาะฟักอีกครั้งนั้น บางทีก็มาจากฟิล์มหรือคราบน้ำในบ่อ หรืออยู่ในทางเดินอาหารของสัตว์ จากนั้นจะสามารถแลกเปลี่ยนยีนกับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรียที่มียีนดื้อยา และจะมีชีวิตรอดได้ต่อไป ถึงแม้จะใช้ยาปฏิชีวนะ Salyers ได้เสนอแนะข้อคิดเห็นว่า การส่งผ่านยีนดื้อยาไปสู่เชื้อก่อโรคในมนุษย์ และแบคทีเรียในทางเดินอาหาร เป็นปัญหาใหญ่ที่ต้องคำนึงถึง เพราะการส่งผ่านยีนมีโอกาสเกิดขึ้นได้อย่างง่ายดาย และรวดเร็ว พลาสมิดดื้อยา มีการสร้างขึ้นมาสำหรับยีนดื้อยาที่ถูกส่งผ่านระหว่างเชื้อก่อโรค และเชื้อไม่ก่อโรค ของแบคทีเรียแกรมลบ ในสิ่งแวดล้อมที่มีน้ำทะเลอยู่แต่ละแห่ง พบว่าความเข้มข้นของ เตตราไซคลิน มีไม่สูงพอที่จะฆ่าแบคทีเรียได้ อัตราการส่งผ่านยันที่มีอยู่ระหว่าง *Vibrio cholerae* และ *Aeromonas salmonicida* ถูกเพิ่มขึ้นเป็น 100 เท่า

3. ผลกระทบสิ่งแวดล้อมในบ่อเลี้ยงกุ้ง

การเลี้ยงกุ้งกุลาดำให้ประสบผลสำเร็จ เป็นเรื่องยากที่จะปฏิบัติ เนื่องจากมีปัจจัยต่างๆเข้ามาเกี่ยวข้องมากมาย เช่น การเลือกคุณภาพลูกกุ้ง คุณภาพอาหารที่ดี การเลือกสถานที่ที่เหมาะสม และอีกปัญหาหนึ่งที่เกษตรกรไม่ควรมองข้ามคือ การจัดการคุณภาพน้ำที่ใช้ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ เนื่องจากสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดโรคกุ้ง คือสิ่งแวดล้อมในบ่อกุ้ง ซึ่งมักจะพบปัญหาน้ำเน่าเสีย ที่เกิดจากการตกค้างของเศษอาหารกุ้งในบ่อเลี้ยงจำนวนมาก รวมถึงของเสียจากการขับถ่ายของกุ้ง ซึ่งจะถูกย่อยสลายโดยแบคทีเรียเป็นกรดอมิโน กรดยูริก แอมโมเนีย ไนไตรท์ และไนเตรท เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีออกซิเจน ส่วนสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน เช่นในตะกอนดินบริเวณก้นบ่อ จะถูกย่อยสลายเกิดแก๊สไข่เน่า และมีเทน ทำให้สภาพแวดล้อมในการเลี้ยงกุ้งเสื่อมลง คุณภาพน้ำเริ่มเลวลง จนบางพื้นที่ไม่สามารถเลี้ยงกุ้งต่อไปได้ ของเสียที่เกิดขึ้นในบ่อนี้ถ้าไม่ได้รับการแก้ไข จะส่งผลกระทบต่อคุณภาพน้ำภายในบ่อ เมื่อคุณภาพน้ำในบ่อมีการเปลี่ยนแปลงที่เลวลง จะส่งผลกระทบต่อการอยู่รอดของกุ้ง และการปล่อยน้ำออกจากบ่อสู่แหล่งน้ำธรรมชาติจะเกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม เพราะของเสียในบ่อกุ้งมีปริมาณ BOD (Biochemical Oxygen Demand) ปริมาณ TSS (Total Suspended solid) และมีปริมาณแอมโมเนีย-ไนโตรเจนสูง มีผลต่อความเป็นพิษของสัตว์น้ำ (ชนินทร์, 2536) และจากการศึกษาของ Flegel และคณะ (1995) และ Direkbusarakorn (1997) ได้รายงานสอดคล้องกันว่าประสิทธิภาพของระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำลดลงมาก เมื่อกุ้งอยู่ในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำต่ำ (Dissolve oxygen) เป็นสาเหตุโน้มนำให้กุ้งมีการติดเชื้อแบคทีเรียได้ง่ายและตายในที่สุด โดยพบว่ากุ้งที่ทดลองให้มีการติดเชื้อเรืองแสงในชุดที่อยู่ในสภาวะที่มีออกซิเจนที่ละลายน้ำต่ำมีอัตราการตายมากกว่าชุดควบคุมที่เลี้ยงในสภาพที่มีออกซิเจนเพียงพอถึง 3 เท่า และจากสาเหตุของการเกิดโรคกุ้งที่กล่าวมาทั้งหมด ตรงกับหลักเบื้องต้นของการเกิดโรคตามรายงานของ Sneiszko (1974) ที่รู้จักการอย่างแพร่หลายนั้น ต้องประกอบไปด้วยองค์ประกอบ 3 อย่างคือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. สัตว์น้ำ หรือกุ้ง
2. สิ่งแวดล้อม
3. เชื้อโรค

กล่าวคือ การที่กุ้งจะเกิดโรคได้นั้นต้องเริ่มจากสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ทำให้กุ้งอ่อนแอ จนเชื้อโรคสามารถเข้าทำอันตรายต่อสัตว์น้ำนั้นได้ ซึ่งกับการศึกษาของ ศิริรัตน์ ที่กล่าวว่าปัจจัยสำคัญในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่สำคัญ มี 3 อย่างคือ ตัวกุ้ง สิ่งแวดล้อม ได้แก่น้ำ ดิน อากาศ ที่ต้องมีการจัดการที่ดี และจุลินทรีย์ก่อโรค ดังจะเห็นได้จากข้อมูลการศึกษาที่พบว่า แท้จริงแล้วระบบภูมิคุ้มกันกุ้งนั้นเป็นระบบที่มีประสิทธิภาพสูง เพราะกุ้งเป็นสัตว์หน้าดิน มีนิสัยกรกินสิ่งมีชีวิต และซากต่างๆบริเวณหน้าดินที่อุดมไปด้วยจุลินทรีย์นานาชนิด ดังนั้นในธรรมชาตินำ้เลือดกุ้งจึงมีสารยับยั้งแบคทีเรีย และเม็ดเลือดซึ่งคอยทำหน้าที่ในการกำจัดเชื้อโรคที่จะเข้าสู่ตัวกุ้ง อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพของระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ จะลดลงเมื่อกุ้งอยู่ในสภาวะเครียดหรือสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม จึงทำให้กุ้งเป็นโรค แต่การที่ใช้ยาปฏิชีวนะมาใช้ในรักษาโรค กลับเป็นการส่งเสริมการเกิดโรคที่รุนแรงขึ้น และยังมีปัญหาการกีดกันทางการค้าตามมาอีกด้วย

การแก้ไขปัญหา และแนวทางการเลี้ยงกุ้งกุลาดำในปี 2545

ในการที่จะทำให้ประเทศไทยยังคงรักษาความเป็นผู้นำของธุรกิจการเลี้ยงกุ้งในโลกไว้ได้ จำเป็นต้องมีการแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้น และหาแนวทางการเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบยั่งยืน ซึ่งมีแนวทางดังต่อไปนี้คือ

1. <u>ต้องลดต้นทุนในการผลิต</u> ผู้เลี้ยงต้องหาหนทางลดต้นทุนในการผลิต ซึ่งต้นทุนอันดับแรกคืออาหาร การให้อาหารต้องละเอียด ไม่ให้เหลือ ซึ่งนอกจากจะสิ้นเปลืองแล้ว ยังมีผลต่อคุณภาพน้ำและพื้นบ่อด้วย

2. <u>ป้องกันผลกระทบสิ่งแวดล้อม</u> ธุรกิจกุ้งกุลาดำประมาณ ร้อยละ 95 เพื่อการส่งออก ดังนั้นควรใช้ระบบการเลี้ยงที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม เช่น ระบบปิด โดยใช้น้ำหมุนเวียน ซึ่งนอกจากสามารถป้องกันหรือลดปัญหาการเกิดโรคได้ แล้วยังสามารถลดผลกระทบ ต่อสิ่งแวดล้อมได้มากด้วย จะได้ไม่เป็นข้ออ้างของประเทศผู้ซื้อ ที่ต้องการกีดกันทางการค้า เนื่องจากไทยเป็นผู้ส่งออกรายใหญ่ที่สุด

3. <u>ไม่มียาและสารตกค้าง</u> เนื่องจากประเทศผู้ซื้อกุ้ง มีกฎเกณฑ์ต่างๆเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภคในแต่ละประเทศ ดังนั้นการใช้ยาและสารเคมีใดๆต้องอยู่ภายใต้เงื่อนไขที่คณะกรรมการอาหารและยาของประเทศนั้นๆกำหนดไว้ ตัวอย่างเช่น ห้ามใช้ยาคลอแรมเฟนิคอล กับ สัตว์น้ำที่จะนำมาเป็นอาหาร โดยเด็ดขาด การมียาตกค้างแม้เพียงเล็กน้อย จะมีผลกระทบอย่างรุนแรง เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งต้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใช้ความระมัดระวัง ห้ามใช้ยาทุกชนิด 30 วัน ก่อนจับกุ้งขาย เพื่อให้แน่ใจว่าไม่มียาตกค้างในตัวกุ้ง การใช้สารเคมีอื่นๆ ก็ต้องมี กฎเกณฑ์ที่ชัดเจนตามที่คณะกรรมการอาหารและยา อนุญาติให้ใช้ได้เท่านั้น

นอกจากนี้ ระบบการเลี้ยงกุลาดำในอนาคต จะเป็นระบบการเลี้ยงที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม เพื่อการเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบยั่งยืน เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งควรมีความเข้าใจเกี่ยวกับการจัดการคุณภาพน้ำก่อนนำมาใช้เลี้ยงกุ้ง การจัดการคุณภาพน้ำระหว่างการเลี้ยงกุ้ง และการจัดการคุณภาพน้ำทิ้งหลังการใช้เลี้ยงกุ้งแล้ว เพื่อการนำน้ำทิ้งที่ผ่านบำบัดแล้ว กลับมาใช้เลี้ยงกุ้งได้ใหม่ หรือให้ได้มาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้งตามที่ทางราชการกำหนด

