ผลของโพรไบโอติกต่อลักษณะการเจริญเติบโตของกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*)

EFFECT OF PROBIOTICS ON GROWTH PERFORMANCE OF GIANT FRESHWATER PRAWN (*Macrobrachium rosenbergii*)

ร่มฉัตร แสงสง่าศรี
อัญชิสา พิบูรณ์

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา ชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2560

ผลของโพรไบโอติกต่อลักษณะการเจริญเติบโตของกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*)

EFFECT OF PROBIOTICS ON GROWTH PERFORMANCE OF GIANT FRESHWATER PRAWN (*Macrobrachium rosenbergii*)

ร่มฉัตร แสงสง่าศรี
อัญชิสา พิบูรณ์

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา ชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2560

EFFECT OF PROBIOTICS ON GROWTH PERFORMANCE OF GIANT FRESHWATER PRAWN (*Macrobrachium rosenbergii*)

Romchat Sangsangasri
Anchisa Piboon

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2017

หัวข้อโครงงานพิเศษ	ผลของโพรไบโอติกต่อลักษณะการเจริญเติบโตของกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) Effect of Probiotics on Growth Performance of Giant Freshwater Prawn (*Macrobrachium rosenbergii*)
ชื่อนักศึกษา	ร่มฉัตร แสงสง่าศรี รหัสนักศึกษา 57050882 อัญชิสา พิบูรณ์ รหัสนักศึกษา 57050921
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2560
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.สมชาย ไกรรักษ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2560

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ ประธานกรรมการ	
ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี กรรมการ	
ผศ.ดร.สมชาย ไกรรักษ์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงงานพิเศษ ผลของโพรไบโอติกต่อลักษณะการเจริญเติบโตของกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*)

ชื่อนักศึกษา นางสาวร่มฉัตร แสงสง่าศรี รหัสนักศึกษา 57050882

นางสาวอัญชิสา พิบูรณ์ รหัสนักศึกษา 57050921

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

ภาควิชา ชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.สมชาย ไกรรักษ์

บทคัดย่อ

การศึกษาลักษณะการเจริญเติบโตของกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) เมื่อได้รับเชื้อโพรไบโอติกผสม 5 สายพันธุ์ (ได้แก่ BS, BL, BM, BP2 และ BP) ปริมาตร 10, 15, 20, 25 และ 30 มิลลิลิตรทุกวัน เป็นเวลา 28 วัน พบว่ากุ้งก้ามกรามให้การเจริญสูงสุดเมื่อได้รับเชื้อโพรไบโอติกผสมปริมาตร 30 มิลลิลิตร ทุกวันอย่างต่อเนื่อง กรณีทดสอบกุ้งก้ามกรามที่ได้รับเชื้อก่อโรค *V. alginolyticus* (ที่ความเข้มข้น 10^7 - 10^8 cfu ต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 1 ถึง 7 วัน (ตามลำดับ) แล้วจึงให้เชื้อโพรไบโอติกผสม พบว่าถ้ากุ้งก้ามกรามได้รับเชื้อก่อโรค *V. alginolyticus* เป็นเวลา 3 ถึง 7 วัน แล้วได้รับเชื้อโพรไบโอติก จะให้เปอร์เซ็นต์การรอดตายกุ้งก้ามกรามลดลง แต่ถ้าได้รับเชื้อก่อโรค *V. alginolyticus* เพียง 1 ถึง 2 วัน แล้วได้รับเชื้อโพรไบโอติก จะให้เปอร์เซ็นต์การรอดตายของกุ้งก้ามกราม 87.5 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าเชื้อโพรไบโอติกส่งผลต่อสุขภาพ และช่วยให้เปอร์เซ็นต์การรอดตายเนื่องจากเชื้อก่อโรค *V. alginolyticus* เพิ่มขึ้น

คำสำคัญ : กุ้งก้ามกราม ; เชื้อผสมโพรไบโอติก ; Probiotics ; *V. alginolyticus*

Title	Effect of Probiotics on Growth Performance of Giant Freshwater Prawn (*Macrobrachium rosenbergii*)	
Students	Ms. Romchat Sangsangasri	student ID 57050882
	Ms. Anchisa Piboon	student ID 57050921
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)	
Department	Biology	
Academic Year	Science	
Advisor	Asst.Prof.Dr.Somchai Krairak	

Abstract

The growth characteristics of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) were studied on the effect of mixed probiotics (BS, BL, BM, BP2 and BP) daily feeding at 10, 15, 20, 25 and 30 ml for 28 days. It was found that the maximum growth of giant freshwater prawn was observed when 30 ml of mixed probiotics was feed daily. In cast of treatment with mixed probiotics on infected giant freshwater prawn by pathogenic *V. alginolyticus* (10^7 - 10^8 cfu/ml) for 1 to 7 days was observed. The results showed that the treatment with mixed probiotics on 3 to 7 days of infected giant freshwater prawn gave the minimum survival rate. However, the treatment one on 1 to 2 days of infected giant freshwater prawn indicated the maximum survival rate about 87.5%. It was concluded that mixed probiotics treatment presented the optimal giant freshwater prawn healthy and high survival rate on pathogenic *V. alginolyticus* infection.

Keywords : Giant freshwater prawn ; Mixed probiotics ; Probiotics ; *V. alginolyticus*

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีเนื่องมาจากความกรุณาและความร่วมมือของทุกๆท่าน ขอขอบพระคุณ ผศ. ดร.สมชาย ไกรรักษ์ ที่คอยให้คำปรึกษาและให้การช่วยเหลือแนะนำที่ดีในการปรับปรุงข้อบกพร่องในการทำโครงงานพิเศษและขอบพระคุณกรรมการสอบโครงงานพิเศษ คือ ผศ. ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ และ ผศ.ดร. พนา โลหะทรัพย์ทวีที่ให้ข้อคิดเห็นและคำแนะนำช่วยเหลือในการทำโครงงานพิเศษให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ กรมประมง กองวิจัยและพัฒนาสุขภาพสัตว์น้ำที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อ *Vibrio alginolyticus* ที่นำมาใช้ในการทดลอง

ขอขอบพระคุณ ฟาร์มรุ่งอรุณจังหวัดฉะเชิงเทรา ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อกุ้งก้ามกรามที่นำมาใช้ในการทดลอง

ขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการชีววิทยา และเจ้าหน้าที่ห้องธุรการที่ให้ความช่วยเหลือปละอำนวยความสะดวกในการทำโครงงานพิเศษให้สำเร็จไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ บิดา-มารดา ที่ส่งเสริมให้ผู้จัดทำโครงงานได้รับการศึกษา ตลอดจนคอยเลี้ยงดูและอบรมสั่งสอนและเป็นกำลังใจเป็นแรงผลักดันให้ในการทำโครงงานพิเศษให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี รวมถึงเพื่อนๆและบุคคลอื่นๆที่ไม่ได้กล่าวมา ผู้จัดทำโครงงานขอขอบคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

ร่มฉัตร แสงสง่าศรี

อัญชิสา พิบูรณ์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ II

กิตติกรรมประกาศ III

สารบัญ IV

สารบัญตาราง VI

สารบัญรูป VII

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 2

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย 2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3

2.1 กุ้งก้ามกราม 3

2.1.1 ลักษณะของกุ้งก้ามกราม 4

2.1.2 วงจรชีวิตของกุ้งก้ามกราม 5

2.1.3 สภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยง 9

2.2 โรคในกุ้งก้ามกราม 12

2.3 โพรไบโอติก (Probiotic) 14

2.3.1 คุณสมบัติของโพรไบโอติก 15

2.3.2 ความสำคัญของแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกในด้านอุตสาหกรรม 15

2.4 *Bacillus* spp. 16

2.5 *Vibrio alginolyticus* 16

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 17

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 3วิธีการดำเนินการวิจัย 18

บทที่ 4ผลการวิจัยและการอภิปลายผล 22

บทที่ 5สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 35

เอกสารอ้างอิง 38

ภาคผนวก ก 42

ภาคผนวก ข 46

ภาคผนวก ค 48

ภาคผนวก ง 50

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อโพรไบโอติกและเชื้อ *V. alginolyticus* 22
4.2 การเจริญของเชื้อ *V. alginolyticus* บนอาหาร TCBS
ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 28
4.3 การเจริญของเชื้อ *V. alginolyticus* บนอาหาร TCBS
ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 29
4.4 จำนวนกุ้งก้ามกรามที่เหลือรอดหลังจากทำให้ติดเชื้อ *V. alginolyticus* 30

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 ลักษณะของกุ้งก้ามกราม 4
2.2 ลักษณะที่แตกต่างของขาว่ายน้ำคู่ที่ 2 ของกุ้งก้ามกรามเพศผู้และเพศเมีย 5
2.3 แสดงวงจรชีวิตของกุ้งก้ามกราม 7
2.4 บ่ออนุบาลลูกกุ้งก้ามกราม (บ่อพลาสติกสีน้ำเงิน) แยกกุ้งวัยรุ่นใส่ตู้กระจก 8
2.5 (A) กุ้งขาวระยะ P-15 (B) กุ้งก้ามกรามระยะวัยรุ่น 8
4.1 แสดงการเจริญของเชื้อโพรไบโอติกรหัส BM 24
4.2 แสดงการเจริญของเชื้อโพรไบโอติกรหัส BL 25
4.3 แสดงการเจริญของเชื้อโพรไบโอติกรหัส BS 25
4.4 แสดงการเจริญของเชื้อโพรไบโอติกรหัส BP2 26
4.5 แสดงการเจริญของเชื้อโพรไบโอติกรหัส BP 26
4.6 แสดงการเจริญของเชื้อ *V. alginolyticus* ในอาหารเหลว TSB
1.5 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์ 27
4. 7 เปอร์เซ็นต์การรอดตายของกุ้งก้ามกรามที่ติดเชื้อ *V. alginolyticus*
เป็นเวลา 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 วัน ก่อนได้รับเชื้อโพรไบโอติก 31
4.8 แสดงความยาวของกุ้งก้ามกราม ที่ใส่โพรไบโอติกปริมาตรแตกต่างกัน
คือ 10, 15, 20, 25, 30 และชุดควบคุมที่ไม่ใส่โพรไบโอติก 33
4.9 แสดงน้ำหนักของกุ้งก้ามกราม ที่ใส่โพรไบโอติกปริมาตรแตกต่างกัน
คือ 10, 15, 20, 25, 30 และชุดควบคุมที่ไม่ใส่โพรไบโอติก 34
ข.1 แสดงวิธีการชั่งน้ำหนักของกุ้งก้ามกราม 46
ข.2 แสดงวิธีการวัดความยาวของกุ้งก้ามกราม 47

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

กุ้งก้ามกราม มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Macrobrachium rosenbcrgii* เป็นกุ้งน้ำจืดที่มีขนาดใหญ่ที่สุด มีชื่อเรียกที่รู้จักกันอย่างหลากหลายชื่อได้แก่ กุ้งแห กุ้งหลวง กุ้งนาง กุ้งใหญ่ หรือภาคใต้เรียกแม่กุ้ง ซึ่งกุ้งก้ามกรามเป็นสัตว์ที่อาศัยอยู่ได้ทั้งน้ำกร่อยและน้ำจืด (วณิชยา,2544) เป็นสัตว์น้ำที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจมีราคาแพง นิยมบริโภคโดยทั่วไปทั้งในประเทศและต่างประเทศ เนื่องจากกุ้งก้ามกรามมีเนื้อแน่นและมีปริมาณมาก ทำให้ในปัจจุบันความต้องการในการบริโภคกุ้งก้ามกรามมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นตามจำนวนของประชากรที่เพิ่มขึ้น ดูจากปริมาณการส่งออกกุ้งของประเทศไทยในช่วง 9 เดือนแรกของปี 2560 (มกราคม-ตุลาคม) มีมากถึง 1,689.1 ตัน มูลค่า 431.1 ล้านบาท (จันทิมา, 2560) เมื่อความต้องการมีมากขึ้นจึงทำให้เกิดระบบการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามอย่างหนาแน่น ส่งผลให้สภาพแวดล้อมในบ่อเสื่อมโทรมได้ง่าย คุณสมบัติของน้ำเกิดการเปลี่ยนแปลง เกิดของเสียในบ่อสูง ทำให้กุ้งเครียดและอ่อนแอ เกิดปัญหาด้านโรคต่างๆตามมา ซึ่งโรคติดเชื้อแบคทีเรียมักเป็นปัจจัยที่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามมาก เช่น *Vibrio* sp. ในปัจจุบันมักใช้ยาปฏิชีวนะในการยับยั้งเชื้อ ซึ่งส่งผลเสียทำให้เกิดสารตกค้างหรือมีผลข้างเคียงทำลายเซลล์ แต่ส่วนใหญ่ก็ไม่สามารถยับยั้งได้ด้วยยาปฏิชีวนะ เนื่องจากกุ้งจะมีอาการติดเชื้อเรื้อรังจนถึงระยะที่กุ้งไม่กินอาหาร การรักษาจึงไม่ได้ผล จึงเป็นเหตุผลสำคัญในการหาหนทางเพื่อแก้ไขปัญหายาปฏิชีวนะตกค้างและลดต้นทุนในการเลี้ยง

Gupta และคณะ (2016) ได้ศึกษาผลของการเสริม *Bacillus coagulans* ในอาหาร ที่มีผลต่อการเจริญเติบโต การใช้อาหาร การทำงานของเอนไซม์ย่อยอาหาร การตอบสนองภูมิคุ้มกันโดยธรรมชาติ และความต้านทานโรคของกุ้งน้ำจืดสายพันธุ์ *M.rosenbergii* โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B.coagulans* แล้วนำเชื้อมาทดสอบกับกุ้งก้ามกรามเป็นเวลา 60 วัน ผลที่ได้คือ การใช้ *B.coagulans*ความเข้มข้นประมาณ 10^{9}cfu ต่อกรัมอาหาร เป็นโพรไบโอติกที่เสริมในอาหาร พบว่าสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการเจริญเติบโต การทำงานของเอนไซม์ย่อยอาหารในกุ้งก้ามกรามสายพันธุ์ *M.rosenbergii* มีเปอร์เซ็นต์การรอดตาย และน้ำหนักตัวสุดท้ายสูงกว่ากลุ่มควบคุมซึ่งเป็นกุ้งที่ไม่ได้รับ *B.coagulans*

สำหรับเชื้อ *Bacillus* sp.ที่เป็นโพรไบโอติก สามารถสร้างเอนไซม์ไซลาเนส (xylanase) ซึ่งจะช่วยย่อยผนังเซลล์ของแบคทีเรีย *Vibrio* sp. ได้ และยังมีกลไกการทำลายแบคทีเรียก่อโรคโดยการแย่งสารอาหารและหลั่งเอนไซม์ที่สามารถย่อยเมือกที่ล้อมรอบเซลล์แบคทีเรียแกรมลบที่ก่อโรคได้

และทำลายองค์ประกอบของเซลล์ ส่งผลทำให้แบคทีเรียก่อโรคนั้นหยุดการเจริญเติบโตหรือถูกทำลายไปในที่สุด จึงเหมาะที่จะนำ *Bacillus* sp. ไปใช้ในการเพิ่มภูมิคุ้มกันโรคในกุ้ง ซึ่งนับว่าเป็นวิธีที่สามารถลดการใช้ยาปฏิชีวนะในกุ้ง ช่วยหลีกเลี่ยงอันตรายที่จะเกิดต่อผู้บริโภคและยังสามารถช่วยเพิ่มผลผลิตให้แก่เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้ง เป็นการลดเปอร์เซ็นต์การรอดตาย ของกุ้งจากการติดโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพหลังได้รับเชื้อโพรไบโอติก

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1) เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อผสมโพรไบโอติก (BS, BL, BM, BP2 และ BP) ในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของกุ้งก้ามกราม
2) เพื่อศึกษาเปอร์เซ็นต์การรอดตาย ของกุ้งก้ามกรามที่เลี้ยงด้วยโพรไบโอติก หลังจากทำให้กุ้งติดเชื้อ *Vibrio alginolyticus* ที่ระยะเวลาแตกต่างกัน

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1) เพาะเลี้ยงเชื้อผสมโพรไบโอติก (BS, BL, BM, BP2 และ BP) และเชื้อก่อโรค *Vibrio alginolyticus* ก่อนนำไปใช้ในการทดลองให้อยู่ในระยะ early stationary phase
2) ในการทดลองใช้เชื้อ *Vibrio alginolyticus* ที่มีความเข้มข้นเชื้อประมาณ 10^7-10^8 cfu ต่อมิลลิลิตร
3) ทดสอบความสามารถของเชื้อโพรไบโอติกผสมที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อ *Vibrio alginolyticus*
4) ศึกษาการเจริญเติบโตของกุ้งก้ามกรามที่ได้รับเชื้อผสมโพรไบโอติกในปริมาณที่แตกต่างกัน เปรียบเทียบน้ำหนักและความยาวของกุ้งก้ามกราม
5) ศึกษาเปอร์เซ็นต์การรอดตาย ของกุ้งก้ามกรามที่ติดเชื้อ *Vibrio alginolyticus* โดยเลี้ยงกุ้งด้วยเชื้อโพรไบโอติกผสม

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) เพื่อนำเชื้อโพรไบโอติกไปใช้เป็นทางเลือกหนึ่งในการเลี้ยงกุ้งทางการเกษตรเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญ ลดระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงกุ้งและเพิ่มปริมาณผลผลิต
2) ลดการใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาโรคของกุ้ง ซึ่งเชื้อโพรไบโอติกไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคและไม่ก่อให้เกิดสารพิษตกค้างอันเนื่องมาจากการใช้ยาปฏิชีวนะ

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 กุ้งก้ามกราม

Giant freshwater prawn คือชื่อสามัญภาษาอังกฤษของกุ้งก้ามกรามและมีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Macrobrahim roesenbergii* ลักษณะของกุ้งก้ามกราม เป็นกุ้งน้ำจืดที่มีขนาดใหญ่มากชนิดหนึ่ง ส่วนของหัวและอกอยู่รวมกันมีขนาดใหญ่และน้ำหนักมากกว่าลำตัว ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญที่เป็นอุปสรรคต่อการส่งเป็นสินค้าส่งออก เนื่องจากชาวต่างประเทศไม่นิยมรับประทานหัวกุ้ง กุ้งก้ามกรามมีลักษณะพิเศษตามชื่อของมัน คือ เพศผู้นั้นจะมีขาเดินคู่ที่ 2 ขนาดใหญ่และยาวกว่าคู่อื่น ๆ เรียกว่า ก้ามปัจจุบันมีการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามกันอย่างแพร่หลายในจังหวัดต่าง ๆ แถบภาคกลางของประเทศไทย เช่น สุพรรณบุรี นครปฐม ฉะเชิงเทรา ฯลฯ แต่โดยธรรมชาติจะอยู่ในแม่น้ำลำคลองแทบทุกจังหวัดในภาคกลางและภาคใต้ ทั้งในน้ำจืดและน้ำกร่อย (กระสินธุ์, 2556) กุ้งก้ามกรามมีการจัดอนุกรมวิธานดังนี้

อาณาจักร : Animalia

Phylum : Arthropoda

Class : Crustacea

Order : Decapoda

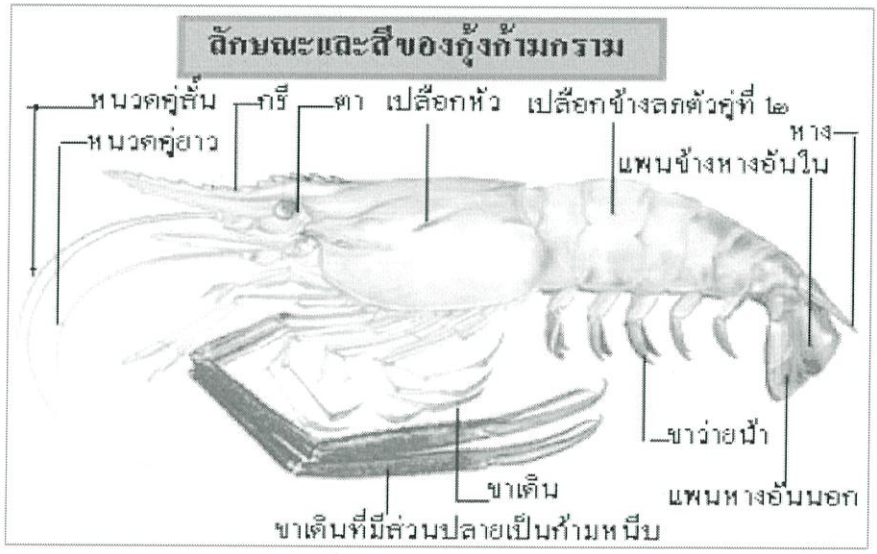
Family : Palaemonidae

Gens : *Macrobrachium*

Species : *M. rosenbergii*

2.1.1 ลักษณะของกุ้งก้ามกราม

กุ้งก้ามกรามจัดอยู่ในจำพวกสัตว์น้ำที่ไม่มีกระดูกสันหลัง แต่มีเปลือกหุ้มอยู่ภายนอก ลำตัวแบ่งออกเป็น 3 ส่วนคือ ส่วนหัว ส่วนลำตัว และส่วนหาง ส่วนหัวประกอบด้วยขาเดิน 3 คู่ และขาที่มีลักษณะเป็นก้ามอีก 2 คู่ อยู่ทางส่วนหน้า ขาคู่ที่ 1 ใช้ในการป้อนอาหารเข้าปากและทำความสะอาดร่างกาย ขาคู่ที่ 2 มีความยาวและใหญ่กว่าคู่ที่ 1 ซึ่งใช้ประโยชน์ในการต่อสู้และจับเหยื่อ ส่วนปลายหัวของกุ้งก้ามกรามประกอบด้วยกรีมีลักษณะแบนข้าง ส่วนโคนของกรีหนาและนูนเรียวแหลมไปทางส่วนปลาย ตรงกลางกรีโค้ง แอ่นลง ส่วนปลายงอนขึ้น ที่สันกรีด้านบนและล่างมีหลักหนามคล้ายฟันเลื่อยจำนวนหนามบนสันกรีล่าง 8-14 ซี่ สันกรีบนมี 12-15 ซี่ ตาอยู่ส่วนใต้โคนกรี อยู่บนก้านซึ่งยาวยื่นออกมาและเคลื่อนไหวได้ ส่วนลำตัวแบ่งออกเป็นปล้องๆ รวม 6 ปล้อง ด้านล่างของส่วนลำตัวมีขาว่ายน้ำ 5 คู่ ระหว่างปล้องที่ 1 ถึงปล้องที่ 5 ส่วนหางประกอบด้วยแพนหางข้างละ 1 คู่ ตรงส่วนกลางเป็นปลายหางแหลม ดังแสดงในรูปที่ 2.1

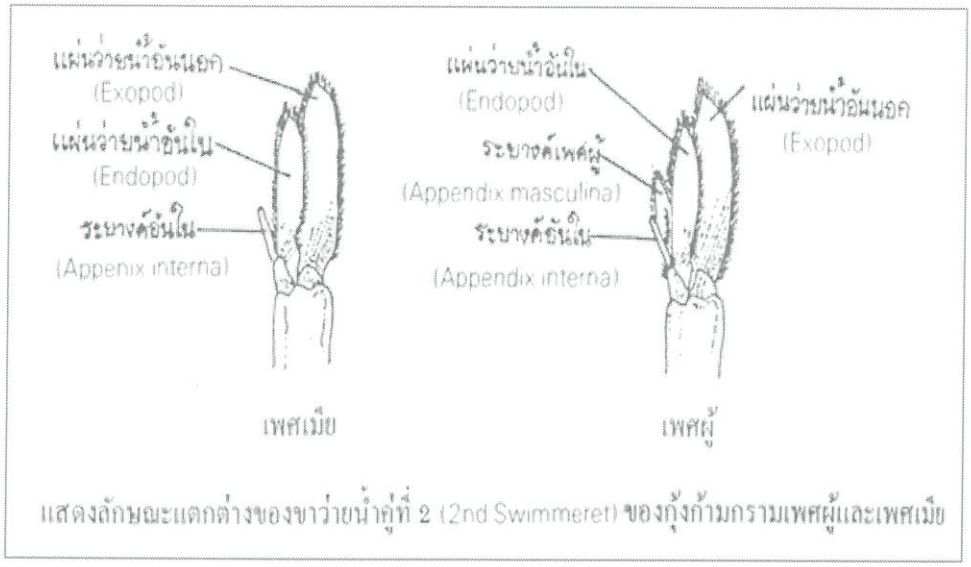


รูปที่ 2.1 ลักษณะของกุ้งก้ามกราม

ที่มา :Maanee (2552)

กุ้งก้ามกรามเพศผู้กับเพศเมียมีลักษณะที่สามารถจำแนกความแตกต่างอย่างเห็นได้ชัดอยู่หลายประการ ได้แก่ เพศผู้จะมีช่องเปิดของน้ำเชื้อ 1 คู่ อยู่ที่โคนขาเดินคู่ที่ 5 ด้านใน และบริเวณช่องท้องระหว่างขอบของเปลือกหุ้มตัวของเพศผู้จะแคบกว่าของตัวเมีย เนื่องจากเพศเมียจะใช้ช่องท้องในการเก็บไข่ นอกจากนี้ลักษณะที่เห็นง่ายๆ คือ ขาเดินคู่ที่ 2 ซึ่งมีลักษณะเป็นก้ามของกุ้งเพศผู้มีขนาดใหญ่และยาวกว่าของเพศเมีย แต่จะมีอวัยวะที่แตกต่างกันอยู่ที่บริเวณโคนขาว่ายน้ำคู่ที่ 2 ของเพศผู้มีติ่งขนาดเล็กยื่นออกมา 2 ติ่ง เรียกว่า Appendix masculine กับ Appendix interna ส่วนบริเวณ

โคนขาว่ายน้ำคู่ที่ 2 ของเพศเมียนั้น จะมีติ่งยื่นออกมาเพียงอันเดียวเรียกว่า Appendix interna เท่านั้น ดังแสดงในรูปที่ 2.2 นอกจากนี้ในฤดูวางไข่จะสังเกตเห็นว่า ภายในกระดองหัวของกุ้งเพศเมียจะมีสีแสดหรือแดงอมเหลืองเด่นชัด สีในบริเวณดังกล่าวนั้นเป็นที่ตั้งของรังไข่ หรือสามัญทั่วไปเรียกว่า “แก้วกุ้ง” สำหรับของเพศผู้สีในบริเวณดังกล่าวจะไม่ปรากฏให้เห็น (ยนต์, 2529)



รูปที่ 2.2 ลักษณะที่แตกต่างของขาว่ายน้ำคู่ที่ 2 ของกุ้งก้ามกรามเพศผู้และเพศเมีย
ที่มา : ไทยเกษตรศาสตร์ (2013)

2.1.2 วงจรชีวิตของกุ้งก้ามกราม

กุ้งก้ามกรามเป็นสัตว์ชอบน้ำเคลื่อนไหว กุ้งขนาดใหญ่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำจืดตามแม่น้ำ ลำคลอง ซึ่งมีอุณหภูมิค่อนข้างต่ำ และมีความต้องการออกซิเจนสูง จึงมักจะพบกุ้งชนิดนี้ในที่ที่มีน้ำไหลและใสสะอาด มีนิสัยชอบเกาะซุกซ่อนตัวอยู่ตามรากไม้และเสา ตลอดจนหินผาที่จมอยู่ใต้น้ำ เช่น บริเวณเขื่อน ฝายฯ มีความไวต่อแสง ว่องไว ปราดเปรียว หลบหลีกศัตรูได้คล่องแคล่วเมื่อถูกรบกวน ตามปกติ ตามธรรมชาติกุ้งก้ามกรามออกหากินในเวลากลางคืน ส่วนในเวลากลางวันจะซุกซ่อนตัวอยู่ตามสภาพแวดล้อมดังกล่าวแล้วกุ้งชนิดนี้มีนิสัยการกินอาหารได้ทุกประเภทโดยไม่เลือก ทั้งอาหารมีชีวิตและซากเน่าสลาย แล้วทั้งพืชและสัตว์ ได้แก่ เนื้อปลา พันธุ์ไม้น้ำ เมล็ดข้าว ถั่ว เนื้อมะพร้าว ตัวอ่อนแมลง หนอน ฯลฯ นอกจากนั้นยังกินกันเอง โดยเฉพาะเวลาลอกคราบ กุ้งที่อ่อนแอกว่าจะตกเป็นเหยื่อของตัวที่แข็งแรงกว่า

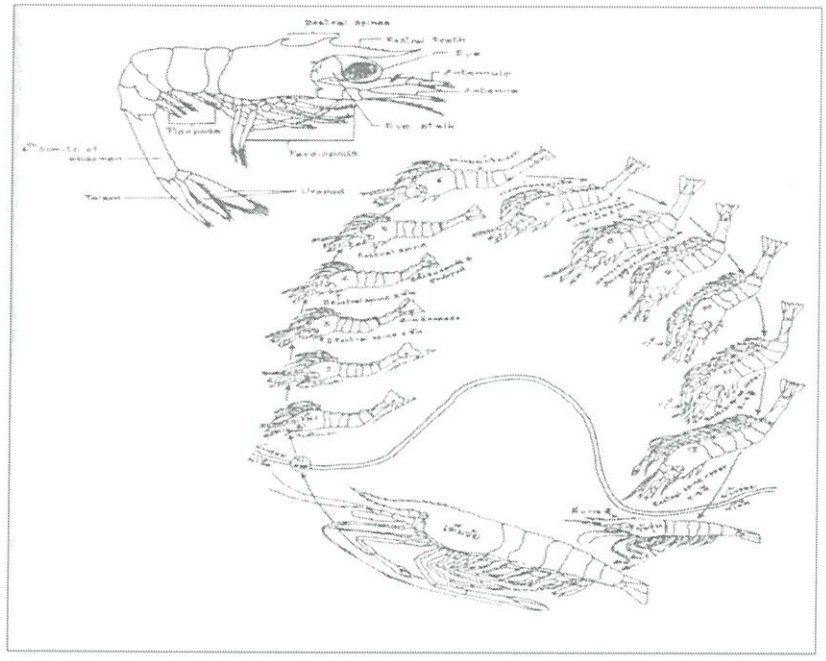
กุ้งก้ามกรามมีสัญชาติญาณในการวางไข่และหาอาหารเพื่อการเจริญเติบโต เมื่อถึงฤดูผสมพันธุ์ และวางไข่จะอยู่ในช่วงฤดูฝน เช่น ในภาคกลางและภาคตะวันออก อยู่ระหว่างเดือนพฤษภาคม-ตุลาคม ในภาคใต้ระหว่างเดือนตุลาคม-กุมภาพันธ์ และโดยเฉพาะระยะที่มีไข่ชุกชุมที่สุด คือ เดือน