นอกจากนี้ ในกรณีของปัญหาที่เกิดจากโรคกุ้ง สถาพร (2543) แนะนำให้มุ่งเน้นศึกษาและหาแนวทางในการป้องกันโรค โดยดูจากองค์ประกอบโดยรวม ไม่ใช่การมองหาเพียงเชื้อโรคที่เป็นเพียงสาเหตุหนึ่งแล้วแก้โดยการใช้ยาและสารเคมี ซึ่งเป็นการแก้ไขปัญหาที่ปลายเหตุ และหลายๆครั้งก็ยังก็ให้เกิดปัญหาอื่นๆตามมาอีกด้วย ดังนั้นสิ่งที่ควรทำการศึกษาเพิ่มขึ้นได้แก่ การศึกษาความสัมพันธ์ระหวางสิ่งแวดล้อมกับการเกิดโรคและบทบาทและหน้าที่ของสิ่งมีชีวิตต่างๆในระบบนิเวศน์ของบ่อกุ้ง เนื่องจากอดีตจนถึงปัจจุบัน การเลี้ยงสัตว์แบบอุตสาหกรรมไม่สามารถหลีกเลี่ยงการใช้ยาผสมอาหารสัตว์ได้ จำเป็นต้องใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อป้องกันโรค ซึ่งหากเกิดโรคจะเกิดผลเสียหาย และการแก้ไขต้องเสียค่าใช้จ่ายสูง การเลี้ยงสัตว์แบบอุตสาหกรรมจึงใช้หลักป้องกันโรคโดยการใช้ยา แต่ในปัจจุบันและอนาคต มีทางเลือกใหม่สำหรับการเลี้ยงสัตว์ ด้วยการวางแผนการจัดการที่ดีและมีการใช้ สารเสริมชีวนะ หรือโปรไบโอติก (probiotics) ผสมอาหารสัตว์ตั้งแต่สัตว์วัยอ่อน จะช่วยให้จุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารสมดุล สัตว์แข็งแรง ไม่ป่วยและเป็นการลดการใช้ยาแก้ไขปัญหายาสัตว์ตกค้างในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ได้ นอกจากนี้ ในด้านผลกระทบสิ่งแวดล้อมของอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้ง ได้มีผู้ใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติก เพื่อจุดประสงค์ในการย่อยสลายของเสียในบ่อกุ้ง โดยประสบความสำเร็จอย่างเป็นที่น่าพอใจในการบำบัดของเสีย และที่สำคัญคือ สามารถกำจัดเชื้อก่อโรคที่เกิดจากแบคทีเรีย เช่นเชื้อ *Vibrio* โดยอาศัยกระบวนการทางนิเวศน์วิทยาและจุลินทรีย์ในการแข่งขัน (Competitive process) อีกด้วย

การใช้โปรไบโอติกในการควบคุมโรคกุ้งในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

การแก้ไขปัญหาโรคกุ้ง และปัญหาสิ่งแวดล้อมในบ่อเลี้ยงกุ้ง สามารถทำได้โดยการใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติก ซึ่งในที่สุดแล้วจะสามารถแก้ไข ปัญหาหารตกค้างของสารเคมีและยาปฏิชีวนะได้อีกด้วย ดังจะเห็นได้จากงานวิจัยของ Moriarty (1999) ได้มีการเสนอแนะว่าสามารถประยุกต์ใช้โปรไบโอติกกับอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยเติมไปในแหล่งที่มีแบคทีเรียอาศัยอยู่ตามธรรมชาติ ในบ่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพาะฟัก และในบ่อดินที่สัตว์เลี้ยงอาศัยอยู่เพราะแบคทีเรียโปรไบโอติกที่เติมลงไปเหล่านี้ จะไปปรับปรุงองค์ประกอบของแบคทีเรียที่มีอยู่แล้วในน้ำ และในตะกอน สัตว์จะมีสุขภาพดีขึ้น โดยการกำจัดหรือลดปริมาณความหนาแน่นของเชื้อโรคลง และเป็นการปรับปรุงคุณภาพน้ำ โดยเพิ่มอัตราการย่อยสลายอินทรีย์ที่เหลือทิ้งอยู่ในบ่อให้รวดเร็วขึ้น ซึ่งโรคติดเชื้อที่เกิดกับสัตว์น้ำและสัตว์บก จะแตกต่างกันตรงที่ สัตว์น้ำถูกรายล้อม และสัมผัสอยู่กับเชื้อก่อโรคที่ล่องลอยอยู่อย่างอิสระในน้ำ และสามารถฉวยโอกาสก่อโรคกับสัตว์นั้นๆได้ตลอดเวลา และการที่กุ้งเป็นโรคเนื่องมาจากการถูกจู่โจมด้วยเชื้อวิบริโอจำนวนมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เมื่อความรุนแรงของโรคได้ถูกทำให้เพิ่มมากขึ้น จากการให้ยาฆ่าเชื้อมากเกินไปในบ่อเลี้ยง จึงเป็นสิ่งที่ต้องมีการป้องกันจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆที่มีอยู่ในบ่อเลี้ยงกุ้งนั้น ต่างถูกกำหนดให้มีส่วนร่วมในการควบคุมเชื้อก่อโรค โดยจะมีจุลินทรีย์ 1 สายพันธุ์ที่มีการเจริญเติบโต และแบ่งตัวอย่างมากและรวดเร็วกว่าสายพันธุ์อื่นๆ ดังนั้นการเพิ่มจำนวนอย่างมากมายจึงข่มสายพันธุ์อื่นๆได้เกษตรกรสามารถเติมแบคทีเรีย หรือสาหร่ายสายพันธุ์ที่ต้องการลงไปในบ่อปริมาณมากๆ เพื่อเป็นการขับไล่จุลินทรีย์คู่แข่งออกไป ซึ่งถือว่าเป็นหนึ่งในกระบวนการทางนิเวศน์วิทยา โดยสามารถเพิ่มปริมาณสายพันธุ์ต่างๆของแบคทีเรีย เพื่อไปปรับปรุงสัดส่วนของจุลินทรีย์ที่มีอยู่แล้ว ให้มีสายพันธุ์ที่ต้องการมากขึ้น ในน้ำ ตะกอนดิน หรือสิ่งแวดล้อม แบคทีเรียที่เราต้องการให้มีในบ่อเลี้ยงกุ้ง สามารถเพิ่มปริมาณจำนวนมากได้ด้วยการหลั่งสารต่อต้านแบคทีเรียตัวอื่นออกมา โดยไม่จำเป็นต้องฆ่าคู่แข่งขันของมันทั้งหมด แต่เพิ่มอัตราการตายของคู่แข่งก็เพียงพอต่อการเพิ่มความสมดุล ของแหล่งอาหาร ยกตัวอย่างเช่น ถ้า *Bacillus* สายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะเพื่อยับยั้ง *Vibrio* ทำให้การตายของ *Vibrio* เพิ่มขึ้น ทำให้ *Bacillus* ข่มคู่แข่งได้มากขึ้น ถึงแม้สารปฏิชีวนะจะไม่ถูกสร้างออกมาในปริมาณความเข้มข้นไม่สูงพอที่จะฆ่า *Vbrio* ได้ทั้งหมด หรือโดยส่วนใหญ่ได้ก็ตาม

ระบบนิเวศน์ของจุลินทรีย์และเทคโนโลยีชีวภาพได้มีความก้าวหน้าไปมากในระยะเวลา 10 ปีที่ผ่านมา เป็นจุดที่ชี้ว่าผลิตภัณฑ์ทางการค้า และเทคโนโลยี มีประโยชน์ต่อการบำบัดน้ำและดินในพื้นที่ต่างๆ ได้อย่างกว้างขวาง โดยการเพิ่มความหนาแน่นของประชากรเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ หรือกิจกรรมทางชีวเคมีของมัน ซึ่งแบคทีเรียที่จะถูกเติมลงไปให้มีส่วนร่วมในการบำบัดน้ำและดินนี้ ต้องถูกคัดเลือกให้มีการทำงานทาจำเพาะเจาะจงในการบำบัด และต้องเติมลงไปในปริมาณและความหนาแน่นของเชื้อมากพอ และอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม จึงจะประสบความสำเร็จเป็นที่น่าพอใจในการบำบัดของเสีย

Moriarty (1999) ได้ให้ข้อแนะนำว่า การเพิ่มจำนวนสิ่งมีชีวิต และใช้โปรไบโอติก (จุลินทรีย์ปรับสภาพ) เป็นเครื่องมือในการจัดการที่เห็นผลได้อย่างชัดเจนสำหรับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ แต่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประสิทธิภาพของการใช้งานขึ้นอยู่กับ การทำความเข้าใจในธรรมชาติของการแข่งขันระหว่างชนิดของจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่อยู่ร่วมกันหรือชนิดของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่เติมลงไป เป็นต้น

การประยุกต์ใช้ *Bacillus* spp. เป็นโปรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงกุ้ง

จากการทดลองของ ศิริรัตน์(2540) ได้ทดลองใช้จุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* (Bs-11) ในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่าสามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในกุ้งได้ เช่น โรคเรืองแสง โดยได้ผสมเชื้อลงไปกับอาหารก่อน เช่นผสมลงไปในเนื้ออาหารโดยใช้ไข่แดง แต่พบว่าจุลินทรีย์ามารถซึมลงไปในเนื้ออาหารได้ จึงเปลี่ยนวิธีโดยเตรียมเชื้อโพรไบโอติกในลักษณะที่เป็นสารแขวนลอย ผสมลงไปกับอาหารกุ้ง แล้วจุลินทรีย์ที่กุ้งกินเข้าไปพร้อมกับอาหารก็เข้าสู่ลำไส้โดยตรง เมื่อกุ้งกิน *Bacillus subtilis* เข้าไประบบการย่อยอาหารจะยังคงเหมือนเดิม เปรียบเทียบกับการให้อาหารเลี้ยงกุ้งแบบธรรมดา กับอาหารที่ผสม *Bacillus subtilis* กุ้งที่กินอาหารที่ผสม *Bacillus subtilis* จะเจริญเติบโตได้เร็วกว่ากุ้งที่กินอาหารปกติถึง 25% และยังมีน้ำหนักเพิ่มขึ้นอีกด้วย และถึงแม้ว่าโปรไบโอติกที่เป็น *Bacillus subtilis* นี้จะไม่สามารถรักษาไวรัสได้ เพราะไวรัสมีการพัฒนาของโรคไปไวมากทำให้กุ้งตายทั้งบ่อ แต่โพรไบโอติกนี้จะช่วยชลอการตายของกุ้งได้ เพราะตั้งแต่คณะผู้วิจัยได้ทำการทดลองเลี้ยงกุ้งโดยใช้ *Bacillus subtilis* มา ไม่เคยมีการใช้ยาปฏิชีวนะเลย