ธันวาคม-มกราคม ของทุกปี แม่น้ำ ลำคลอง ส่วนที่มีสภาพน้ำจืดไปยังบริเวณใกล้ปากแม่น้ำหรือปากทะเลสาบ ซึ่งเป็นบริเวณน้ำจืดและน้ำทะเลมาพบและผสมกัน เรียกว่า “น้ำกร่อย” บริเวณดังกล่าวนี้จึงเป็นบริเวณที่มีความเหมาะสม ตามธรรมชาติที่จะเป็นแหล่งวางไข่ ฟักไข่ และการเจริญเติบโตของลูกกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน ทั้งนี้เพราะลูกกุ้งในวัยนี้มีความต้องการอาศัยและเลี้ยงตัวในบริเวณน้ำกร่อยที่มีความเค็มพอเหมาะและอุดมด้วยเกลือแร่ตามวัยของการเจริญเติบโตด้วย ดังที่แสดงในรูปที่ 2.3

กุ้งก้ามกรามสามารถผสมพันธุ์และวางไข่ได้ตลอดทั้งปี แต่ระยะที่กุ้งมีการผสมพันธุ์วางไข่อย่างขนานใหญ่นั้น อยู่ในช่วงฤดูฝนโดยพ่อแม่พันธุ์กุ้งจะเริ่มผสมพันธุ์และวางไข่ได้เมื่อมีอายุประมาณ 6-7 เดือน ซึ่งเป็นกุ้งที่มีขนาด 9.8-11.3 เซนติเมตร กุ้งตัวเมียที่มีไข่พร้อมผสมพันธุ์จะลอกคราบก่อนการผสมพันธุ์ทุกครั้ง ระหว่างที่ลอกคราบตลอดจนถอดคราบออก จะรอให้เปลือกใหม่แข็งตัวกินเวลา 6-12 ชั่วโมง กุ้งที่ลอกคราบจะมีความอ่อนแอ ไม่สามารถป้องกันตัวเองได้ จึงมักถูกทำร้ายและเป็นอาหารของตัวที่แข็งแรงกว่า กุ้งเพศผู้ที่พร้อมจะทำการผสมพันธุ์ จะเป็นผู้ปกป้องตัวเมียซึ่งกำลังลอกคราบให้รอดพ้นจากการเป็นเหยื่อของกุ้งเพศเมียด้วยกันเอง เมื่อคราบแข็งตัวและกุ้งเพศเมียสามารถที่จะเคลื่อนไหวเป็นปกติแล้ว เพศผู้จะทำการผสมพันธุ์ตามสัญชาติญาณแห่งการสืบพันธุ์ในการสืบพันธุ์นั้นกุ้งตัวผู้จะจับกุ้งตัวเมียหงายขึ้นและดำเนินการผสมพันธุ์ ใช้เวลาประมาณ 2-3 นาที หลังจากเพศเมียได้รับการผสมพันธุ์ในระยะหนึ่งก็จะวางไข่ โดยไข่จะไหลออกมาทางช่องเพศที่โคนขาเดิมคู่ที่ 3 มาติดไว้ที่บริเวณหน้าท้อง การวางไข่ดังกล่าวจะเกิดขึ้นหลังจากการลอกคราบของแม่กุ้ง 20-24 ชั่วโมง ไข่บางส่วนที่ไม่ได้รับการผสมเชื้อตัวผู้จะมีสีทึบในระยะแรกและมีสีขาวฟ้าในระยะต่อมา ไข่นี้จะหลุดออกไปในระยะ 2-3 วัน ส่วนไข่ที่ผสมแล้วจะมีสีเหลืองอมแดงใส มีเส้นผ่าศูนย์กลางถึง 0.8 มิลลิเมตร ในระยะนี้ไข่ได้รับการดูแลจากแม่กุ้ง แม่กุ้งจะใช้ขาว่ายน้ำกระพือให้น้ำเกิดการเคลื่อนไหว เพื่อให้ไข่ได้รับออกซิเจนอย่างเพียงพอ และมันจะใช้ขาคู่หน้าทำความสะอาดไข่และเขี่ยไข่ที่เสียหรือไม่ได้รับการผสมออกไปด้วย แม่กุ้งจะฟักไข่จนกระทั่งออกเป็นตัวใช้เวลานาน 19-20 วัน ในน้ำที่อุณหภูมิ 26-28 องศาเซลเซียส เมื่อไข่ฟักออกเป็นตัวแล้ว แม่กุ้งจะปล่อยให้ลูกกุ้งวัยอ่อนเลื่อนลอยไปตามน้ำอย่างอิสระ แม่กุ้งตัวหนึ่งๆ อาจวางไข่ได้ 2-4 ครั้งในรอบปี ในกรณีที่แม่กุ้งไม่ได้รับการผสมพันธุ์จากเพศผู้หลังจากที่ได้ลอกคราบแล้ว การวางไข่ก็จะดำเนินไปเช่นเดียวกัน แต่ไข่ที่ไม่ได้รับการผสมนั้นจะเสียไปในที่สุด สำหรับความดกของไข่นั้นขึ้นอยู่กับขนาดของแม่กุ้ง กุ้งที่มีขนาด 12 เซนติเมตร จะมีไข่ประมาณ 1,500 ฟอง และแม่กุ้งที่มีขนาดใหญ่ยาว 27 เซนติเมตร มีไข่ประมาณ 200,000 ฟอง โดยเฉลี่ยแล้วกุ้งขนาดปานกลางขนาดความยาว 18-20 เซนติเมตร จะมีไข่จำนวน 70,000-100,000 ฟอง

แหล่งวางไข่กุ้งก้ามกรามที่เสื่อมโทรม และเกือบจะไม่เป็นแหล่งวางไข่ตามธรรมชาติที่เห็นได้ชัด คือ บริเวณปากแม่น้ำเจ้าพระยา จังหวัดสมุทรปราการ และตามลำน้ำเจ้าพระยาในเขตกรุงเทพมหานคร ซึ่งเป็นบริเวณน้ำกร่อยขึ้นถึงนั้นได้เป็นบริเวณน้ำเสีย ซึ่งเกิดจากการปล่อยของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม และจากบ้านเรือนในเขตเทศบาลตามริมฝั่งของแม่น้ำเจ้าพระยาในเขต

กรุงเทพมหานคร นนทบุรี ปทุมธานี สมุทรปราการเอง ดังนั้น จึงแทบไม่ต้องสงสัยเลยว่าหากมีการปล่อยน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมและจากบ้านเรือน ตลอดจนมีสารพิษจากการกำจัดศัตรูพืชลงในแหล่งน้ำที่ติดกับชายทะเลเมื่อใด ก็เป็นอันเชื่อได้เลยว่า ท้องที่ตามธรรมชาติแถบนั้นจะไม่มีกุ้งก้ามกรามให้บริโภคได้เลย (สุภาพร, 2538)



รูปที่ 2.3 แสดงวงจรชีวิตของกุ้งก้ามกราม

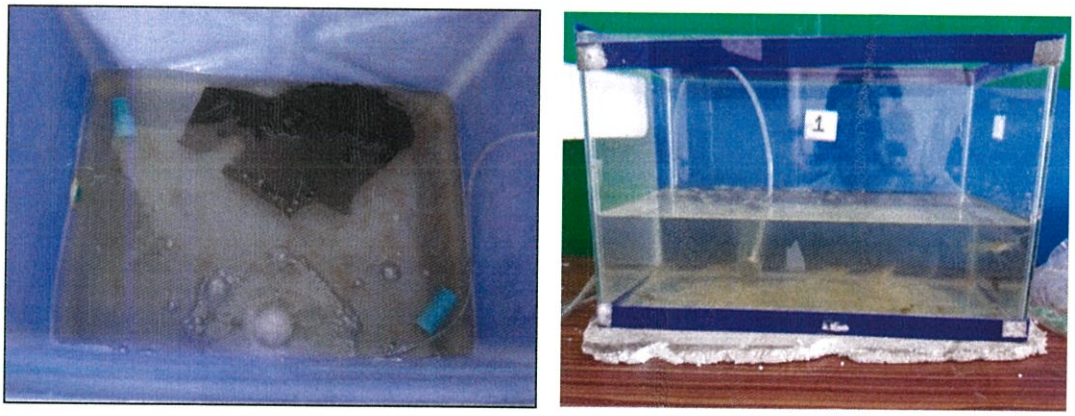
ที่มา :ไทยเกษตรศาสตร์ (2013)

การให้อาหารลูกกุ้งวัยอ่อน ในการให้อาหารนั้น เมื่อลูกกุ้งอายุได้ 2 วัน หรือย่างเข้าวันที่ 3 จะเริ่มให้ตัวอ่อนของอาร์ทีเมียเป็นอาหารทั้งกลางวันและกลางคืน เมื่อลูกกุ้งมีอายุ 5-7 วัน เราจะเริ่มเปลี่ยนชนิดของอาหารในเวลากลางคืน โดยจะค่อยๆ ลดปริมาณตัวอ่อนของอาร์ทิเมียเวลากลางวัน โดยใช้อาหารผสมสลับการให้ตัวอ่อนของอาร์ทีเมียในระยะแรก แล้วค่อยลดตัวอ่อนของอาร์ทีเมียซึ่งให้เฉพาะเวลากลางคืนเท่านั้น การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวควรใช้เวลา 2-3 วัน ในการให้อาหารแต่ละครั้งอย่าให้มากเกินไป โดยปิดฟองอากาศชั่วคราวระหว่างการให้อาหารแก่ลูกกุ้ง เพื่อจะได้สังเกตว่าลูกกุ้งจับอาหารกันทั่วถึงแล้วหรือยัง ทั้งนี้เพื่อป้องกันน้ำเสียเนื่องจากให้อาหารมากเกินไปด้วย ส่วนกลางคืนยังคงให้ตัวอ่อนของอาร์ทีเมียเป็นอาหารเช่นเดิมการใช้ไรแดงแทนตัวอ่อนของอาร์ทีเมีย เป็นสิ่งที่อยู่ในวิสัยที่ทำได้ในกรณีที่ผู้เพาะพันธุ์กุ้งก้ามกรามที่ขาดแคลนไข่อาร์ทีเมีย เพราะจากประสบการณ์ในการเพาะพันธุ์กุ้งก้ามกรามในระยะแรกนั้น คุณประสิทธิ์ เกษสัญชัย ซึ่งเป็นนักวิชาการของกรมประมง เคยรวบรวมไรน้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติเพื่อเลี้ยงลูกอ่อนกุ้งก้ามกราม และบางครั้งไรน้ำที่หาได้จำนวนมากก็สามารถเก็บ ไว้ในตู้เย็น และแม้จะตายแล้ว ก็ยังนำมาเป็น

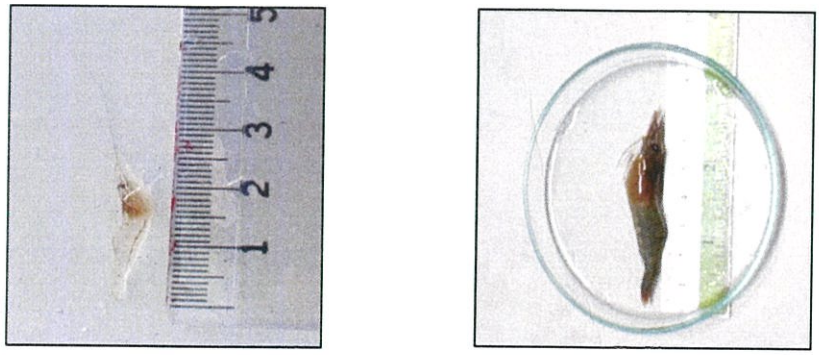
จะได้ลองนำเอาไรแดงมาใช้แทนตัวอ่อนของอาร์ทีเมียได้ในท้องที่ที่อาจหาไข่อาร์ทีเมียยากในจังหวัดห่างไกล เช่น ภาคอีสาน

การเปลี่ยนน้ำและทำความสะอาด เมื่อเริ่มให้อาหารสมทบก็จะมีอาหารที่เหลือตกค้างอยู่บ้างมากน้อยเป็นธรรมดา ดังนั้น จึงควรดูดตะกอนของเศษอาหารตกค้าง และของเหลือออกทุกวัน น้ำและตะกอนที่ถูกดูดออกมาจะมีลูกกุ้งบางส่วนติดมาด้วย ควรจะได้รวบรวมไว้ในตะแกรงรองรับ เมื่อดูดตะกอนเสร็จก็นำเอาตะกอนและลูกกุ้งที่ติดมาใส่ลงในกะละมังที่มีน้ำอยู่ค่อยๆ คน ทิ้งไว้สักครู่ พอตะกอนตกลงพื้นก็ให้แยกตะกอนทิ้ง ส่วนลูกกุ้งที่แขวนลอยอยู่ก็นำกลับลงไปใส่ไว้ในบ่อเดิม และลดน้ำในบ่อประมาณ 20-50 เปอร์เซ็นต์ทุกวันหรือเว้นวัน แล้วเติมน้ำกร่อยลงใหม่เท่าระดับเดิม

การย้ายลูกกุ้ง ในการเลี้ยงลูกกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน เมื่อเลี้ยงไปเป็นเวลานาน สภาพของน้ำในบ่อก็จะเสื่อมโทรมลง มีความสกปรกมากขึ้น และด้วยเหตุนี้จึงเป็นสาเหตุให้ลูกกุ้งวัยอ่อนเกิดโรคได้ ดังนั้น การเลี้ยงลูกกุ้งก้ามกรามวัยอ่อนจึงควรมีการย้ายลูกกุ้งจากบ่อเดิมไปบ่อใหม่ ซึ่งกรณีนี้จะต้องมีการเตรียมบ่อไว้ล่วงหน้า โดยทำความสะอาดและตากบ่อ ส่วนลูกกุ้งจากบ่อเดิมนั้นก่อนทำการย้ายสู่บ่อใหม่ ควรจะฆ่าเชื้อโรคก่อนย้าย โดยใช้ฟอร์มาลิน 30-100 มิลลิลิตรต่อ 1000 ลิตรการย้ายลูกกุ้งจากบ่อเดิมไปใส่บ่อใหม่ ควรทำทุกๆ 5-10 วัน



รูปที่ 2.4 บ่ออนุบาลลูกกุ้งก้ามกราม (บ่อพลาสติกสีน้ำเงิน) แยกกุ้งวัยรุ่นใส่ตู้กระจก



(A) (B)