นอกจากการใช้จุลินทรีย์ *Bacillus* spp. ในการบำบัดของเสียในดินและน้ำ ซึ่งได้รับความสำเร็จจากการใช้งานเป็นอย่างสูงในต่างประเทศ โดยอาศัยหลักการทำงานที่คล้ายคลึงกัน มาประยุกต์ใช้ *Bacillus* spp. เป็นโปรไบโอติกในอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และทำให้ประสบความสำเร็จในการใช้เชื้อจุลินทรีย์โพรไบโอติกเช่นเดียวกัน ซึ่ง *Bacillus* นี้ เป็นแบคทีเรียแกรมบวกและเป็นแบคทีเรียที่มีการใช้กันอย่างแพร่หลายในการรักษาโรคกุ้ง เพื่อเป็นแทนที่การใช้ยาปฏิชีวนะที่ใช้ในอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ *Bacillus* หลากหลายสายพันธุ์ พบได้โดยทั่วไปในตะกอนน้ำเค็ม ในดิน น้ำ และในลำไส้กุ้ง โดยการกินเข้าไปอย่างเป็นธรรมชาติของมัน และจากการที่แบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ที่อยู่ร่วมกันปริมาณมากในบ่อเลี้ยงกุ้งตามธรรมชาติ ซึ่งมีอยู่ในน้ำ บ่อเพาะฟัก และลำไส้ของกุ้ง สามารถถูกเปลี่ยนแปลงชนิดหรือองค์ประกอบได้อย่างง่ายดาย ดังนั้นจึงสามารถใช้หลักการนี้ก่อให้เกิดการพัฒนาการผลิตกุ้งได้ เช่น *Vibrio* เรืองแสงที่เป็นสาเหตุของโรคกุ้ง ก็จะสามารถถูกควบคุมได้ ซึ่งมีหลักฐานที่พิสูจน์ได้ ตัวอย่างการใช้งานโปรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงกุ้ง เช่น Vivcros Farm ใน Negros ซึ่งมีการเสียหายของผลผลิตจาก *Vibrio* เรืองแสง พบว่าถึงแม้จะมีการใช้ยาปฏิชีนะในอาหารเลี้ยงกุ้งและมีการป้องกันโรคแล้วในบางครั้ง *Vibrio* เรืองแสง ก็ยังพบอยู่เป็นจำนวนมากในน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้ง มักจะมีปริมาณเชื้อสูงถึง 10^3-10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตรภายใน 2-3 สัปดาห์ ของการถมที่ ใส่ปุ๋ย ปรับปรุงบ่อ อย่างไรก็ตาม เมื่อมีการใช้แบคทีเรียโปรไบโอติก ก็ไม่พบโรคนี้อีกเลย และในทางกลับกันพบว่ามี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณกุ้งที่รอดชีวิต สูงถึง 80-100 เปอร์เซ็นต์ ถึงแม้ว่าจะมีการตรวจพบสายพันธุ์ของ *Vibrio* เรืองแสงนี้ก็ตาม

นอกจากนี้ ยังพบว่าในบ่อเลี้ยงกุ้งแต่ละบ่อ ในประเทศฟิลิปปินส์ พบ *Vibrio* เรืองแสง เป็นจำนวนมากในตับอ่อนของกุ้งที่มีการใช้ยาปฏิชีวนะผสมกับอาหารในการเลี้ยง พบเป็นจำนวนถึง $1x10^4$ ต่อลำไส้กุ้ง แต่ปริมาณเชื้อ *Vibrio* เรืองแสง ลดลงเป็นศูนย์ เมื่อมีการใช้โปรไบโอติกในบ่อเลี้ยง จุลินทรีย์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติในลำไส้กุ้งมักจะตรวจเจอเชื้อ *Vibrio* ที่ให้ผลเป็นลบ มีโคโลนีสีเขียว บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS ส่วนสายพันธุ์ที่เรืองแสงที่พบในบ่อที่มีการรักษาโรคด้วยยาปฏิชีวนะ จะเป็นสายพันธุ์ที่ให้ผลเป็นบวก โดยมีโคโลนีสีเหลืองบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเมื่อใช้โพรไบโอติกก็จะพบว่าเข้าไปแทนที่เชื้อ *Vibrio* เหล่านี้ในปริมาณเท่าๆ กันหรือมากกว่าเชื้อก่อโรคเหล่านี้ ดังนั้นเกษตรกรหลายรายได้ค้นพบแล้วว่า ไม่สามารถแก้ปัญหาโรคที่เกิดจากเชื้อ *Vibrio* โดยการใช้ยาปฏิชีวนะได้อีกต่อไป

นอกจากนี้ยังพบว่าในบ่อเลี้ยงกุ้งของประเทศอินโดนีเซีย *Vibrio* เรืองแสงถูกกำจัดออกไปจากน้ำและตะกอนดินอย่างสมบูรณ์ หลังจากการทำการคัดเลือกสายพันธุ์โปรไบโอติก ที่สามารถไปยับยั้งเชื้อ *Vibrio* เรืองแสง เหล่านั้นได้โดยตรงใส่ลงไปในบ่อ ในทางตรงกันข้าม ปริมาณของเชื้อ *Vibrio* เพิ่มสูงอย่างเห็นได้ชัดจาก ประมาณ 20 ถึงมากกว่า 200 CFR/mL ในบ่อเลี้ยงกุ้งที่มีการใช้ยาปฏิชีวนะซึ่งใช้ผสมลงไปกับอาหารกุ้ง แต่ในทุกบ่อที่ได้มีการใช้โปรไบโอติกพบว่ากุ้งมีอัตราการรอดชีวิตสูงทำให้ผลผลิตที่ได้สูงตามไปด้วย

ข้อมูลที่ได้นี้แสดงให้เห็นว่าปัญหาโรคกุ้งสามารถแก้ไขได้ด้วยการใช้เทคโนโลยีชีวภาพ นั่นคือการใช้โปรไบโอติกเข้ามาช่วย ซึ่งเป็นการประยุกต์ใช้จุลชีวะนิเวศน์วิทยา (microbialecology) เป็นกลไกทางธรรมชาติ โดยการใช้แบคทีเรียแข่งขันต่อต้านกับเชื้ออื่นๆที่เราไม่ต้องการออกไป นอกจากนี้ประโยชน์ของการใช้โปรไบโอติกยังส่งเสริมการอยู่ร่วมกันของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในสิ่งแวดล้อมตามธรรมชาติในพื้นที่เพาะเลี้ยง , เป็นการลดปริมาณน้ำที่ใช้ เพราะสามารถลดการเปลี่ยนน้ำลงได้มาก และสามารถนำน้ำกลับมาใช้ได้อีกครั้งในระหว่างรอบการเลี้ยงกุ้ง ดังนั้นการส่งผลกระทบสิ่งแวดล้อมรวมถึงการนำมาซึ่งของเชื้อก่อโรค จึงเกิดขึ้นน้อยมาก ดังนั้นในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจะต้องมีลดการใช้ยาปฏิชีวนะลง เพราะการส่งผ่านยีนดื้อยาไปสู่แบคทีเรียที่ก่อโรคในมนุษย์จะเป็นสิ่งที่ร้ายแรงต่อความเป็นอยู่ของมนุษย์ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 28684

การใช้ *Bacillus* spp. ในการบำบัดของเสียในบ่อกุ้ง

นอกจากจะมีการประสบความสำเร็จในการใช้เชื้อ *Bacillus* spp. เป็นจุลินทรีย์โปรไบโอติกในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์บก และในสัตว์น้ำ แล้ว ยังพบว่า เชื้อกลุ่มนี้เป็นเชื้อที่มีการใช้ในการบำบัดสารอินทรีย์ในบ่อกุ้งได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งจากการทดลองของ ศิริรัตน์(2540) ได้สรุปไว้ว่า นอกจาก *Bacillus subtilis* (Bs-11) จะสามารถแก้ไขปัญหาโรคเรืองแสง ที่เกิดจากเชื้อ *Vibrio harveyi* ได้ผลอย่างน่าพอใจแล้ว ยังพบว่า การใช้ *Bacillus subtilis* (Bs-11) ในน้ำเค็มจะให้ผลดีที่สุด ในการทำให้ระบบนิเวศน์ของบ่อดีขึ้น ขี้เลนไม่มาก ซึ่งขี้เลนนี้เกิดจากอาหารและขี้กุ้งและนอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ *Bacillus subtilid* นี้ ยังมีประโยชน์ต่อดินเช่นกัน โดยตัวมันจะช่วยย่อยสลายดินได้ด้วย

วรพจน์และเกวลี (2545) ได้ทำการศึกษาความสามารถของแบคทีเรียเพื่อใช้ย่อยสลายสารอินทรีย์ในบ่อเลี้ยงกุ้ง พบว่า *Bacillus cereus* S1 สามารถย่อสลายโปรตีนได้ดี ในขณะที่ *Bacillus subtilis* มีศักยภาพในการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต และ *Bacillus cereus* S5 สามารถย่อยสลายไขมันได้ดีที่สุด แต่การใช้ *Bacillus cereus* ซึ่งเป็น แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในคน ดังนั้น การใช้เชื้อนี้ในการเลี้ยงกุ้งจึงยังเป็นปัญหาที่จะต้องทำการศึกษาและควบคุมสภาวะเพื่อไม่ให้เกิดการติดเชื้อในคนต่อไป

ข้อมูลเบื้องต้นของ *Bacillus subtilis* (Bs)

ลักษณะของ *Bacillus* spp.

Bacillus spp. เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ลักษณะรูป่างเป็นท่อนขนาด 0.3 x 2.2 ไมโครเมตร ถึง 1.2 x 7.0 ไมโครเมตร เคลื่อนที่ได้ด้วยการใช้แฟลกเจลลา *Bacillus* spp. สามารถสร้างสปอร์ภายในเซลล์เรียกว่าเอนโดสปอร์ เมื่ออยู่ภายใต้สภาวะขาดแคลนอาหารหรือสิ่งแวดล้อมไม่เหมาะสม เอนโดสปอร์มีรูปร่างแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อ เช่น กลม รี หรือ ทรงกระบอก และฝังตัวอยู่กลางเซลล์หรือด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ เอนโดสปอร์มีสมบัติทนต่อแสงยูวี ความร้อน สภาวะแห้งและสารเคมีต่างๆ ได้ดีกว่าเซลล์มีชีวิต *Bacillus* spp. เจริญได้ดีในอาหารเพาะเลี้ยงหลายชนิดแม้ในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำ โดยที่องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อลักษณะของโคโลนี เช่น ลักษณะกลมหรือไม่กลม ทึบแสง มีสีครีม สีน้ำตาล บางสายพันธุ์มีสีแดง ส้ม ดำ *Bacillus* spp. เจริญได้ดีที่อุณหภูมิกว้างคือ –5 ถึง 75 องศาเซลเซียส แต่ส่วนใหญ่ชอบอุณหภูมิปานกลาง เมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใน 24 ชั่วโมง เชื้อจะเจริญและมีโคโลนีขนาดใหญ่ *Bacillus* spp.บางสปีชีส์เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง เช่น *B. stearothermophilus* เจริญได้ที่ 55 – 70 องศาเซลเซียส โดยปกติมักบ่มที่ 60 องศาเซลเซียส และไม่เจริญที่ 37 องศาเซลเซียส *B. coagulans* เจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลาง คือ 45 – 50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

องศาเซลเซียส *B. thuringiensis* และ *B. cereus* เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25 – 30 องศาเซลเซียส *Bacillus* spp. ทนความเค็มได้เมื่อมีโซเดียมคลอไรด์ 2-25 เปอร์เซ็นต์ (Buchanan และ Gibbons, 1974)

ลักษณะของจุลินทรีย์ *Bacillus subtilis*

B. subtilis เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งเจริญที่อุณหภูมิปานกลาง สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และสามารถใช้สารประกอบอินทรีย์ได้หลายชนิดและเจริญได้ดีในสูตรอาหารอย่างง่ายที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานรวมถึงมีเกลือแอมโมเนียมเป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน เมื่อเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารสังเคราะห์ที่เป็นอาหารแข็ง เช่น Nutrient broth (NB) และ Nutrient agar (NA) โคโลนีจะแบน แห้ง และมีขนาดใหญ่ ลักษณะโคโลนีจะเปลี่ยนแปลงไปตามอายุ (Harwood และ Archibuld, 1990) โคโลนีอาจกลมหรือไม่กลม ขอบไม่เรียบ ผิวนูน สีขุ่น อาจมีลักษณะย่น สีครีม หรือน้ำตาล ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของอาหารแข็งที่ใช้เพาะเลี้ยง (Buchanan และ Gibbons, 1974) และจุลินทรีย์จะเจริญได้ดีเมื่ออาหารแข็งนั้นมีความชื้นเหมาะสม

B. subtilis เริ่มสร้างเอนโดสปอร์กว้าง 0.8 ไมโครเมตร ยาว 1.2 – 1.8 ไมโครเมตร เมื่ออยู่ภายใต้สภาวะขาดแคลนอาหารหรือสิ่งแวดล้อมไม่เหมาะสม เช่น ความร้อน ความเย็น ความแห้ง หรือแม้แต่สารเคมีที่เป็นพิษต่อเซลล์

B. subtilis เหมาะสมที่จะใช้เป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคโดยชีววิธี ซึ่งเป็นการลดกิจกรรมการก่อโรคของเชื้อสาเหตุของโรค (สุชล, 2539) ในกระบวนการแข่งขัน จุลินทรีย์ปฏิปักษ์สามารถแข่งขันกับเชื้อสาเหตุของโรคพืชและสัตว์ในด้านต่างๆ เช่น การใช้ธาตุ อาหาร อากาศ และการครอบครองพื้นที่ได้ดีกว่า ทำให้เชื้อสาเหตุของโรคไม่สามารถเจริญในบริเวณที่มีจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ กระบวนการแข่งขันที่พบมากคือ การนำธาตุอาหารหรือสารต่างๆ ที่มีอยู่ในดินหรือสภาพแวดล้อมมาใช้ โดยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์อาจจะสร้าง siderophore ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีมวลโมเลกุลต่ำมีความสามารถในการจับกับ Fe^{3+} ได้เป็นอย่างดี ประโยชน์ของ siderophore คือการนำ Fe^{3+} เข้าไปภายในเซลล์ของจุลินทรีย์โดยกระบวนการ active transport เนื่องจากธาตุเหล็กมีมากในดินแต่อยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำ จุลินทรีย์ไม่สามารถนำไปใช้ได้จึงต้องอาศัย siderophore (Kloepper และคณะ. 1980) จุลินทรีย์ที่ผลิต siderophere จะได้เปรียบจุลินทรีย์อื่นในการแข่งขันการนำธาตุเหล็กมาใช้ โดยเฉพาะในสภาพที่มีธาตุเหล็กปริมาณน้อย

B. subtilis เหมาะสมที่จะใช้ในการควบคุมโดชีววิธี เนื่องจากสามารถแย่งสารอาหารได้ดีกว่าจุลินทรีย์อื่นๆ ในสภาวะแวดล้อมที่ขาดแคลนอาหาร เป็นจุลินทรีย์ที่มีอยู่แล้วในธรรมชาติ มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความสามารถในการปรับตัวและทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่แปรเปลี่ยน และไม่เหมาะสมโดยการสร้างเอนโดสปอร์ และทนทานต่อสภาพอากาศร้อนชื้นซึ่งเป็นสภาพโดยทั่วไปของประเทศไทยได้ดี

ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ในด้านโปรไบโอติกและการบำบัดน้ำเสีย

ผลิตภัณฑ์กลุ่มจุลินทรีย์ที่เกษตรกรให้ความสนใจใช้ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้ง มีดังต่อไปนี้

ผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก

เป็นสินค้าที่มีจุลินทรีย์มีชีวิต อันก่อให้เกิดประโยชน์กับร่างกายสิ่งมีชีวิต ที่นำมาผสมอาหารให้กุ้งกิน เพื่อทำให้กุ้งมีสุขภาพดี และป้องกันการเกิดโรคของแบคทีเรียต่างๆ โดยจะให้กุ้งกินในขณะที่กุ้งยังไม่แข็งแรง และจะหยุดการให้โปรไบโอติก เมื่อกุ้งในบ่อมีการติดเชื้อโรคแบคทีเรีย และมีการให้ยาปฏิชีวนะ

ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์

มีการแนะนำให้เกษตรกรใส่ลงไปในบ่อโดยตรง เพื่อย่อยของเสียในบ่อเลี้ยงกุ้ง ได้แก่ สารอินทรีย์ แอมโมเนีย ไนไตรท์ เป็นต้น และช่วยรักษาสิ่งแวดล้อม ในกรณีที่มีการใช้ยาฆ่าเชื้อในบ่อ ยาฆ่าเชื้อนั้นจะมีผลทำลายจุลินทรีย์ทุกชนิด ดังนั้นเกษตรกรควรเติมจุลินทรีย์หลังจากหยุดใช้ยาฆ่าเชื้อประมาณ 8 ชั่วโมง เพื่อทดแทนจุลินทรีย์ที่ลดจำนวนจากยาฆ่าเชื้อ

รูปแบบของผลิตภัณฑ์

จุลินทรีย์ในปัจจุบันนี้ มีมากมายทั้งชนิดผง และชนิดน้ำ ซึ่งจะมีความเหมาะสมในแต่ละการประยุกต์ใช้งานแตกต่างกัน โดยข้อดีของจุลินทรีย์ผลคือ เก็บไว้ได้นาน สะดวกสบายในการขนส่ง ส่วนใหญ่จุลินทรีย์โปรไบโอติกจะใช้ในรูปของจุลินทรย์น้ำ เช่นจากงานวิจัยของ ศิริรัตน์(2540) โดยได้ทดลองผสมเชื้อลงไปกับอาหารก่อน เช่นผสมลงไปในเนื้ออาหารโดยใช้ไข่แดง แต่พบว่าจุลินทรีย์สามารถซึมลงไปในเนื้ออาหารได้ จึงเปลี่ยนวิธีโดยเตรียมเชื้อโปรไบโอติกในลักษณะที่เป็นสารแขวนลอย ผสมลงไปกับอาหารกุ้ง แล้วจุลินทรีย์ที่กุ้งกินเข้าไปพร้อมกับอาหารก็เข้าสู่ลำไส้โดยตรง แต่ข้อเสียของจุลินทรีย์น้ำคือ ขนส่งลำบาก ง่ายต่อการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ ที่เราไม่ต้องการ และมีโอกาสเน่าเสียได้ง่าย จำเป็นต้องใส่สารเคมีในการป้องกันการเน่าเสียดังกล่าว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

19720

บทที่ 3
ขั้นตอนการดำเนินการทดลอง

3.1 อุปกรณ์

เครื่องแก้วสำหรับวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์

กล้องจุลทรรศน์

เครื่อง spectrophotometer รุ่น spectro 22

เครื่อง UV spectrophotometer รุ่น UV-1601

เครื่อง Dissolve oxygen

เครื่องมือสำหรับวิเคราะห์หาเอนไซม์

เครื่อง pH meter

เครื่อง centrifuge

Vortex mixer

Water bath

3.2 วัตถุดิบ

ใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากอาหารสัตว์ คือ

-*Bacillus subtilis*(GP522)

-*Bacillus subtilis*(GP525)

3.3 การเตรียมกล้าเชื้อ

เพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* GP522 และ *B.subtilis* GP525 บนอาหารเอียง TSA นาน 20-24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเขี่ยเชื้อจำนวน 1 ลูป ลงในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว TSB 10 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้เชื้อที่มีความเข้มข้น 10^8 cfu/ml.หลังจากนั้นทำการเจือจางเชื้อให้เหลือ 10^6 cfu/ml.