รูปที่ 2.5 (A) กุ้งขาวระยะ P-15 (B) กุ้งก้ามกรามระยะวัยรุ่น

อาหารสำหรับกุ้งวัยอ่อนที่จะต้องเตรียม มี 2 ชนิดด้วยกัน คือ

1. อาร์ทีเมีย การเพาะอาร์ทีเมียเพื่อใช้เป็นอาหารของลูกกุ้งก้ามกรามวัยอ่อนนี้ เพียงแต่นำไข่อาร์ทีเมียมาผ่านกรรมวิธีทำความสะอาด แล้วนำมาใส่ถังฟักที่มีความเค็มประมาณ 7-35ppt (ส่วนในพันส่วน)เหตุที่ต้องใช้ความเค็มแตกต่างกันมากเช่นนี้ เพราะอาร์ทีเมียที่ใช้เป็นอาหารของลูกกุ้งในปัจจุบันมีหลายสายพันธุ์ หากเป็นสายพันธุ์ทางสหรัฐและจีนแดง จะใช้ความเค็มระหว่าง 20-35 ppt แต่ถ้าเป็นสายพันธุ์จากแคนาดา แถบทะเลสาบแชบปลินแล้ว ใช้ความเค็มระหว่าง 7-15 ppt เท่านั้น จากนั้นก็ให้ฟองอากาศค่อนข้างแรงตลอดเวลา 24-48 ชั่วโมง ก็ฟักออกเป็นตัว แล้วนำไปเป็นอาหารลูกกุ้งวัยอ่อนได้ แต่ก่อนนี้จะนำตัวอ่อน ของอาร์ทีเมียไปให้เป็นอาหารของลูกกุ้งวัยอ่อนประมาณ 3-6 ชั่วโมง ควรจะทำความสะอาดตัวอ่อนของอาร์ทีเมียเสียก่อน โดยใช้ด่างทับทิม 2-10 ส่วนในพัน (ppt.)หรือฟอร์มาลิน 25-100 ppm (ส่วนในล้านส่วน) ลงในบ่อเพาะอาร์ทีเมียเพื่อฆ่าเชื้อโรคและพาราสิตต่างๆ แล้วแยกเปลือกอาร์ทีเมียที่ลอยขึ้นผิวน้ำทิ้ง โดยใช้ผ้าแพลงก์ตอน (ขนาด 200 ไมครอน) ซึ่งเย็บเป็นถุงสำหรับกรองอาร์ทีเมีย แล้วเอาไปให้เป็นอาหารลูกกุ้งต่อไป

2. อาหารผสมไข่ลวกสุก เตรียมโดยใช้ทั้งไข่แดงและไข่ขาวผสมเนื้อหอยบดผสมนมสด หรือนมถั่วเหลือง หรือนมผงสำหรับเด็กอ่อน แล้วนำมานึ่งหรือตุ๋น แล้วนำมายีผ่านตะแกรงลวดขนาดเล็กตามต้องการ แล้วนำไปเป็นอาหารของลูกกุ้งวัยอ่อนต่อไป หรือให้นำเอาอาหารที่ผ่านตะแกรงลวดไปตาก หรืออบให้แห้งแล้วเก็บ แล้วนำไปเลี้ยงลูกกุ้งในโอกาสต่อไป

2.1.3 สภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยง

ต้องทราบปริมาณน้ำเพียงพอที่จะใช้เลี้ยงกุ้งได้กี่เดือน เพื่อนำไปวางแผนเลี้ยงกุ้งได้เหมาะสมกับสถานการณ์ คุณ ภาพน้ำ ก็เป็นปัจจัยที่สำคัญในการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม เพราะว่ากุ้งอาศัยอยู่ในน้ำ ซึ่งคุณภาพน้ำจะมีผลกระทบโดยตรงกุ้งที่อยู่ในน้ำที่มีคุณภาพดีก็จะเจริญ เติบโต ได้ดีและรวดเร็วผู้เลี้ยงก็จะประสบผลสำเร็จและได้กำไรมาก ถ้าหากคุณภาพของน้ำเลี้ยงกุ้งไม่ดีกุ้งก็จะเป็นโรคได้ง่ายและเจริญเติบโตได้ช้า ทำให้กุ้งตายเป็นจำนวนมากการรักษาคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งจึงเป็นสิ่งสำคัญมาก ได้แก่ ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง

ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำจะเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา เนื่องจากการสะสมของเสียที่กุ้งถ่ายออกมา รวมทั้งเศษอาหารตกค้างในบ่อและ ซาก พืชน้ำ การสังเคราะห์แสงของพืชน้ำ ก็มีส่วนทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างเปลี่ยนแปลง ในช่วงบ่ายจะมีค่าความเป็นกรด-ด่างในน้ำสูงมาก เกิดจากการสังเคราะห์แสงจะถึงจุดสูงสุด แต่ในช่วงกลางคืนค่าความเป็นกรด-ด่างจะลดลงมาก เนื่องจากพืชน้ำต่างๆ จะหยุดสังเคราะห์แสงมีแต่การหายใจเพียงอย่างเดียวจึงทำให้ผู้เลี้ยงกุ้งต้องควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างในบ่อกุ้ง ให้อยู่ประมาณ 7-9 และระดับที่เหมาะสมที่สุดคือ 7.5-8.5 ซึ่งเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกุ้งมากที่สุดกุ้งสามารถจะกินอาหารได้ดีด้วย ดังนั้นควรรักษาระดับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้อยู่ในช่วง 7.5-8.5 ถ้าสูงหรือต่ำกว่านี้ก็ ควรรีบแก้ไข

2.1.3.1 ค่าความเป็นกรดด่าง

ค่าความเป็นกรด-ด่างสูงเกินไป จะทำให้แพลงก์ตอนพืชในน้ำเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วแสดงว่าน้ำในบ่อ แสดงว่าน้ำในบ่อมีปุ๋ยหรือแร่ธาตุ มากเกินไปจะต้องถ่ายน้ำในบ่อออกแล้วนำน้ำใหม่เข้ามาเพื่อปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้อยู่ในเกณฑ์ปกติ ถ้าปล่อยให้ค่าความเป็นกรด-ด่างสูงจะทำให้พืชน้ำ เจริญเติบโตได้เร็วมากเมื่อตายลงจะทำให้น้ำเน่าเสีย

ค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำเกินไป แสดงว่าน้ำขาดปุ๋ยหรือแร่ธาตุแพลงก์ตอนพืชจะเจริญเติบโตช้าหรือไม่เจริญเติบโตเลยการคายออกซิเจน จากการสังเคราะห์แสงก็จะน้อยลงไปด้วย ควรใส่ปูนขาวประมาณ 1-1.5 กิโลกรัมต่อไร่ เป็นเวลา 3-4 วัน

2.1.3.2 ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ

ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำจะลดลงเนื่องจากการใช้หายใจของกุ้ง และสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ในน้ำซึ่งทำให้สภาพแวดล้อมเปลี่ยนแปลงไปค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำจะต่ำที่สุดในช่วงเวลา 02.00 น.-05.00 น. ก่อนตะวันขึ้นค่าต่ำสุดที่กุ้งจะทนได้คือประมาณ 0.35-0.9 ppm สำหรับการเลี้ยงแบบหนาแน่นในสภาพน้ำที่เขียวควรรักษาระดับออกซิเจนที่ละลายในน้ำให้สูงกว่า 3 ppm (ส่วนในล้าน) ถ้าออกซิเจนละลายในน้ำไม่พอกุ้งจะว่ายบนผิวน้ำมี อาการลอย หัวและเกาะตามตลิ่งจะไม่ว่ายลงไปใต้น้ำ แม้ว่าจะมีคนเดินมาใกล้ก็ตามควรรีบเปลี่ยนถ่ายน้ำหรือเปิดเครื่องตีน้ำให้เต็มที่ทันทีเพื่อเพิ่มค่าออกซิเจน ในน้ำ สามารถเพิ่มปริมาณออกซิเจนในน้ำได้ดังนี้

ก. การขยายเพิ่มปริมาณของแพลงก์ตอนพืชในน้ำ เพื่อทำสีน้ำให้เขียวขึ้นในเวลากลางวันการสังเคราะห์แสงจะเป็นการเพิ่มปริมาณออกซิเจน แต่ในเวลากลางคืนแพลงก์ตอนพืชไม่มีการสังเคราะห์แสง มีแต่การใช้ออกซิเจนในการหายใจถ้าหากมีแพลงก์ตอนพืชมากเกินไป ทำให้ออกซิเจนในน้ำไม่เพียงพอ สำหรับกุ้ง ฉะนั้น จึงต้องมีการควบคุมปริมาณแพลงก์ตอนพืชให้มีความโปร่งใสของน้ำประมาณ 20-30 เซนติเมตร และอาจต้องใช้เครื่องตีน้ำช่วยเพิ่มออกซิเจนใน เวลากลางคืนด้วย

ข. ต้องทำลายหรือขจัดสิ่งที่จะมาแย่งออกซิเจน เช่น ปลา ปู กุ้งฝอยเศษสกปรกที่สะสมอยู่ก้นบ่อซึ่งเป็นสารอินทรีย์ที่ต้องใช้ออกซิเจนในการ ย่อยสลายตัวโดยการถ่ายเปลี่ยนน้ำ

ค. ในกรณีที่ใช้น้ำบาดาล ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำบาดาลมักต่ำแต่จะมีไนโตรเจนสูง ดังนั้น จะต้องพักน้ำบาดาลให้อยู่กลางแจ้งก่อนแสง แดดจะช่วยเพิ่มค่าออกซิเจนและสลายปริมาณไนโตรเจนในน้ำ ตลอดจนช่วยตกตะกอนเหล็กหรือโลหะต่างๆ

ง. ในวันที่ฝนตก จำเป็นต้องใช้เครื่องตีน้ำเพื่อเพิ่มออกซิเจนในน้ำ เนื่องจากความกดอากาศต่ำจะทำให้ค่าออกซิเจนต่ำเช่นกัน

จ. ในระหว่างกุ้งลอกคราบต้องการออกซิเจนมาก หากออกซิเจนไม่พอจะมีผลกระทบที่ไม่ดีต่อกุ้ง เราจึงต้องถ่ายน้ำและตีน้ำมากๆ เพื่อให้กุ้งได้รับออกซิเจนอย่างเพียงพอ

2.1.3.3 อุณหภูมิของน้ำ

อุณหภูมิของน้ำที่เหมาะสมที่สุดในช่วง 25-30 องศาเซลเซียส ถ้าอุณหภูมิสูงหรือต่ำเกินไป อาจทำให้กุ้งอ่อนแอหรือตายได้

ถ้าอุณหภูมิน้ำสูงเกินไปแสดงว่าระดับน้ำต่ำเกินไป ควรรีบเติมน้ำเข้าไปให้ระดับน้ำสูงขึ้นเป็น5-6 ฟุต และอย่าให้เครื่องตีน้ำตีน้ำลึกเกินไป เพราะจะทำให้น้ำชั้นล่างร้อนด้วย

ถ้าอุณหภูมิต่ำเกินไปให้ดูดน้ำที่อุ่นกว่าเข้าผสมหรืออาจลดระดับน้ำให้ตื้นในช่วงเช้า เพื่อให้แสงแดดส่องและเพิ่มระดับน้ำให้สูงขึ้นในช่วง บ่าย

2.1.3.4 ขี้แดด

บ่อที่แสงแดดส่องลงไปได้ลึกจะต้องทำให้แพลงก์ตอนพืชเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ทำให้น้ำขาดออกซิเจนและพืชน้ำเหล่านี้จะตายไปสะสมอยู่ก้นบ่อกลายเป็นขี้แดด ข้อเสนอแนะ คือ ควรทำสีน้ำในบ่อให้คงที่ ไม่ใสหรือเข้มเกินไป

การเลี้ยงกุ้งก้ามกรามจะต้องทำการถ่ายเทน้ำอย่างสม่ำเสมอเนื่องจากกุ้งเป็นสัตว์น้ำที่เจริญเติบโตโดยการลอก คราบ การถ่ายเทน้ำใหม่จะกระตุ้นให้กุ้งลอกคราบ สำหรับกุ้งอายุ 1-2 เดือนแรกในสภาพปกติไม่จำเป็นต้องถ่ายน้ำนิยมใช้วิธีการเพิ่มระดับน้ำทุกสัปดาห์แทน เมื่อกุ้ง อายุ 2 เดือนขึ้นไป อาจเปลี่ยนถ่ายน้ำเดือนละ 2-4 ครั้ง ครั้งละประมาณ 1 ใน 3 ส่วนหรือ 1 ใน 2 ส่วนของบ่อเลี้ยงกุ้ง ขึ้นกับสภาพน้ำในบ่อและฤดูกาล สำหรับการขุนกุ้งด้วยปลาสดหรือ อาหารสดอื่นๆ ควรถ่ายน้ำในวันถัดไปเพราะเศษอาหารและของเสียจากการขับถ่าย จะทำให้น้ำในบ่อเขียวจัดอย่างรวดเร็วภายใน 3-5 วันหลังจากให้อาหารสด เมื่อกุ้งอายุได้ประมาณ 4-5 เดือน ควรระบายน้ำก้นบ่อและอาจต้องดูดเลนด้วย ถ้าก้นบ่อมีเศษอาหารและของเสียหมักหมมอยู่มาก จะทำ 1-2 เดือน ต่อครั้ง โดย ทำ 1 ใน 3 หรือ 1 ใน 4 ของพื้นที่บ่อพร้อมกับระบายน้ำออกเปลี่ยนน้ำใหม่ แล้วหว่านปูนขาวบริเวณที่ดูดเลนไม่เกิน 30 กก.ต่อไร่ ช่วงนี้ควรลดอาหาร 1-2 วันเพราะกุ้ง ที่ได้น้ำใหม่จะลอกคราบและไม่กินอาหารเมื่อเลี้ยงกุ้งก้ามกรามจนอายุได้ประมาณ 6 เดือน ก็จะเริ่มทำการคัดขนาดและจับกุ้งขาย โดยลดน้ำในบ่อลงเหลือประมาณ 50 เซนติเมตร แล้ว ใช้อวนลาก โดยใช้อวนช่องตาขนาด 4 เซนติเมตร เพื่อให้กุ้งที่มีขนาดเล็กหลุดออกมาได้ไม่บอบช้ำ ที่ตีนอวนจะมีตะกั่วถ่วงสำหรับเชือกคร่าวบนเวลาลากอาจใช้ไม้ไม้ ค้ำไว้โดยเสียบไว้กับทุ่นลอยที่ทำมาจากต้นกล้วย การจับกุ้งนิยมทำในช่วงเช้าเพราะอากาศไม่ร้อน

2.2 โรคในกุ้งก้ามกราม

โรคกุ้งก้ามกรามพบทั้งในระหว่างการอนุบาลลูกกุ้งในโรงเพาะฟัก และในระหว่างการเลี้ยงเพื่อเป็นกุ้งใหญ่ในบ่อดิน

การป้องกันและรักษาโรคของลูกกุ้งมีสาเหตุอยู่หลายประการที่ทำให้ลูกกุ้งอ่อนแอ ตาย และเป็นโรคพยาธิ เช่น

คุณสมบัติของน้ำอยู่ในสภาพเสื่อมโทรม เช่น มีของเน่าเสียอยู่ในน้ำทำให้เกิดแก๊สเช่น คาร์บอนไดออกไซด์ ไฮโดรเจนซัลไฟด์ และแอมโมเนีย ซึ่งทำให้เป็นพิษทั้งโดยตรงและทางอ้อม ออกซิเจนต่ำทำให้ลูกกุ้งอ่อนแออุณหภูมิเปลี่ยนแปลงต่างกันมาก เช่น หนาวจัด ร้อนจัด มีผลให้ลูกกุ้งอ่อนแอความเป็นกรด-ด่าง ซึ่งปกติอยู่ระหว่าง 7.5-9.0

ในการป้องกันและแก้ไขเกี่ยวกับเรื่องดังกล่าว คือ ก่อนทำการเพาะลูกกุ้งทุกครั้ง ควรเตรียมวัสดุและอุปกรณ์ต่างๆ ให้พร้อมปราศจากเชื้อโรค โดยใช้สารเคมี และยาฆ่าเชื้อโรคบางชนิดใส่ลงหรือฉีดพ่นใส่วัสดุและอุปกรณ์ทิ้งไว้ประมาณ 3-7 วัน แล้วล้างทำความสะอาด ตากให้แห้งก่อนทำการอนุบาลลูกกุ้งทุกครั้งน้ำที่ใช้ในการเพาะและอนุบาล ให้ผ่านการฆ่าเชื้อ กรองให้สะอาด ตลอดจนปรับความเป็นกรดและด่างให้อยู่ในระดับพอดี ส่วนการปรับค่าออกซิเจนให้สูงขึ้นนั้น ทำได้ด้วยการเพิ่มกำลังอัดอากาศลงไปให้เพียงพอ ส่วนอุณหภูมิที่ต่ำก็แก้ไขด้วยการทำความสะอาดโรงเพาะฟักและอุปกรณ์ที่จะเป็นแหล่งแพร่เชื้อโรคและพยาธิต่างๆ ในกรณีที่ลูกกุ้งชอบกัดกินกันเองขณะลอกคราบนั้น อาจมาจากสาเหตุดังนี้

ความหนาแน่นของลูกกุ้งมีมากเกินไป อาหารของลูกกุ้งอาจไม่พอ หรือลูกกุ้งกินอาหารไม่ทั่วถึง โดยเฉพาะตัวที่อ่อนแอกว่า

กุ้งสูญหายจากแมลงน้ำบางชนิด เช่น แมลงกรรเชียง ตัวอ่อนแมลงปอ เป็นต้น ได้กัดกินลูกกุ้งจนทำให้ลูกกุ้งตายหรือเกิดการสูญหาย สามารถแก้ไขโดย กรองน้ำและย้ายลูกกุ้งไปบ่อใหม่

2.2.1 โรคกุ้งหลังขาว

โรคกุ้งหลังขาว เป็นโรคที่สร้างความเสียหายในการอนุบาลลูกกุ้งมาก เพราะลูกกุ้งที่เป็นโรคหลังขาวมักจะทยอยตายจนหมดบ่อ โดยจะแสดงอาการ คือ ลำตัวจะมีสีขาวขุ่น สีเหมือนเมล็ดข้าวเหนียว ในขณะที่ลูกกุ้งที่ไม่ป่วย กล้ามเนื้อจะใสเหมือนเมล็ดข้าวเจ้า พบมากในบ่อที่มีการอนุบาลลูกกุ้งอย่างหนาแน่นมาก มีปริมาณอาหารที่ให้ลูกกุ้งมากตามจำนวนลูกกุ้งไปด้วย ซึ่งจะทำให้มีระดับแอมโมเนียสูงมาก จากนั้นลูกกุ้งก็จะเริ่มแสดงอาการหลังขาว

การป้องกันที่ดีที่สุดคือไม่อนุบาลลูกกุ้งหนาแน่นมากเกินไป และต้องมีน้ำที่สะอาดเปลี่ยนถ่ายให้เพียงพอในระหว่างการอนุบาลลูกกุ้ง ก่อนที่ลูกกุ้งแสดงอาการหลังขาว

2.2.2 โรคเรืองแสง

ในการอนุบาลลูกกุ้งก้ามกรามในระยะแรกที่น้ำยังมีความเค็มประมาณ 15 ส่วนในพัน (ppt.) มีโอกาสที่จะเกิดโรคแบคทีเรียเรืองแสงได้ ซึ่งเป็นแบคทีเรียชนิดเดียวกันกับที่พบในโรงเพาะฟักในการอนุบาลลูกกุ้งกุลาดำ และในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำคือ *Vibrio harveyi*

การป้องกัน การใช้คลอรีนฆ่าเชื้อในน้ำต้องใช้ความระมัดระวัง โดยเฉพาะในขั้นตอนที่ดูดน้ำส่วนที่ใสเข้าไปเก็บไว้ในบ่อพักน้ำ ถ้าดูดตะกอนที่ตกลงมาที่พื้นบ่อเข้าไปมาก มีโอกาสที่จะเกิดแบคทีเรียเรืองแสงในระหว่างการอนุบาลช่วงแรกๆ ได้ แต่เมื่อความเค็มลดลงมาในช่วงหลังจากที่ลูกกุ้งคว่ำแล้ว โอกาสเกิดโรคเรืองแสงมีน้อยมาก

2.2.3 โรคเหงือกดำ

เกิดจากเชื้อแบคทีเรียจับที่เหงือก มองเห็นเป็นสีดำ จะทำให้กุ้งนั้นหายใจไม่สะดวก สาเหตุเกิดจากการหมักหมมของพื้นบ่อ น้ำจะมีออกซิเจนเหลือต่ำ

ป้องกันได้โดยการ เปลี่ยนน้ำแล้วย้ายกุ้งไปเลี้ยงในบ่อที่เตรียมใหม่เพื่อให้กุ้งเกิดการลอกคราบ เชื้อแบคทีเรียที่สะสมอยู่ก็จะหลุดออกไป

2.2.4 โรคเปลือกเน่า

เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย ทำให้ขอบหรือปลายเหงือกมีสีดำและขาดหายไป ถ้าเกิดที่ปลายขาก็จะทำให้ขากุด โรคนี้จะค่อยๆ ลุกลามไป ทำให้กุ้งเกิดการระคายเคือง ไม่กินอาหารและตายในที่สุด สาเหตุเกิดจากการเลี้ยงกุ้งหนาแน่น และเปลี่ยนน้ำไม่เพียงพอ

หลักการทั่วๆ ไปในการป้องกันและรักษาที่จำเป็นและจะต้องเอาใจใส่ที่สุดก็คือ การรักษาคุณสมบัติของน้ำและอุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงให้สะอาดอยู่เสมอ เมื่อพบลูกกุ้งมีอาการผิดปกติให้รีบค้นสาเหตุ ให้รีบแก้ไขรักษาโดยด่วน การแยกอุปกรณ์ต่างๆ ระหว่างบ่อเพาะเลี้ยงลูกกุ้งที่มีอาการผิดปกติ และมีอาการปกติออกจากกันเสียโดยเด็ดขาด การเปลี่ยนถ่ายน้ำและย้ายลูกกุ้ง ระหว่างทำการรักษาลูกกุ้งจะกินอาหารน้อยลง ควรลดหรืองดอาหารจำพวกอาหารเสริมชั่วคราว และกินเฉพาะอาร์ทีเมียเท่านั้น จนกว่าลูกกุ้งจะหายเป็นปกติ เปิดให้แสงแดดสว่างถึง หรือคลุมด้วยกระเบื้องถ้าร้อนเกินไป (Author, 2013)

2.3 โพรไบโอติก (Probiotic)

คำว่า probiotic หมายถึง อาหารเสริมที่เป็นจุลชีพเล็กๆที่ยังมีชีวิต เมื่อรับประทานเข้าไปแล้วจะช่วยให้ร่างกายผู้นั้นมีสุขภาพที่ดีขึ้น ซึ่งอาจจะช่วยป้องกันหรือรักษาโรคต่างๆที่เกิดขึ้นเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของจุลชีพในร่างกาย ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียมากมายหลายชนิดที่มีอยู่ในลำไส้

โพรไบโอติกสามารถออกฤทธิ์ได้หลายรูปแบบในการช่วยเสริมสร้างสุขภาพและป้องกันหรือรักษาโรคต่างๆที่เกิดขึ้น เช่นกลุ่ม lactobacilli จะสร้างน้ำย่อย β-galactosidase ช่วยลดปริมาณน้ำตาล lactose ในอาหาร ซึ่งเป็นสาเหตุของท้องเสียได้นอกจากนี้สามารถสร้างสารหลายชนิดที่ช่วยทำหน้าที่เป็นยาปฏิชีวนะ เช่นorganic acids, free fatty acids, ammonia, hydrogen peroxide และ bacteriocins ช่วยกำจัดเชื้อแบคทีเรียที่ปะปนในอาหารน้ำย่อยบางชนิดจาก probiotic จะช่วยยับยั้งสารพิษจากแบคทีเรีย โดยไปปิดกั้นส่วนที่สารพิษจะเข้าเซลล์ และสามารถแย่งจับตำแหน่งต่างๆของเนื้อเยื่อในลำไส้ เพื่อไม่ให้แบคทีเรียเข้าเกาะกุมได้ป้องกันไม่ให้แบคทีเรียในลำไส้ขยายตัว นอกจากนี้สามารถกระตุ้นภูมิต้านทานทั้งในลำไส้และในกระแสเลือด หรือกระตุ้นการทำงานของเซลล์อื่นๆไว้ต่อสู้กับเชื้อโรค และกระตุ้นการสร้างสารป้องกันโรคในร่างกาย เช่น γ-interferon, interleukin เป็นต้น

จุลินทรีย์โพรไบโอติกจะอาศัยร่วมกับสิ่งมีชีวิตซึ่งเรียกว่าเจ้าบ้าน (host) แบบพึ่งพาอาศัยกัน (symbiosis) ซึ่งโพรไบโอติกไม่ได้ให้ประโยชน์ต่อผู้บริโภคโดยตรง ประโยชน์ที่ได้กับผู้บริโภคนั้นถือเป็นผลพลอยได้ เนื่องจากแต่เดิมร่างกายของสิ่งมีชีวิตทั้งมนุษย์และสัตว์มีความซับซ้อน มีความต้องการสารอาหารอื่นๆ ที่ไม่สามารถสร้างได้ด้วยตัวเอง แต่เชื้อจุลินทรีย์เป็นสิ่งมีชีวิตที่ไม่ซับซ้อนสามารถใช้อาหารได้จากสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ โดยจุลินทรีย์จะย่อยสลายสารอาหารในร่างกายของสิ่งมีชีวิตเพื่อใช้ในการเจริญและสิ่งมีชีวิตที่เป็นเจ้าบ้านก็จะได้ประโยชน์จากการย่อยสารอาหารของจุลินทรีย์นี้เอง ทำให้ได้สารอาหารที่เป็นประโยชน์และให้พลังงานแก่สิ่งมีชีวิตที่จุลินทรีย์นั้นๆอาศัยอยู่ เป็นการอาศัยผลประโยชน์ซึ่งกันและกัน โดยเริ่มต้นจากจุลินทรีย์อาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารซึ่งส่วนใหญ่คือ แบคทีเรีย โดยจะอาศัยอาหารที่เจ้าบ้านรับประทานเข้าไปแล้วเอนไซม์ภายในปากจะย่อยอาหารเป็นอันดับแรก จากนั้นจะถูกส่งต่อไปย่อยด้วยกรดในกระเพาะอาหาร และในที่สุดจะถูกย่อยต่อด้วยเอนไซม์จากตับอ่อนได้เป็นอนุภาคขนาดเล็ก และต่อจากนั้นแบคทีเรียในลำไส้จะสร้างน้ำย่อยออกมาย่อยสารอาหารที่มีอนุภาคเล็กต่อจนถึงระดับที่แบคทีเรียสามารถใช้เป็นสารอาหารเพื่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียเอง ซึ่งแท้ที่จริงแล้วนั้นแบคทีเรียไม่ได้ย่อยสารอาหารให้กับเราโดยตรง แต่เนื่องจากแบคทีเรียนั้นมีวงจรชีวิตสั้น ตายเร็ว จึงทำให้น้ำย่อยและสารสำคัญที่เป็นประโยชน์อื่นๆที่แบคทีเรียโพรไบโอติกผลิตออกมาหรือแม้กระทั่งเศษของเซลล์แบคทีเรียโพรไบโอติกที่ตายแล้วที่หลงเหลืออยู่ก็ยังเป็นประโยชน์ต่อเจ้าบ้าน ลำไส้เราก็สามารถดูดซึมสารอาหารที่ได้จากการย่อยของ

แบคทีเรียไปใช้ประโยชน์ต่อได้เช่นกัน จึงเรียกได้ว่าเป็นการอยู่อาศัยแบบพึ่งพากันนั่นเอง (Isolauri และคณะ, 2001, Suskovic และคณะ, 2001)

2.3.1 คุณสมบัติของโพรไบโอติก

2.3.1.1 แบคทีเรียชนิดไม่สร้างสารพิษและไม่ก่อโรคสามารถสร้างกรดแลคติก และปรับสภาพของระบบทางเดินอาหารให้อยู่ในสภาพที่แบคทีเรียโคลิฟอร์มเจริญได้ยาก

2.3.1.2 สามารถทนต่อกรดในกระเพาะอาหารได้ดี และไม่ถูกทำลายได้ง่ายจากน้ำย่อยกระเพาะอาหารและน้ำดีจากตับอ่อน

2.3.1.3 สามารถอยู่ร่วมกับจุลินทรีย์ที่มีในทางเดินอาหารและออกฤทธิ์ได้ดีกับทางเดินอาหารทุกส่วน

2.3.1.4 จุลินทรีย์ที่เป็นส่วนประกอบของโพรไบโอติกจะต้องไม่มีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติหลังจากเข้าในตัวสัตว์แล้ว

2.3.1.5 สามารถแข่งขันกับเชื้อโรคในการยึดเกาะผนังลำไส้ซึ่งโดยปกติเชื้อโรคจะเข้าเกาะและต่อต้านการเคลื่อนที่ของลำไส้ที่มีการบีบตัวให้อาหารเคลื่อนที่ในลักษณะลูกคลื่น ซึ่งการเกาะเคลือบของเซลล์โพรไบโอติกที่ผนังทางเดินอาหารนี้จะทำให้การย่อยอาหารและการดูดซึมเป็นไปอย่างปกติ (Fuller, 1993)

2.3.2 ความสำคัญของแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกในด้านอุตสาหกรรม