3.4 การเลี้ยงเชื้อ

ถ่ายกล้าเชื้อ 1 มล. ลงในฟลาสก์ขนาด 200 มล. ที่มีอาหารเหลว TSB 100 มล.จะได้เชื้อเริ่มต้น 10^4 cfu/ml. โดยทำในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า จากนั้นเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 8, 16 และ 24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯ ลาดกระบัง

3.5 การวิเคราะห์ตัวอย่าง

การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างประกอบไปด้วย การตรวจวิเคราะห์จำนวนเซลล์มีชีวิตทั้งหมด (Total plate count), ปริมาณสปอร์, การย้อมเอนโดสปอร์, การวัดค่าการดูดกลืนแสง(OD)ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร, การวัดค่า Dissolve oxygen(DO), การตรวจวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสและเอนไซม์โปรติเอส ซึ่งในการวิเคราะห์ตัวอย่างนี้จะทำการทดสอบ 2 ซ้ำ

3.5.1 การตรวจวิเคราะห์จำนวนเซลล์มีชีวิตทั้งหมด

ทำการนับเชื้อโดยใช้วิธี Spread plate technique โดยมีขั้นตอนการวิเคราะห์ ดังนี้

3.5.1.1 เตรียมการเจือจางตัวอย่างเชื้อ *B.subtilis* ทั้ง 2 สายพันธุ์ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม (10^2-10^8 cfu/ml.)ในสารละลายเปปโตน 0.1 % ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

3.5.1.2 ใช้ปิเปตดูดเชื้อดังกล่าวที่เจือจางแล้ว 0.1 มิลลิลิตร ลงบนหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA บนจานเลี้ยงเชื้อ

3.5.1.3 ใช้แท่งแก้วที่จุ่มด้วยแอลกลฮอล์ 95% ลนไฟ รอจนแท่งแก้วเย็น นำไปกระจายเชื้อให้ทั่วผิวหน้าของอาหาร โดยใช้มือหมุนจาน ทิ้งไว้ 5-10 นาที

3.5.1.4 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยทำตัวอย่างละ 2 ซ้ำ ในแต่ละความเจือจางที่ใช้

3.5.1.5 ทำการตรวจนับโคโลนีต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ได้ในแต่ละความเจือจางที่ทำ โดยหาค่าเฉลี่ยออกมา นำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าจำนวนเซลล์มีชีวิตทั้งหมด ให้มีหน่วยเป็น cfu/ml. โดยนำค่าเฉลี่ยของโคโลนีต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ คูณด้วย 10 และคูณด้วยจำนวนที่เจือจางเบื้องต้น

3.5.2 การตรวจหาปริมาณสปอร์

การศึกษาหาปริมาณสปอร์ ใช้วิธีเดียวกันกับการตรวจวิเคราะห์จำนวนเซลล์มีชีวิตทั้งหมด แต่ทำก่อนการเจือจาง ให้นำตัวอย่างที่เก็บมาฆ่าเซลล์ที่มีชีวิตที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ก่อน และคำนวณมีหน่วยการนับเป็น cfu/ml.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.3 การย้อมเอนโดสปอร์

3.5.3.1 เตรียมสไลด์สเมียร์เชื้อและตรึงเซลล์แล้วโดยผ่านเปลวไฟ วางบนลวดรองสไลด์แล้วนำไปวางพาดบนสามขา(ใช้กระดาษฟางหรือกระดาษหนังสือพิมพ์ รองบนพื้นโต๊ะปฏิบัติการ เพื่อป้องกันไม่ให้สีไหลเปื้อนโต๊ะปฏิบัติการ)

3.5.3.2 หยดสี malachite green ให้ท่วมรอยสเมียร์ พร้อมทั้งจัดให้สไลด์อยู่ในแนวราบ เพื่อป้องกันสีหยดลงบนโต๊ะ

3.5.3.3 ใช้ตะเกียงบุนเสนปรับเปลวไฟให้ต่ำๆแล้วเลื่อนเข้าไปลนใต้สไลด์(อย่าลนอยู่ที่เดียวจะทำให้สไลด์แตก) เมื่อมีไอสีเกิดขึ้นก็ให้เลื่อนตะเกียงออก อย่าให้สีเดือด ทำซ้ำเช่นนี้และคอยเติมสีอยู่เรื่อยๆ อย่าให้สีแห้ง จนครบเวลา 10 นาที วิธีการให้ความร้อนในขณะหยดสี malachite green อาจกระทำได้อีกวิธี คือการอังบนไอน้ำเดือด โดยวางกระป๋องเคลือบที่มีน้ำ บนสามขาแล้วต้มให้เดือด แล้วจึงวางสไลด์ที่สเมียร์เชื้อและฟิกซ์แล้ว พาดบนปากกกระป๋องพร้อมทั้งหยดสี malachite green คอยเติมสีอย่าให้แห้ง จนครบเวลาที่กำหนด

3.5.3.4 เมื่อสไลด์เย็นแล้ว นำไปล้างสีออกโดยผ่านน้ำประปาเบาๆ จนน้ำล้างไม่มีสีติดออกมา ซับให้แห้งด้วยกระดาษซับ

3.5.3.5 ย้อมทับ(counterstain) โดยการหยดสี safanin O ลงให้ท่วมบริเวณรอยสเมียร์ ทิ้งไว้นาน 1 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำประปา ซับให้แห้งแล้วนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศ์

3.5.4 การตรวจวัดความเข้มข้นของเชื้อจุลินทรีย์ TSB

ทำการตรวจวัดความเข้มข้นของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB โดยการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรโดยใช้เครื่อง spectrophotometer ซึ่งก่อนนำตัวอย่างไปตรวจวัดจะต้องนำตัวอย่างไปปั่นโดยใช้เครื่อง vortex เนื่องจากเชื้อที่เจริญอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB จะมีลักษณะเป็นกลุ่มก้อน

3.5.5 การตรวจวัดปริมาณออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB

ทำการตรวจวัดปริมาณออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB โดยใช้เครื่อง Dissolve oxygen ในการตรวจวัดปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.6 การตรวจวิเคราะห์เอนไซม์อะไมเลส

3.5.6.1 การเตรียมกราฟมาตราฐานกลูโคส

1. ปิเปตน้ำกลั่นและสารละลายกลูโคสมาตราฐาน 5 μmole/ml. ดังนี้

หลอดที่	1	2	3	4	5
น้ำกลั่น(ml.)	0.8	0.6	0.4	0.2	0
สารละลายกลูโคส 5 μmole/ml. (ml.)	0.2	0.4	0.6	0.8	1

↓

2. เติมสารละลาย DNS 1 ml. ในแต่ละหลอด นำไปต้มในน้ำเดือด 3 นาที รีบทำให้เย็นโดยแช่ในน้ำเย็น

↓

3. เติมน้ำกลั่น 10 ml. เขย่าให้เข้ากัน

↓

4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm.

↓

5. นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณกลูโคส(μg/ml.)

3.5.6.2 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ในตัวอย่าง

1. เติมสลล.เอนไซม์เจือจาง 0.5 ml. ลงในหลอดทดลอง บ่มที่ 37 ^{o}C 5 นาทีใน Water bath

↓

2. เติม Soluble starch 1 % ใน 0.05 M phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 0.5 ml. บ่มที่ 37 ^{o}C นาน 30 นาทีใน Water bath

↓

3. หยุดปฏิกิริยาโดยเติม สารละลายDNS 1 ml. ในแต่ละหลอด นำไปต้มในน้ำเดือด 3 นาที แล้วทำให้เย็น

↓

4. เติมน้ำกลั่น 10 ml. เขย่าให้เข้ากัน

↓

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm.โดยใช้น้ำกลั่นเป็น Blank

↓

6. ทำหลอดควบคุมโดยเติมสารละลายเอนไซม์ 0.5 ml.

↓

7. แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายDNS 1 ml. ก่อนใส่ Soluble starch 1% ปริมาตร 0.5 ml. นำไปต้มในน้ำเดือด 3 นาที รีบทำให้เย็นโดยแช่ในน้ำเย็น

↓

ทำตามขั้นตอนเดิมตั้งแต่ข้อ 4. แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนาณหาปริมาณเอนไซม์อะไมเลส

3.5.7 การตรวจวิเคราะห์เอนไซม์โปรติเอส

3.5.7.1 การเตรียมกราฟมาตรฐาน Tyrosine

1. เตรียมสารละลาย Tyrosine ความเข้มข้น 10 20 40 50 60 80 μg/ml. นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 275 นาโนเมตร

↓

2. นำข้อมูลที่ได้ไปเขียนกราฟระหว่างการดูดกลืนแสงกับปริมาณ Tyrosine

3.5.7.2 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ในตัวอย่าง

1. เติมสารละลายเคซีน 0.5 % ใน 0.1 M Tris-HCl buffer pH 7.1 ปริมาตร 5 ml. ลงในหลอดทดลองบ่มที่ 37 ^{o}C นาน 5 นาทีใน Water bath

↓

2. เติมสารละลายเอนไซม์เจือจางที่เหมาะสม 1.0 ml. ในหลอดทดลอง บ่มที่ 37 ^{o}C นาน 10 นาทีใน Water bath

↓

3. หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมสารละลาย 0.3 M Trischloroacitic acid 5 ml. ลงในแต่ละหลอด

↓

4. เหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3500 รอบ/นาที นาน 10 นาที กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 2 ก่อนนำมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร โดยใช้ TCA เป็น Blank

↓

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

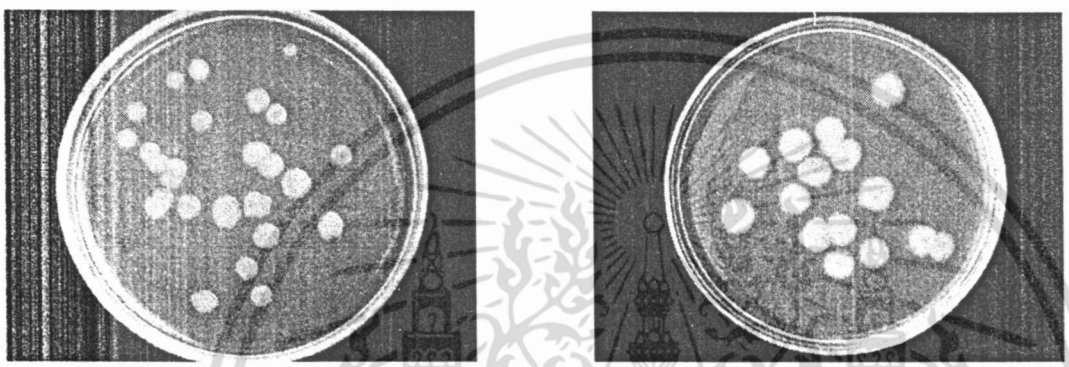
5.ทำหลอดควบคุมโดยการเติมสารละลายเอนไซม์ 1.0 ml. ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลาย TCA 5 ml. ก่อนสารใส่สารละลายเคซีน 0.5 % ปริมาตร 5 ml. แล้วทำเหมือนข้อ 4.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลอง

4.1 ผลการตรวจนับปริมาณเชื้อทั้งหมดที่สภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า

จากตัวอย่างในแต่ละชั่วโมงที่เก็บได้นำมาทำการตรวจนับเชื้อจุลินทรีย์โดย Spread plate technique ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA (ดังรูปที่ 1) ซึ่งจะได้ผลการตรวจนับดังตารางที่ 2 กล่าวคือ



B.subtillis GP522 *B.subtilis* GP525

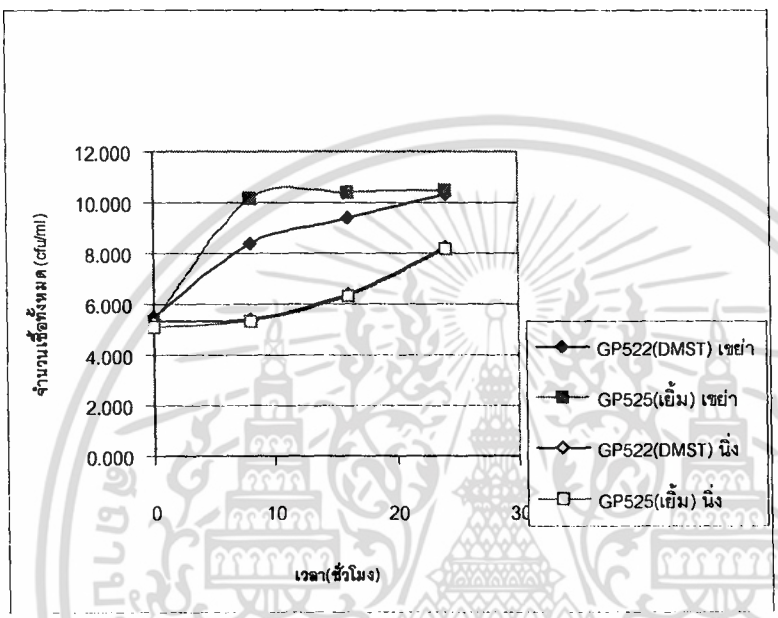
รูปที่ 1 ตัวอย่างการตรวจนับเชื้อจุลินทรีย์โดย Spread plate technique ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA

ตารางที่ 2 แสดงปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดของเชื้อ *B.subtilis* GP522 และ GP525 ที่สภาวะนิ่งและเขย่า

การตรวจนับเชื้อจุลินทรีย์โดย Spread plate technique			
สภาวะ	เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณ *B.subtilis* GP522 (cfu/ml.)ใน PCA	ปริมาณ *B.subtilis* GP525 (cfu/ml.)ใน PCA
นิ่ง	0	2.125×10^{5}	1.255×10^{5}
	8	2.520×10^{5}	1.950×10^{5}
	16	2.550×10^{6}	2.200×10^{6}
	24	1.740×10^{8}	1.310×10^{8}
เขย่า	0	2.680×10^{5}	2.350×10^{5}
	8	2.580×10^{8}	1.510×10^{10}
	16	2.310×10^{9}	2.530×10^{10}
	24	2.040×10^{10}	2.860×10^{10}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

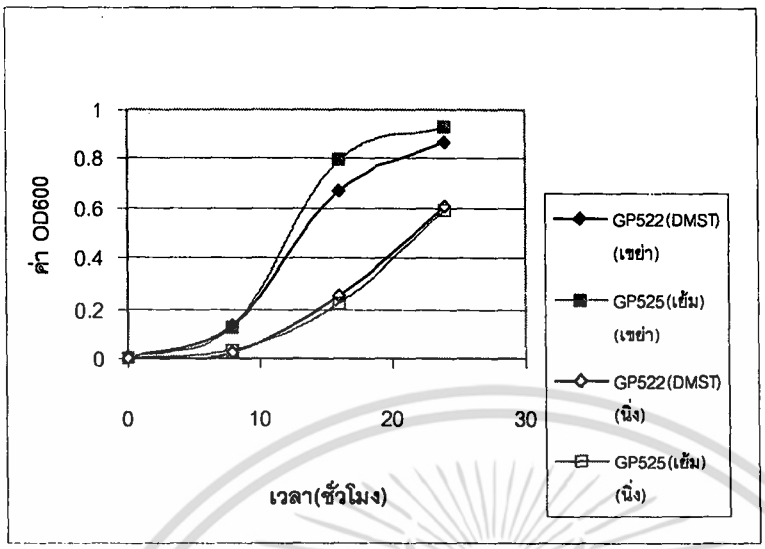
จากผลการตรวจนับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดของเชื้อ *B.subtilis* GP522 และ GP525 ภายใต้สภาวะนิ่งและเขย่า พบว่าทั้งสองสภาวะจะมีการเจริญของเชื้อ *B.subtilis* ทั้งสองสายพันธุ์เมื่อเวลาเพิ่มขึ้น(ตาราง2) โดยที่สภาวะเขย่าจะมีการเพิ่มขึ้นของเชื้อมากกว่าสภาวะนิ่ง และในสภาวะเขย่าเชื้อ *B.subtilis* GP525 เจริญเติบโตได้ดีกว่า GP522 (ดังรูปที่ 2)



รูปที่ 2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเชื้อทั้งหมด log(cfu/ml.)กับเวลา(ชั่วโมง)ที่สภาวะนิ่งและเขย่า

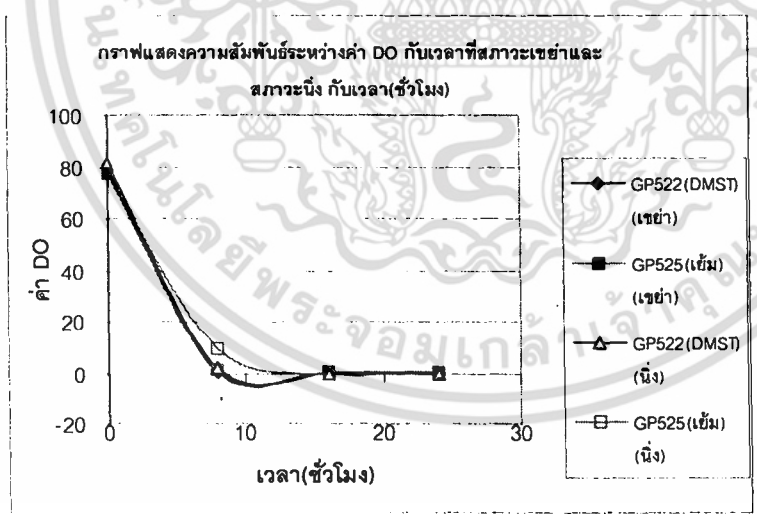
นอกจากนี้เมื่อทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น(OD) 600 นาโนเมตร(รูปที่ 3) พบว่า มีความสัมพันธ์สอดคล้องกับการตรวจนับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดของ *B.subtilis* GP522 และ GP525 ที่สภาวะนิ่งและเขย่าในตารางที่ 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD_{600} กับเวลา(ชั่วโมง)ที่สภาวะนิ่งและเขย่า

จากการศึกษาอัตราการใช้อากาศของเชื้อโดยการวัดค่า Dissolve oxegen(DO) พบว่าเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์มีการใช้อากาศในการเจริญเติบโต ดังรูปที่ 4 ซึ่งพบว่าที่สภาวะนิ่งออกซิเจนหมดไปตั้งแต่เริ่มต้นการเพาะเลี้ยง ในขณะที่สภาวะเขย่ามีออกซิเจนให้เชื้อเจริญมากกว่า



รูปที่ 4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าDO กับเวลา(ชั่วโมง)ที่สภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลการตรวจนับปริมาณสปอร์ที่สภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า

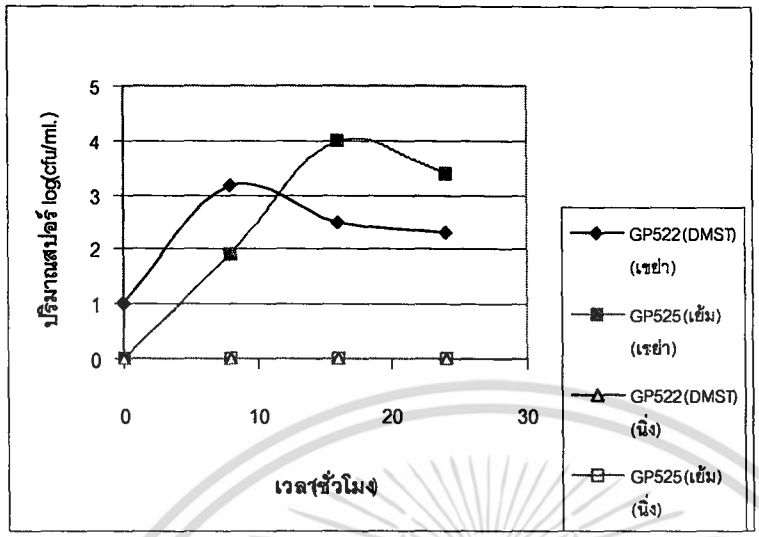
จากการตรวจนับสปอร์จากตัวอย่างที่เก็บได้จากเวลาที่ 0, 8, 16 และ 24 ชั่วโมง (ในตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 แสดงปริมาณสปอร์ของเชื้อ *B.subtilis* GP522 และ GP525 ที่สภาวะนิ่งและเขย่า

การตรวจนับเชื้อจุลินทรีย์โดย Spread plate technique			
สภาวะ	เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณ *B.subtilis* GP522 (cfu/ml.)ใน PCA	ปริมาณ *B.subtilis* GP525 (cfu/ml.)ใน PCA
นิ่ง	0	0	0
	8	0	0
	16	0	0
	24	0	0
เขย่า	0	1.00×10^{1}	0
	8	1.50×10^{3}	8.40×10^{1}
	16	3.00×10^{2}	9.50×10^{3}
	24	2.00×10^{2}	2.50×10^{3}