Bacillus spp.เป็นกลุ่มที่มีความแตกต่างกันทางลักษณะทางพันธุกรรมมากที่สุด บางสายพันธุ์ก็เป็นเชื้อฉวยโอกาสในการก่อโรค ด้วยการผลิตสารพิษที่อันตรายต่อมนุษย์และสัตว์ บางสายพันธุ์ก็เป็นเชื้อที่สามารถทำประโยชน์ให้แก่มนุษย์และสัตว์ เช่น สกุล *Bacillus* spp. หรือสกุล *Lactobacillus* spp. ที่ในปัจจุบันได้รับการยอมรับในการเป็นโพรไบโอติกและถูกนำมาใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์อาหารหลากหลายชนิด ทั้งในด้านโภชนาการและทางการแพทย์ในการผลิตยาและอาหารเสริมที่เป็นประโยชน์ เนื่องจากความสามารถในการผลิตกรดแลคติก เป็นสารชนิดหนึ่งที่ถูกสร้างขึ้นมาเพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่นๆ และกระตุ้นให้เกิดภูมิต้านทาน ทั้งนี้ยังมีการนำโพรไบโอติกมาใช้ในระดับอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ในประเทศไทย พบมากในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์น้ำ สัตว์ปีกและสุกร เช่น การใช้โพรไบโอติกในการเลี้ยงสัตว์น้ำจะช่วยเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำ ต้านทานโรคที่ปะปนมากับน้ำ และช่วยปรับสภาพแวดล้อมภายในบ่อเพาะเลี้ยงให้ดีขึ้น เนื่องจากแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกจะช่วยย่อยสลายสารอินทรีย์ก้นบ่อให้กลายเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และยังช่วยให้น้ำในบ่อมีคุณภาพที่ดีขึ้นด้วย และการใช้โพรไบโอติกในการเลี้ยงสุกรโดยใช้ผสมอาหารในการเลี้ยงเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโต ช่วยเพิ่มการดูดซึมอาหาร ช่วยต้านทานโรคในระบบทางเดินอาหาร เป็นต้น

2.4 *Bacillus* spp.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Bacillus spp.* เป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นท่อน ทรงกระบอก (rod shaped) อาจเป็นท่อนเดียวหรือต่อกันเป็นสาย เป็นแบคทีเรียแกรมบวก และอาจเปลี่ยนเป็นแบคทีเรียแกรมลบตามอายุสามารถเจริญได้ในที่ที่มีออกซิเจนและไร้ออกซิเจน (facultative anaerobe) เคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลารอบตัว (peritrichous flagella) เจริญได้ในอาหารหลากหลายชนิด เติบโตดีในอุณหภูมิปกติ และค่าความเป็นกรด-ด่างที่เป็นกลาง สามารถผลิตเอนไซม์หลายชนิดเช่น protease และ amylase เป็นต้น

เชื้อ *Bacillus subtilis*และเชื้อในสปีชีส์ใกล้เคียงกัน จะมีลักษณะสำคัญ คือ สามารถสร้างเอนโดสปอร์ (endospores) ซึ่งไม่มีกระบวนการเมทาบอลิซึม มีคุณสมบัติทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม การสร้างเอนโดสปอร์จะเกิดขึ้นเมื่อขาดแหล่งคาร์บอน นอกจากนี้การขาดไนโตรเจนและฟอสฟอรัสก็ทำให้เกิดการสร้างเอนโดสปอร์ได้เช่นกัน โดยปกติแล้วเชื้อจะมีการสร้างเอนโดสปอร์เมื่อมีการเจริญเข้าสู่ช่วง stationary-phase (Victor และ Uwe, 2014)

Bacillus spp. มีความหลากหลายทางลักษณะสัณฐานวิทยาและสรีระวิทยากว้างขวาง ลักษณะโคโลนีจะมีตัวแปรที่แตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม คุณภาพ และปริมาณของอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งอายุโคโลนีและจำนวนโคโลนีต่อจานอาหารที่เลี้ยงจะมีผลต่อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี ดังนั้นจึงยากที่จะสามารถแยกชนิดของแบคทีเรียด้วยลักษณะโคโลนีแต่อย่างไรก็ตามถ้าแบคทีเรียอยู่ในสภาพแวดล้อมเดียวกันก็จะสามารถใช้โคโลนีในการจัดจำแนกชนิดได้ เช่น เมื่อเลี้ยงในอาหาร casein agar เชื้อ *B. megaterium* จะมีลักษณะโคโลนีมีสีเหลือง เชื้อ *B. pumilus* มีโคโลนีสีเหลืองอ่อน เชื้อ *B. sphaericus* มีโคโลนีที่มีสีชมพูและเชื้อ *B. subtilis* มีโคโลนีที่มีสีชมพูเหลือง ส้ม หรือน้ำตาลในอาหารที่มีคาร์โบไฮเดรต

2.5 *Vibrio alginolyticus*

แบคทีเรีย *Vibrio* เป็นแบคทีเรียที่พบมากในน้ำที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้ง เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อนสั้น เคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลาที่ปลายเซลล์ ส่วนใหญ่แบคทีเรียในกลุ่มนี้จะสามารถสร้าง biofilm ทำให้เกิดการสร้างโคโลนีของแบคทีเรียได้บริเวณพื้นผิวของสัตว์และพืช แบคทีเรีย *Vibrio* ที่พบมากในโรงเพาะฟักและอนุบาลลูกกุ้งและบ่อดิน ได้แก่ *Vibrio harveyi, V. vulnificus, V. parahaemolyticus, V. alginolyticus* และ *Vibrio sp.*ซึ่งสัตว์น้ำหลากหลายชนิด โดยเฉพาะสัตว์จำพวกกุ้งสามารถติดเชื้อแบคทีเรียได้โดยผ่านทางแผลหรือรอยแยกของผิวหนังชั้น Cuticle และอาหารเข้าสู่กุ้งทางปาก (Paynter, 1989; Lavilla-Pitogo และคณะ, 1990)

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Gupta และคณะ (2016) ได้ศึกษาผลของการเสริม *Bacillus coagulans* ในอาหาร ที่มีผลต่อการเจริญเติบโต การใช้อาหาร การทำงานของเอนไซม์ย่อยอาหาร การตอบสนองภูมิคุ้มกันโดยธรรมชาติ และ ความต้านทานโรคของกุ้งน้ำจืดสายพันธุ์ *M.rosenbergii* โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B.coagulans* แล้วนำเชื้อมาทดสอบกับกุ้งก้ามกรามเป็นเวลา 60 วัน ผลที่ได้คือ การใช้ *B.coagulans* ความเข้มข้นประมาณ 10^9cfu ต่อกรัมอาหาร เป็นโพรไบโอติกที่เสริมในอาหาร พบว่าสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการเจริญเติบโต การทำงานของเอนไซม์ย่อยอาหารในกุ้งก้ามกรามสายพันธุ์ *M.rosenbergii* มีเปอร์เซ็นต์การรอดตายและน้ำหนักตัวสุดท้ายสูงกว่ากลุ่มควบคุมซึ่งเป็นกุ้งที่ไม่ได้รับ *B.coagulans*

Subuntith และคณะ (2012) ได้ศึกษาผลของโพรไบโอติก *Bacillus* ผสม (โพรไบโอติก A และโพรไบโอติก B) และวิธีการของโพรไบโอติกที่มีผลต่อการเจริญเติบโต จำนวนแบคทีเรีย คุณภาพของน้ำระหว่างการเลี้ยงกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) โดยแบ่งเป็น 2 การทดลอง (1) กุ้งขาวระยะ larval (2) กุ้งขาวระยะ post larval รูปแบบของเชื้อผสมโพรไบโอติกไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตหรือเปอร์เซ็นต์การรอดตายชีวิตของกุ้งขาวในระยะ larval ถึงระยะ post larval การเปรียบเทียบระหว่างโพรไบโอติก A และโพรไบโอติก B ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตและเปอร์เซ็นต์การรอดตายชีวิตของกุ้งขาวในระยะ larval อย่างไรก็ตาม การเลี้ยงกุ้งขาวในระยะ post larval ด้วยโพรไบโอติก B มีการเจริญเติบโตของกุ้งขาวมากกว่าการเลี้ยงด้วยโพรไบโอติก A และชุดควบคุม ($P<0.05$) จำนวนแบคทีเรียที่ใช้สารอินทรีย์มีจำนวนเพิ่มขึ้นมากกว่าชุดควบคุม ($P<0.05$) ของการเลี้ยงกุ้งขาวในระยะ larval ถึงระยะ post larval ระดับของความเป็นกรด-ด่างแอมโมเนีย และไนเตรตมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับชุดควบคุม การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าโพรไบโอติก *Bacillus* ผสมช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตและเปอร์เซ็นต์การรอดตายของกุ้งขาวอย่างมีนัยสำคัญ เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการเพาะเลี้ยงกุ้ง และส่งผลต่อการลดระดับ ความเป็นกรด-ด่าง แอมโมเนีย และไนเตรตในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงกุ้ง

Ranjit และคณะ (2013) ได้ศึกษาผลของเชื้อ *Bacillus licheniformis* ต่อกุ้งก้ามกราม เมื่อเชื้อเข้าสู่ทางเดินอาหารของกุ้งจะมีผลยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค เพิ่มอัตราการเจริญเติบโตและการกินอาหาร มีผลป้องกันการติดเชื้อของกุ้งโดยเพิ่มการตอบสนองของภูมิคุ้มกันในกุ้ง *M. rosenbergii* ในงานวิจัยนี้ ความเข้มข้นของเชื้อโพรไบโอติกที่ใช้และได้ผลกับกุ้งที่สุดคือ 1.0×10^9 cfu ต่อกรัมอาหาร อย่างไรก็ตาม จากการศึกษา หากเพิ่มความเข้มข้นของเชื้อ *B. licheniformis* น่าจะส่งผลดีต่อการเลี้ยงกุ้งในเชิงพาณิชย์

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 จุลินทรีย์และกุ้งก้ามกราม

เชื้อ *Vibrio alginolyticus*ที่ใช้เป็นเชื้อก่อโรคในกุ้งก้ามกรามได้รับความอนุเคราะห์จาก กรมประมง กองวิจัยและพัฒนาสุขภาพสัตว์น้ำเก็บรักษาเชื้อที่ -80 องศาเซลเซียส

เชื้อผสมโพรไบโอติกรหัส BM, BL,BS, BP2 และ BP ได้มาจากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว YM ให้มีอายุ 24 ชั่วโมง นำมาผสมกันในอัตราส่วน 1:1:1:1:1

กุ้งที่ใช้ในการทดลองใช้กุ้งกร้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) ได้รับความอนุเคราะห์จากฟาร์มรุ่งอรุณ ต.คลองประเวศ อ.บ้านโพธิ์ จ.ฉะเชิงเทรา

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

3.2.1 NA (nutrient agar)

3.2.2 YM (Yeast extract malt extract)

3.2.3 TSB (Tryptone soya broth)

3.2.4 TSA (Tryptone soya agar)

3.2.5 TCBS (Thiosulfate-citrate-bile salt-sucrose agar)

3.2.6 โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

3.2.7 Sulfuric acid (Conc.)

3.2.8 สารละลายฟีนอล 5 เปอร์เซ็นต์

3.2.9 Tween 800.1 เปอร์เซ็นต์

3.2.10 analytical grade glucose

3.3 เครื่องมือวิทยาศาสตร์

3.3.1 ตู้ปลอดเชื้อ (Larminar Air Flow)

3.3.2 เครื่องนึ่งความดันไอ (Autoclave)

3.3.3 ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven)

3.3.4 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)

3.3.5 ตู้บ่มเชื้อสภาวะเขย่า (Incubator shaker)

3.3.6 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Specrtophotometer)

3.3.7 เครื่องอ่านถาดไมโครเพลท (Microplate Reader)

3.3.8 กล้องจุลทรรศน์ (Microscope) (Nikon Eclipse Ci, Japan)

3.3.9 เครื่องผสมสาร (Vortex)

3.3.10 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge)(HERMLE Labortechnik GmbH, Wehingen, Germany)

3.3.11 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

3.3.12 เครื่องชั่งดิจิตอล (500 x 0.01 กรัม)

3.3.13 ไมโครปิเปต (Micropipette)

3.3.14 เครื่องวัดความเค็ม (Salinity Refractometer)

3.4 อุปกรณ์

3.4.1 ตู้กระจก

3.4.2 กะละมังพลาสติก

3.4.3 ปั้มลมให้อากาศ (Air pump)

3.4.4 หัวให้อากาศ

3.4.5 สายยาง

3.4.6 ตาข่ายช้อนกุ้ง

3.4.7 อาหารเม็ดสำเร็จรูปยี่ห้อซันชายน์ ประเทศไทย

3.5 เชื้อจุลินทรีย์และสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญ

3.5.1 เชื้อโพรไบโอติก

นำเชื้อโพรไบโอติกแต่ละรหัส ได้แก่ BM, BL, BS, BP2 และ BP ลงบนอาหารวุ้นเอียง YM ในสภาวะปลอดเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3.5.2 เชื้อ *Vibrio alginolyticus*

streak เชื้อ *Vibrio alginolyticus* ลงบนอาหาร TCBS บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แตะเชื้อ 1 loop ลงในอาหารเหลว TSB 1.5 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์บ่มอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนเซลล์ ปรับค่าการดูดกลืนแสงให้เท่ากับ 1 (OD = 1) เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3.6 การเตรียมน้ำสำหรับกุ้งก้ามกราม

นำน้ำกรองมาให้อากาศด้วยปั๊มลมเป็นเวลา 7 วัน เติมปูนขาวเพื่อปรับค่าความเป็นกรด-ด่างน้ำ ให้อยู่ที่ 7 – 8 เติมเกลือปราศจากเชื้อให้น้ำมีปริมาณเกลือ 1 % (10 ppt) วัดปริมาณเกลือในน้ำโดยใช้ Salinity Refractometer ให้อากาศต่อเป็นเวลา 5 วันจึงนำน้ำมาใช้เลี้ยงกุ้งต่อไป

3.7 วิธีทดลอง

3.7.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

นำเชื้อโพรไบโอติกทั้ง 5 ชนิด streak ลงบนอาหารแข็ง YM บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อ *Vibrio alginolyticus*streak ลงบนอาหาร TSA 1.5 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์และอาหาร TCBS บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ศึกษาลักษณะโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด Stereo Microscope และศึกษาลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยวิธีย้อมแกรม

3.7.2 การศึกษาลักษณะการเจริญของเชื้อโพรไบโอติกในอาหารเหลว YM

นำเชื้อโพรไบโอติกทั้ง 5 ชนิด ลงบนอาหารวุ้นเอียง YM บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงทำเป็น cell suspension โดยเติม tween 80 0.1 เปอร์เซ็นต์นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ปรับให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากันในแต่ละหลอด ปิเปตสารละลายเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในอาหารเหลว YM บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสในสภาวะเขย่า 150 รอบต่อนาที วัดค่าการดูดกลืนแสงทุกๆ 3 ชั่วโมง บันทึกผล และสร้างกราฟการเจริญ

3.7.3 การศึกษาลักษณะการเจริญของเชื้อ *V. alginolyticus* ในอาหารเหลว TSB 1.5 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์

นำเชื้อ 1 loop ลงในอาหารเหลว TSB 1.5 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสในสภาวะเขย่า 150 รอบต่อนาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ทุกๆ 3 ชั่วโมง จนครบ 63 ชั่วโมง บันทึกผล และสร้างกราฟการเจริญ (Ajitha และคณะ, 2004)

3.7.4 การศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *V. alginolyticus* ของเชื้อโพรไบโอติก

การศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *V.alginolyticus* ของเชื้อโพรไบโอติกในห้องทดลองด้วยวิธี Challenge test โดยนำเชื้อโพรไบโอติก รหัส BM, BL, BS, BP2 และ BPในอาหารเหลว YM อายุ 24 ชั่วโมง มาผสมกันในอัตราส่วน 1:1:1:1:1 และเชื้อ *V. alginolyticus* ในอาหารเหลว TSB 1.5 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์ อายุ 24 ชั่วโมง มาผสมกัน โดยมีอัตราส่วนของเชื้อวิบริโอต่อเชื้อโพรไบโอติกเป็น 1:1, 1:3, 1:5 และ 1:10 แบ่งเป็นสองชุดการทดลองโดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ 37 องศาเซลเซียส ทดสอบผลโดยการขีดลงบนจานเพาะเชื้อ (simple streak) ลงบนอาหาร TCBS เพื่อดูการเหลือรอดของเชื้อ *V. alginolyticus*

การศึกษาความสามารถของเชื้อโพรไบโอติกต่อเปอร์เซ็นต์การรอดตายของกุ้งก้ามกรามที่ติดเชื้อ *Vibrio alginolyticus* โดยคัดแยกกุ้งก้ามกรามที่มีขนาด 5-6 เซนติเมตร ใส่ในตู้กระจก ตู้ละ 8 ตัว แต่ละตู้มีระดับน้ำ 10 ลิตร จำนวน 8 ตู้ โดยแบ่งเป็น ชุดควบคุมที่ไม่ใส่เชื้อวิบริโอและเชื้อโพรไบโอติก ตู้ที่ 1- 7 ใส่เชื้อวิบริโอให้กุ้งติดเชื้อ โดยตู้ที่ 1 ให้กุ้งติดเชื้อเป็นเวลา 1 วัน ตู้ที่ 2 ให้กุ้งติดเชื้อเป็นเวลา 2 วัน ตู้ที่ 3 ให้กุ้งติดเชื้อเป็นเวลา 3 วัน ตู้ที่ 4 ให้กุ้งติดเชื้อเป็นเวลา 4 วัน ตู้ที่ 5 ให้กุ้งติดเชื้อเป็นเวลา 5 วัน ตู้ที่ 6 ให้กุ้งติดเชื้อเป็นเวลา 6 วัน และตู้ที่ 7 ให้กุ้งติดเชื้อเป็นเวลา 7 วัน แล้วจึงใส่โพรไบโอติกทุกวันเป็นเวลา 18 วัน

3.7.5 การศึกษาความสามารถของเชื้อโพรไบโอติกต่อการเจริญเติบโตของกุ้งก้ามกราม

คัดแยกกุ้งก้ามกรามที่มีขนาด 0.5 – 1.0เซนติเมตร ใส่ในกะละมัง กะละมังละ 10 ตัว แต่ละกะละมังมีปริมาตรน้ำ 10 ลิตร โดยแบ่งเป็น 6 ชุดการทดลอง โดยชุดควบคุมไม่ใส่เชื้อโพรไบโอติก ชุดทดลองที่ 1 – 5 ใส่เชื้อโพรไบโอติกปริมาตร 10, 15, 20, 25 และ 30 มิลลิลิตรทุกวัน วันละ 1 ครั้ง ชั่งน้ำหนักและวัดความยาวกุ้งทุกๆ 3 วัน สร้างกราฟการเจริญเติบโตของกุ้งก้ามกรามที่ใส่เชื้อโพรไบโอติกเทียบกับชุดควบคุม

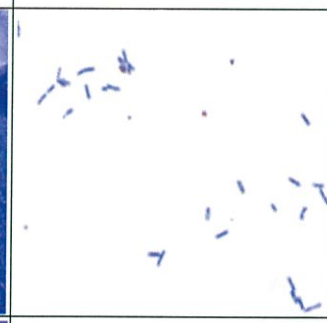
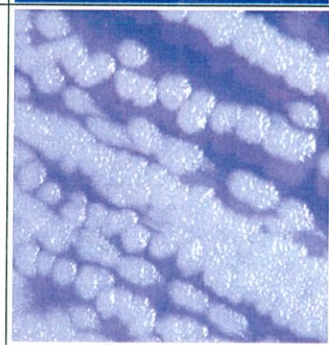
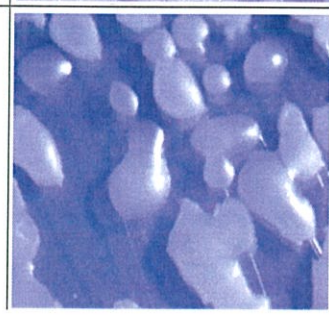
บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปลายผล

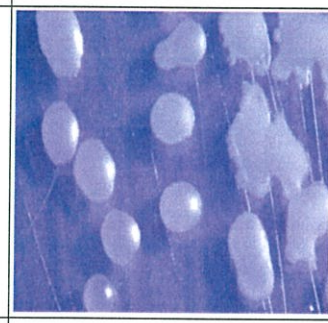
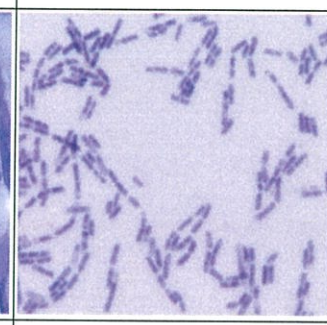
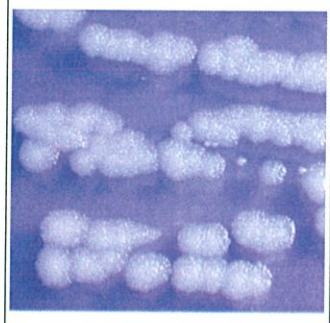
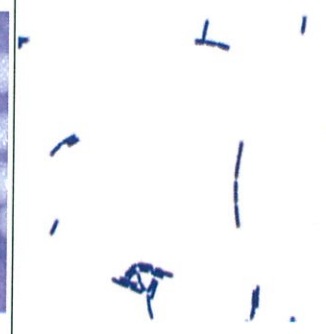
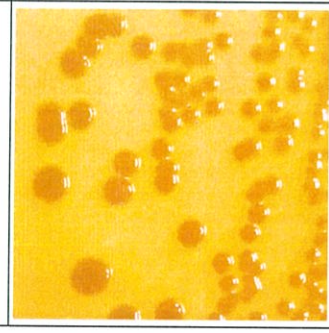
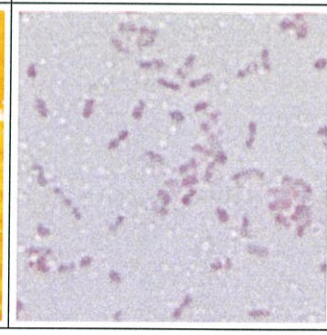
4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

นำเชื้อโพรไบโอติกทั้ง 5 ชนิด รหัส BM, BL, BS, BP2 และ BP และเชื้อ *Vibrio alginolyticus* ขีดลงบนจานเพาะเชื้อด้วยวิธี cross streak ศึกษาลักษณะเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยวิธีย้อมแกรม ศึกษาลักษณะโคโลนีด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด Stereo Microscope ดังที่แสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อโพรไบโอติกและเชื้อ *V. alginolyticus*

ลำดับที่	รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนี	รูปร่างของเซลล์ (1000 เท่า)	ลักษณะของเชื้อ
1	BS			โคโลนี: มีสีขาว ลักษณะกลม แบนราบ ขอบหยัก รูปร่างเซลล์ : มีลักษณะเป็นท่อนสั้น
2	BL			โคโลนี : มีสีขาว ลักษณะกลม แบนราบ มันวาว รูปร่างเซลล์ : มีลักษณะเป็นท่อนสั้นอาจอยู่เป็นท่อนเดี่ยวหรือต่อกันเป็นสาย
3	BM			โคโลนี : มีสีขาว ลักษณะกลม โค้งนูน มันวาว รูปร่างเซลล์ : มีลักษณะเป็นท่อนอาจอยู่เป็นท่อนเดี่ยวหรือต่อกันเป็นสาย

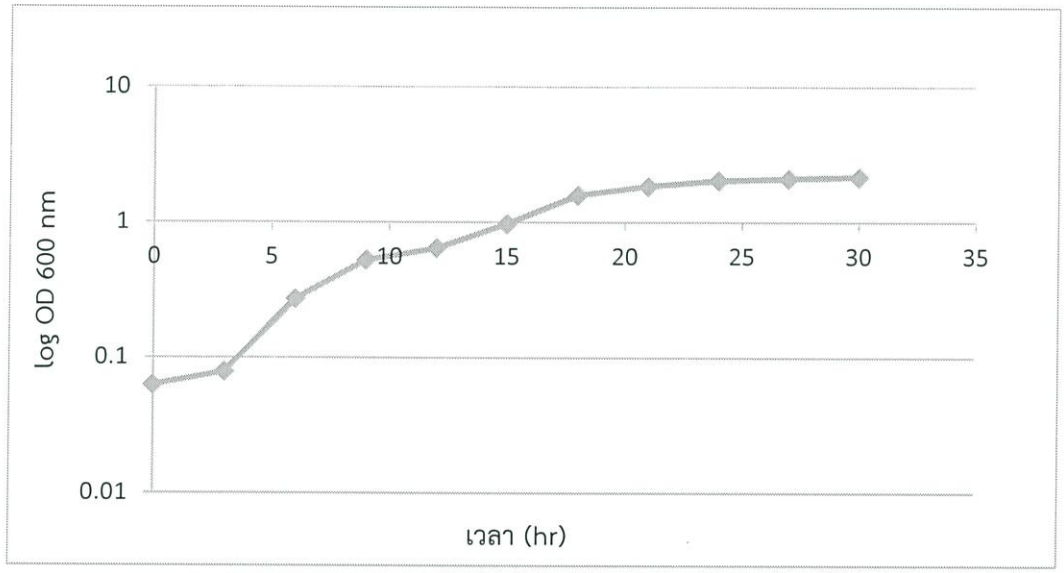
ตารางที่ 4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อโพรไบโอติกและเชื้อ *V. alginolyticus* (ต่อ)

ลำดับที่	รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนี	รูปร่างของเซลล์ (1000 เท่า)	ลักษณะของเชื้อ
4	BP2			โคโลนี : มีสีขาว ลักษณะกลม โค้งนูน มันวาว รูปร่างเซลล์ : มีลักษณะเป็นท่อน
5	BP			โคโลนี : มีสีขาว ลักษณะกลม แบนราบ ขอบหยัก รูปร่างเซลล์ : มีลักษณะเป็นท่อนสั้น อาจอยู่เป็นท่อนเดี่ยวหรือต่อกันเป็นสาย
6	*Vibrio*			โคโลนี : มีสีเหลือง ลักษณะกลมนูน ขอบเรียบ มันวาว รูปร่างเซลล์ : มีลักษณะเป็นท่อนสั้นโค้งงอ

จากตารางที่ 4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อโพรไบโอติกและเชื้อ *V. alginolyticus* พบว่าเชื้อโพรไบโอติกมีรูปร่างเซลล์เป็นรูปท่อน ลักษณะโคโลนีมีสีขาวบนอาหาร YM ลักษณะโคโลนีแต่งต่างกันไป โดยเชื้อโพรไบโอติกรหัส BS โคโลนีลักษณะกลม แบนราบ ขอบหยัก เชื้อโพรไบโอติกรหัส BL โคโลนีลักษณะกลม แบนราบ มันวาว เชื้อโพรไบโอติกรหัส BP โคโลนีลักษณะกลม แบนราบ ขอบหยัก เชื้อโพรไบโอติกรหัส BM และ BP2 โคโลนีลักษณะกลม โค้งนูน มันวาว เชื้อ *V.alginolyticus*ลักษณะโคโลนีบนอาหาร TCBS มีสีเหลือง ลักษณะกลมนูน ขอบเรียบ มันวาวเซลล์มีรูปร่างเป็นท่อนสั้นโค้งงอ

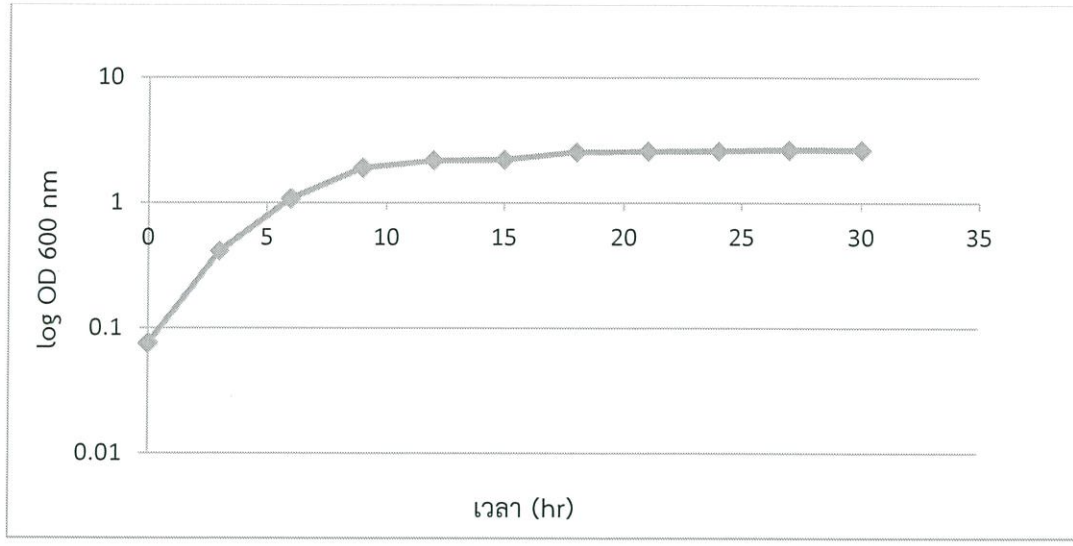
4.1.1 การศึกษาลักษณะการเจริญของเชื้อโพรไบโอติกในอาหารเหลว YM

จากการศึกษาลักษณะการเจริญของเชื้อโพรไบโอติกในอาหารเหลว YM โดยเขี่ยเชื้อโพรไบโอติกทั้ง 5 ชนิด ลงบนอาหารวุ้นเอียง YM บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงทำเป็น cell suspension โดยเติม tween 80 0.1 เปอร์เซ็นต์นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ปรับให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากันในแต่ละหลอด ปิเปตสารละลายเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในอาหารเหลว YM บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสในสภาวะเขย่า 150 รอบต่อนาที วัดค่าการดูดกลืนแสงทุกๆ 3 ชั่วโมง สร้างกราฟการเจริญของเชื้อโพรไบโอติกแต่ละรหัส (ดังแสดงในรูปที่ 4.1 - 4.5)