ผลการตรวจนับจำนวนสปอร์ พบว่าในสภาวะเขย่าเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถผลิตสปอร์ได้ดีกว่าในสภาวะนิ่ง โดยสปอร์ GP525 มีการผลิตสูงสุดที่เวลา 16 ชั่วโมง แต่สำหรับสปอร์ GP522 มีการเจริญสูงสุดที่เวลา 8 ชั่วโมง หลังจากชั่วโมงที่ 24 เชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์จำนวนสปอร์จะน้อยลง และจากการเปรียบเทียบการสร้างสปอร์ของ 2 สายพันธุ์ พบว่า GP525 จะมีอัตราการสร้างสปอร์ที่สูงกว่า GP522 เกือบ 1 log cycle ดังแสดงในรูปที่ 5

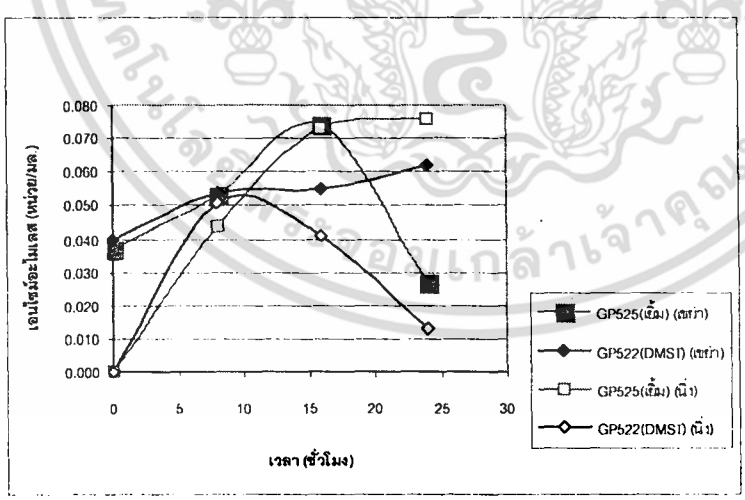
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสปอร์ log(cfu/ml)กับเวลา(ชั่วโมง)ที่สภาวะนิ่งและเขย่า

4.3 ผลการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส

ผลการศึกษาการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส พบว่าในทั้งในสภาวะนิ่งและเขย่าเชื้อ GP525 สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ดีกว่า GP522 โดยที่เวลา 16 ชั่วโมงเชื้อ GP525 จะสร้างได้มากที่สุดซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.074 หน่วย/มล. แต่สำหรับเชื้อ GP522 จะผลิตได้สูงสุดที่เวลา 24 ชั่วโมงในสภาวะเขย่าซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.027 หน่วย/มล.

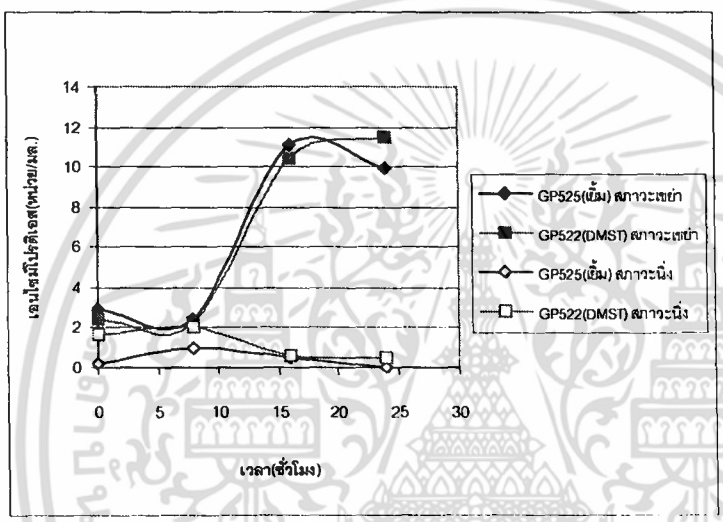


รูปที่ 6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่ากิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสกับเวลา(ชั่วโมง)ที่สภาวะนิ่งและเขย่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส

จากผลการศึกษาการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส พบว่าในสภาวะเขย่าเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถสร้างเอนไซม์ได้ดีกว่าสภาวะนิ่ง โดยที่เชื้อ GP525 จะผลิตได้สูงสุดที่เวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งมีค่าเท่ากับ 11.513 หน่วย/มล. และในเชื้อ GP522 จะผลิตได้สูงสุดที่เวลา 16 ชั่วโมงซึ่งมีค่าเท่ากับ 11.046 หน่วย/มล.



รูปที่ 7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสกับเวลา(ชั่วโมง)ในสภาวะนิ่งและเขย่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

1. จากการทดลองเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* 2 สายพันธุ์ คือ *B. subtilis* GP522 และ *B. subtilis* GP525 ใน 2 สภาวะคือ สภาวะนิ่ง และสภาวะเขย่า จากการตรวจนับเชื้อจุลินทรีย์โดยใช้วิธี spread plate technique และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เพื่อดูการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ พบว่า *B. subtilis* GP525 เจริญเติบโตได้ดีกว่า *B. subtilis* GP522ในสภาวะเขย่า แต่ในสภาวะนิ่ง *B. subtilis* GP522 เจริญได้ดีกว่าเล็กน้อย และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของการเจริญในสภาวะเขย่า และสภาวะนิ่ง พบว่า *B. subtilis* ทั้ง 2 สายพันธุ์ มีการเจริญในสภาวะเขย่าได้ดีกว่าสภาวะนิ่ง

2. จากค่า Dissovle Oxigen (DO) จะพบว่า ค่า DO มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของการเจริญของเชื้อ *B. subtilis* และการสร้างสปอร์ โดยที่สภาวะเขย่าจะมีเชื้อมากกว่าที่สภาวะนิ่ง เพราะมีการละลายของออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB มากกว่า ซึ่งในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่เวลา 0 ชั่วโมง ยังมีค่า DO อยู่ค่อนข้างสูง แต่เมื่อทำการเลี้ยงไปได้เวลา 8 ชั่วโมง พบว่า ค่า DO ลดลงจนเกือบถึง 0 แสดงว่า เชื้อจุลินทรีย์ *B. subtilis* 2 สายพันธุ์ ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต

3. จากผลการตรวจนับสปอร์ของเชื้อจุลินทรีย์ *B. subtilis* 2 สายพันธุ์ พบว่า ในสภาวะเขย่า *B. subtilis* 2 สายพันธุ์ สามารถสร้างสปอร์ได้ดีกว่าในสภาวะนิ่ง ซึ่งในสภาวะนิ่งเชื้อจุลินทรีย์ *B. subtilis* ยังไม่เกิดการสร้างสปอร์ อาจเนื่องมาจากเชื้อจุลินทรีย์ยังอยู่ในสภาวะแบ่งตัว ส่วนในสภาวะเขย่าเชื้อจุลินทรีย์ *B. subtilis* 2 สายพันธุ์ สามารถสร้างสปอร์ได้ดีโดยที่ *B. subtilis* GP525 จะสร้าง สปอร์ได้สูงที่เวลา 16 ชั่วโมง และ *B. subtilis* GP522 จะสร้างสปอร์ได้สูงสุดที่เวลา 8 ชั่วโมง และเมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการสร้างสปอร์ *B. subtilis* GP525 จะสร้างสปอร์ได้ดีกว่า *B. subtilis* GP522

4.จากการเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์โปรติเอสและอะไมเลส พบว่าเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์จะผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ดีกว่าอะไมเลสซึ่งมีปริมาณเล็กน้อยเท่านั้น สำหรับสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซน์โปรติเอสคือ สภาวะเขย่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังนั้นจากคุณสมบัติดังกล่าว *B.subtilis* GP525 มีแนวโน้มที่จะพัฒนาไปสู่ระดับโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตอาหารสัตว์โปรไบโอติก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

คนึงนิจ ก่อธรรมฤทธิ์. 2540. การศึกษาและวิเคราะห์สถานภาพและศักยภาพการผลิต การใช้ และความต้องการ Probiotic ของอุตสาหกรรมอาหารสัตว์. เอกสารวิชาการ BIOTECH 3/2540. กองควบคุมคุณภาพอาหาร กรมปศุสัตว์, กรุงเทพฯ. 40น.

วรพจน์ สุนทรสุข และเกวลี จันทร์พันธุ์. 2545. การคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อย่อยสลายสารอินทรีย์ในบ่อกุ้ง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาลัยวิทยาเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี, กรุงเทพฯ.

สถาพร ดิเรกบุษราคม. 2543. ทิศทางการวิจัยโรคกุ้งศตวรรษใหม่ KU Electronic Maganizine ฉบับที่ 4 ปีที่ 1 เดือน 2543. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุชล แก้วพรม. 2539. การศึกษาการควบคุมโรคข้าวแบบชีววิธีโดยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Bacillus sutilis* ในระดับห้องปฏิบัติการ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.

ศุภชัย บุญนำมา และคณะ. 2543. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต *Bacillus subtilis* (Bs) ในอุตสาหกรรมโปรไบโอติก. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2543. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าธนบุรี. กรุงเทพฯ.

Bernfeld, P. 1955. Amylase α and B. Method in enzymology. New York. Aoa demic press. Inc.

Bottle, R. T. and Gilbert, G. A. 1958. The use of alkaline reagents to determine carbohydrate reducing groups. I. 3, 5 – dinitrosalicylate ion and interference by air. Analyst. 83: 403.

Chukeatirote, E. 2003. Potential use of probiotic. Songklanakarin J. Sci. Techol., 2003. 25(2): 275-282.

Fuller, R. 1989. Probiotic in man and animal : A review. *J. Appl. Bacteroil.* 66 : 365-378.

Harwood, C. R. and Archibuld, A.R. 1990. *Bacillus subtilis*. RB14 coproducer of peptide antibiotic iturin A and surfactin. J. Grn Appl. Microbiol 60 : 4015-4021

Kopeloff, N. and Beerman, P. 1925. *Lactobacillus acidophilus* vs. *L. bulgaricus* milk feeding. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.* 22 : 318.

Moriarty, DJW. 1999. Disease control in Shrimp Aguaculture with Probiotic Bacteria. Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology. Halifx, Canada, 1999.

Parker, R.B. 1974. Probiotic, the other half of the antibiotics story. *Anim Nutr. & Health* 29 :4-8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Spinosa, R. M. และคณะ. 2000. On the fate of ingested *Bacillus* spore. Res. Microbiol. 151(2000): 361-368.

Walter, H.E. 1984. " Method with haemoglobin, casein and azocell as substrate, " *In method of enzymatic analysis,* Bermayer, J. and Grabl, M.,eds., vol.5, pp.270-277, Weinheim : verlag Chemic Chemie GmbH.

http://www.kungthai.com/sirirat.html

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
การวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์

สารอาหาร

Plate Count Agar

Tryptone	5.0 กรัม
Yeast extract	2.5 กรัม
Dextrose	1.0 กรัม
Agar	15 กรัม
Water	1.0 ลิตร

Trypticase Soy Broth

Tryptone	15 กรัม
Soy peptone	5.0 กรัม
Sodium chloride	5.0 กรัม
Water	1.0 ลิตร

สารเคมี

Malachite green

Malachite green	5.0 กรัม
water	100 มิลลิลิตร

Safranin O

Safranin O	2.5 กรัม
Ethyl alcohol 95%	100 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
การวิเคราะห์ทางเคมี

การวิเคราะห์เอนไซม์อะไมเลส

สารเคมี

3,5 Dinitrosalicylic acid

Sodium hydroxide

Potassium sodium tartate

Sodium dihydrogen phosphate

Sodium hydrogen phosphate

Glucose

การเตรียมสารเคมี

0.05 M phosphate buffer pH 7.0

สาร A : Sodium dihydrogen phosphate

สาร B : Sodium hydrogen phosphate

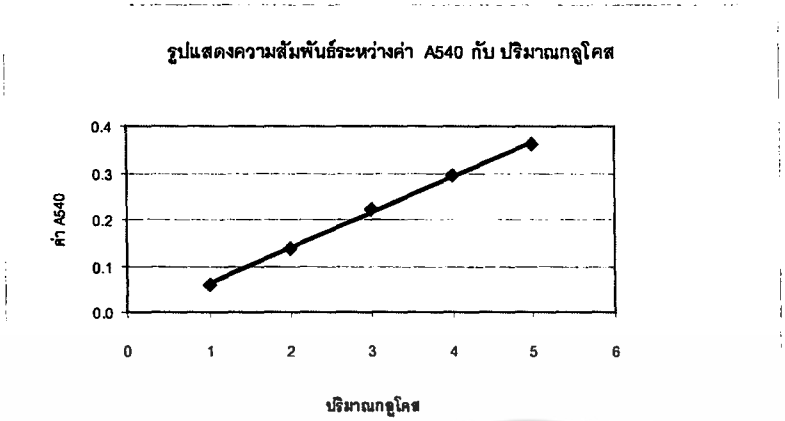
นำสาร A ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เทลงในสาร B ปริมาตร 46.5 มิลลิลิตร นำไปวัดค่า pHให้มีค่าเท่ากับ 7.0 โดยเตรียมสาร A หรือสาร Bให้ได้ค่า pH พอดี หลังจากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 200 มิลลิลิตร

สารละลาย DNS

ละลาย 3,5 Dinitrosalicylic acid 1 กรัมใน 2 N NaOH จำนวน 20 มิลลิลิตร แล้วเติม Potassium sodium tartate 30 กรัม ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กราฟกลูโคสมาตรฐาน



ความชัน = 0.076

ค่า r square = 0.998

การคำนวณ

หน่วยเอนไซม์อะไมเลส หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายสับสเทรตและให้น้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมล ภายในเวลา 1 นาที ภายใต้อุณหภูมิ 37 ^{o}C pH 7.0

กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส (หน่วย/มล.)

$$= \frac{(\text{OD ตัวอย่าง} - \text{OD ควบคุม}) \times \text{ระดับเจือจาง} \times 2}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน} \times \text{เวลา}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์เอนไซม์โปรติเอส

สารเคมี

L-Tyrosine

Tris(hydroxymethyl)aminometane

Hydrochloric acid

การเตรียมสารเคมี

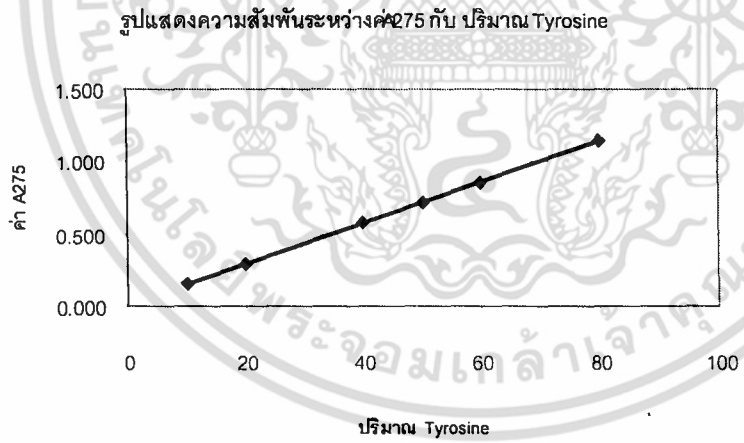
0.1 M Tris-HCl buffer pH 7.1

สาร A : Tris(hydroxymethyl)aminometane

สาร B : Hydrochloric acid

นำสาร A ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เทลงในสาร B ปริมาตร 46.5 มิลลิลิตร นำไปวัดค่า pHให้มีค่าเท่ากับ 7.1 โดยเตรียมสาร A หรือสาร Bให้ได้ค่า pH พอดี หลังจากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 200 มิลลิลิตร

กราฟ Tyrosine มาตรฐาน



ความชัน = 0.014

ค่า r square = 0.999

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การคำนวณ

หน่วยเอนไซม์โปรติเอส หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถย่อยสับสเทรตและให้ Tyrosine 1 ไมโครกรัม ภายในเวลา 1 นาที ภายใต้อุณหภูมิ 37 ^{o}C pH 7.1

กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (หน่วย/กรัม)

$$= \frac{(\text{OD ตัวอย่าง} - \text{OD ควบคุม}) \times \text{ระดับเจือจาง}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน} \times \text{เวลา}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ตารางแสดงการวิเคราะห์

ตารางแสดงจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวตทั้งหมดที่นับได้ที่สภาวะนิ่ง

การตรวจนับเชื้อจุลินทรีย์โดยใช้เทคนิค spread plate techique								
เชื้อ *B.subtilis*	เวลา	ปริมาณ diilution						
สายพันธุ์	(ชั่วโมง)	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
GP522	0	191,234	26,14	1,1	-	-	-	-
	8	250,254	86,98	18,20	-	-	-	-
	16	-	250,260	130,136	19,23	-	-	-
	24	-	>300	>300	151,197	-	-	-
GP525	0	94,157	16,24	1,1	-	-	-	-
	8	192,198	69,73	18,26	-	-	-	-
	16	-	223,217	60,64	10,12	-	-	-
	24	-	>300	>300	122,140	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวตทั้งหมดที่นับได้ที่สภาวะเขย่า

การตรวจนับเชื้อจุลินทรีย์โดยใช้เทคนิค spread plate techique								
เชื้อ *B.subtilis* สายพันธุ์	เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณ diilution						
		10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
GP522	0	254,282	14,20	9,13	-	-	-	-
	8	-	-	>300	244,272	135,163	57,82	-
	16	-	-	>300	>300	225,237	97,101	23,45
	24	-	-	-	-	>300	194,214	87,103
GP525	0	234,236	23,31	3,4	-	-	-	-
	8	-	-	>300	>300	>300	137,165	-
	16	-	-	>300	>300	>300	244,262	136,147
	24	-	-	-	-	>300	274,298	176,182

ตารางแสดงปริมาณสปอร์ที่นับได้ในสภาวะนิ่ง

การตรวจนับปริมาณสปอร์โดยใช้เทคนิค spread plate techique							
เชื้อ *B.subtilis* สายพันธุ์	เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณ dilution					
		10^{0}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
GP522	0	0,0	0,0	0,0	-	-	-
	8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-
	16	-	0,0	0,0	0,0	0,0	-
	24	-	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
GP525	0	0,0	0,0	0,0	-	-	-
	8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-
	16	-	0,0	0,0	0,0	0,0	-
	24	-	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงปริมาณสปอร์ที่นับได้ในสภาวะเขย่า

การตรวจนับปริมาณสปอร์โดยใช้เทคนิค spread plate techique							
เชื้อ *B.subtilis* สายพันธุ์	เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณ diilution					
		10^{0}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
GP522	0	0,1	0,0	0,0	-	-	-
	8	>300	15,15	0,0	0,0	0,0	-
	16	-	3,3	0,1	0,0	0,0	-
	24	-	2,2	0,1	0,0	0,0	0,0
GP525	0	0,0	0,0	0,0	-	-	-
	8	77,91	0,3	0,1	0,1	0,0	-
	16	-	94,96	8,13	1,3	0,0	-
	24	-	-	22,28	0,1	0,0	0,0

ตารางแสดงกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส

ตัวอย่างชั่วโมงที่	กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสในตัวอย่าง(หน่วย/มล.)			
	สภาวะเขย่า		สภาวะนิ่ง	
	GP525(เยิ้ม)	GP522(DMST)	GP525(เยิ้ม)	GP522(DMST)
0	0.037	0.040	0.000	0.000
8	0.053	0.054	0.044	0.051
16	0.074	0.055	0.073	0.041
24	0.027	0.062	0.076	0.013

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส

ตัวอย่าง ชั่วโมงที่	กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสในตัวอย่าง(หน่วย/มล.)			
	สภาวะเขย่า		สภาวะนิ่ง	
	GP525(เยื้ม)	GP522(DMST)	GP525(เยื้ม)	GP522(DMST)
0	2.935	2.383	0.198	1.619
8	2.383	2.249	0.955	2.051
16	11.046	10.381	0.488	0.566
24	9.872	11.513	0	0.495

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

นายกิตตินันท์ ศรีบุญ เกิดเมื่อวันที่ 24 ธันวาคม พ.ศ. 2524 สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย เมื่อปี พ.ศ. 2543 จากโรงเรียนนครสวรรค์ จังหวัดนครสวรรค์ และจบการศึกษาระดับปริญญาตรีหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร จากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เมื่อปี พ.ศ. 2547

นายพลพิพัฒน์ อภิรัตน์ธนาธร เกิดเมื่อวันที่ 8 ธันวาคม พ.ศ. 2524 สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย เมื่อปี พ.ศ. 2543 จากโรงเรียนสารสิทธิ์พิทยาลัย จังหวัดราชบุรี และจบการศึกษาระดับปริญญาตรีหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร จากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เมื่อปี พ.ศ. 2547

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้