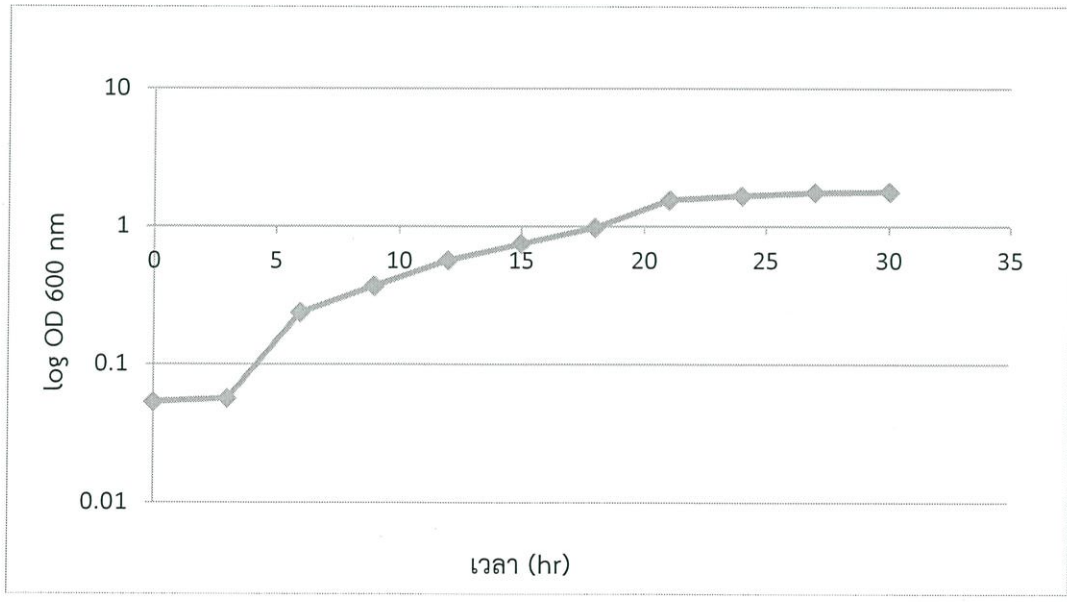
รูปที่ 4.1 แสดงการเจริญของเชื้อโพรไบโอติกรหัส BM

จากรูปที่ 4.1 แสดงการเจริญของเชื้อโพรไบโอติกรหัส BM ในอาหารเหลว YM พบว่า เชื้อมีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วง 3 – 18 ชั่วโมง และเริ่มเข้าสู่ช่วง early stationary phase ในชั่วโมงที่ 18



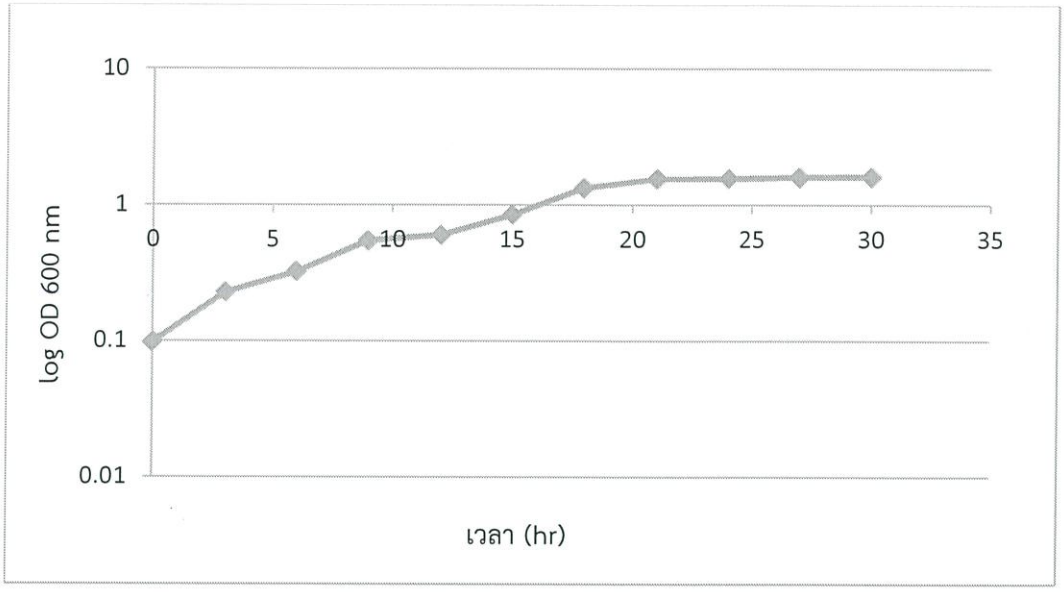
รูปที่ 4.2 แสดงการเจริญของเชื้อโพรไบโอติกรหัส BL

จากรูปที่ 4.2 แสดงการเจริญของเชื้อโพรไบโอติกรหัส BL พบว่า เชื้อมีการเจริญอย่างรวดเร็ว ในช่วง 0-15 ชั่วโมง และเริ่มเข้าสู่ช่วง early stationary phase ในชั่วโมงที่ 15



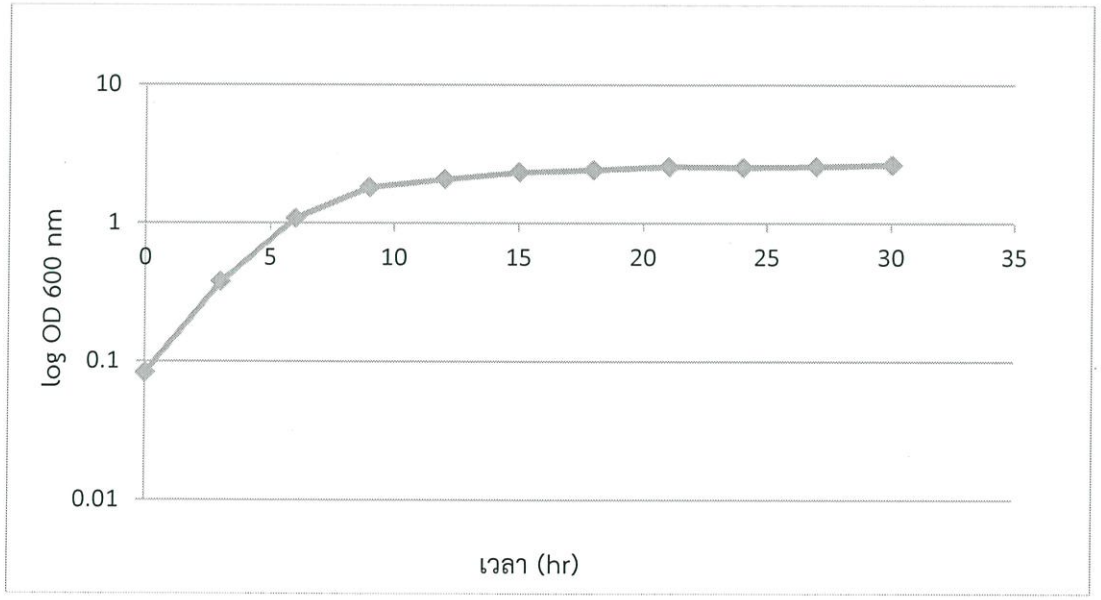
รูปที่ 4.3 แสดงการเจริญของเชื้อโพรไบโอติกรหัส BS

จากรูปที่ 4.3 แสดงการเจริญของเชื้อโพรไบโอติกรหัส BS พบว่า เชื้อมีการเจริญอย่างรวดเร็ว ในช่วง 3-21 ชั่วโมง และเริ่มเข้าสู่ช่วง early stationary phase ในชั่วโมงที่ 21



รูปที่ 4.4 แสดงการเจริญของเชื้อโพรไบโอติกรหัส BP2

จากรูปที่ 4.4 แสดงการเจริญของเชื้อโพรไบโอติกรหัส BP2 พบว่า เชื้อมีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วง 0-18 ชั่วโมง และเริ่มเข้าสู่ช่วง early stationary phase ในชั่วโมงที่ 18

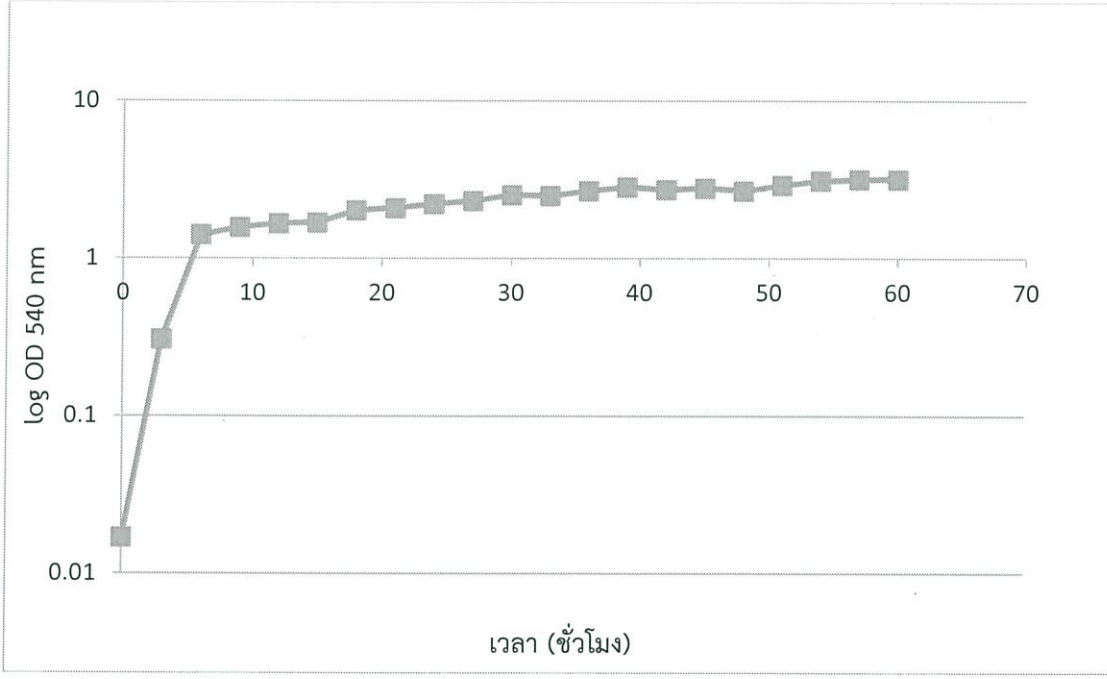


รูปที่ 4.5 แสดงการเจริญของเชื้อโพรไบโอติกรหัส BP

จากรูปที่ 4.5 แสดงการเจริญของเชื้อโพรไบโอติกรหัส BPพบว่า เชื้อมีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วง 0-15 ชั่วโมง และเริ่มเข้าสู่ช่วง early stationary phase ในชั่วโมงที่ 15

4.1.2 การศึกษาลักษณะการเจริญของเชื้อ *V. alginolyticus*ในอาหารเหลว TSB 1.5 เปอรด์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์

ศึกษาลักษณะการเจริญของเชื้อ *V. alginolyticus* ในอาหารเหลว TSB 1.5 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสในสภาวะเขย่า 150 รอบต่อนาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ทุกๆ 3 ชั่วโมง จนครบ 63 ชั่วโมง นำค่าการดูดกลืนแสงมาสร้างกราฟการเจริญของเชื้อ



รูปที่ 4.6 แสดงการเจริญของเชื้อ V. alginolyticusในอาหารเหลว TSB 1.5 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์

จากรูปที่ 4.6 การเจริญของเชื้อ *V. alginolyticus* ในอาหารเหลว TSB 1.5 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์ พบว่าเชื้อ *V. alginolyticus* มีการเจริญอย่างรวดเร็วในชั่วโมงที่ 0 ถึง ชั่วโมงที่ 9 หลังจากนั้นมีการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ ไปจนถึงชั่วโมงที่ 63

4.2การศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *V. alginolyticus*ของเชื้อโพรไบโอติก

4.2.1 การศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *V. alginolyticus*ของเชื้อโพรไบโอติกในห้องทดลอง

การศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *V. alginolyticus* ของเชื้อโพรไบโอติกด้วยวิธี Challenge test โดยนำเชื้อโพรไบโอติก รหัส BM, BL, BS, BP2 และ BP ในอาหารเหลว YM อายุ 24 ชั่วโมง มาผสมกันในอัตราส่วน 1:1:1:1:1 และเชื้อ *V. alginolyticus* ในอาหารเหลว TSB 1.5 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์ อายุ 24 ชั่วโมง มาผสมกัน โดยมีอัตราส่วนของเชื้อ*V. Alginolyticus* ต่อเชื้อโพรไบโอติกเป็น 1:1, 1:3, 1:5 และ 1:10 แบ่งเป็น 2 ชุดการทดลองโดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ 37 องศาเซลเซียส ทดสอบผลโดยการขีดลงบนจานเพาะเชื้อ (Simple streak) ลงบนอาหาร TCBS เพื่อดูการเหลือรอดของเชื้อ*V. alginolyticus*

ตารางที่ 4.2 การเจริญของเชื้อ *V. alginolyticus* บนอาหาร TCBS ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

วันที่ / อัตราส่วน	0	1	2	3	4	5
1:1	+	+	+	+	+	+
1:3	+	+	+	+	+	+
1:5	+	+	+	+	+	+
1:10	+	+	-	-	-	-
ชุดควบคุม V	+	+	+	+	+	+
ชุดควบคุม P	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ ผสมเชื้อ *V. alginolyticus* ต่อเชื้อโพรไบโอติกในอัตราส่วน 1:1, 1:2, 1:3 และ 1:4 ชุดควบคุมที่มีแต่เชื้อ *V. alginolyticus* (V) ชุดควบคุมที่มีแต่เชื้อโพรไบโอติก (P)

จากตารางที่ 4.2 การเจริญของเชื้อ *V. alginolyticus* บนอาหาร TCBS ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในวันที่ 0 พบการเจริญของเชื้อทุกอัตราส่วน และชุดควบคุม V ที่ใส่แต่เชื้อ *V. alginolyticus* ไม่พบการเจริญของชุดควบคุม P ที่ใส่แต่เชื้อโพรไบโอติก เชื้อโพรไบโอติกต่อเชื้อ *V. alginolyticus* ที่อัตราส่วน 1:1, 1:2 และ 1:3 ยังพบการเจริญของเชื้อ *V. alginolyticus* บนอาหาร TCBS ในวันที่ 1-5 แต่มีปริมาณเชื้อที่เจริญน้อยกว่าวันที่ 0 ส่วนอัตราส่วน 1:4 ไม่พบการเจริญของเชื้อ *V. alginolyticus* ในวันที่ 1-5 และชุดควบคุมที่มีแต่เชื้อ *V. alginolyticus* พบการเจริญตั้งแต่วันที่ 0-5 ชุดควบคุมที่มีแต่เชื้อโพรไบโอติกไม่พบการเจริญของเชื้อ

ตารางที่ 4.3 การเจริญของเชื้อ *V. alginolyticus* บนอาหาร TCBS ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

วันที่ / อัตราส่วน	0	1	2	3	4	5
1:1	+	+	+	+	+	+
1:3	+	-	+	-	-	-
1:5	+	-	-	-	-	-
1:10	+	-	-	-	-	-
ชุดควบคุม V	+	+	+	+	+	+
ชุดควบคุม P	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ ผสมเชื้อ *V. alginolyticus*ต่อเชื้อโพรไบโอติกในอัตราส่วน 1:1, 1:2, 1:3 และ 1:4 ชุดควบคุมที่มีแต่เชื้อ *V. alginolyticus* (V) ชุดควบคุมที่มีแต่เชื้อโพรไบโอติก (P)

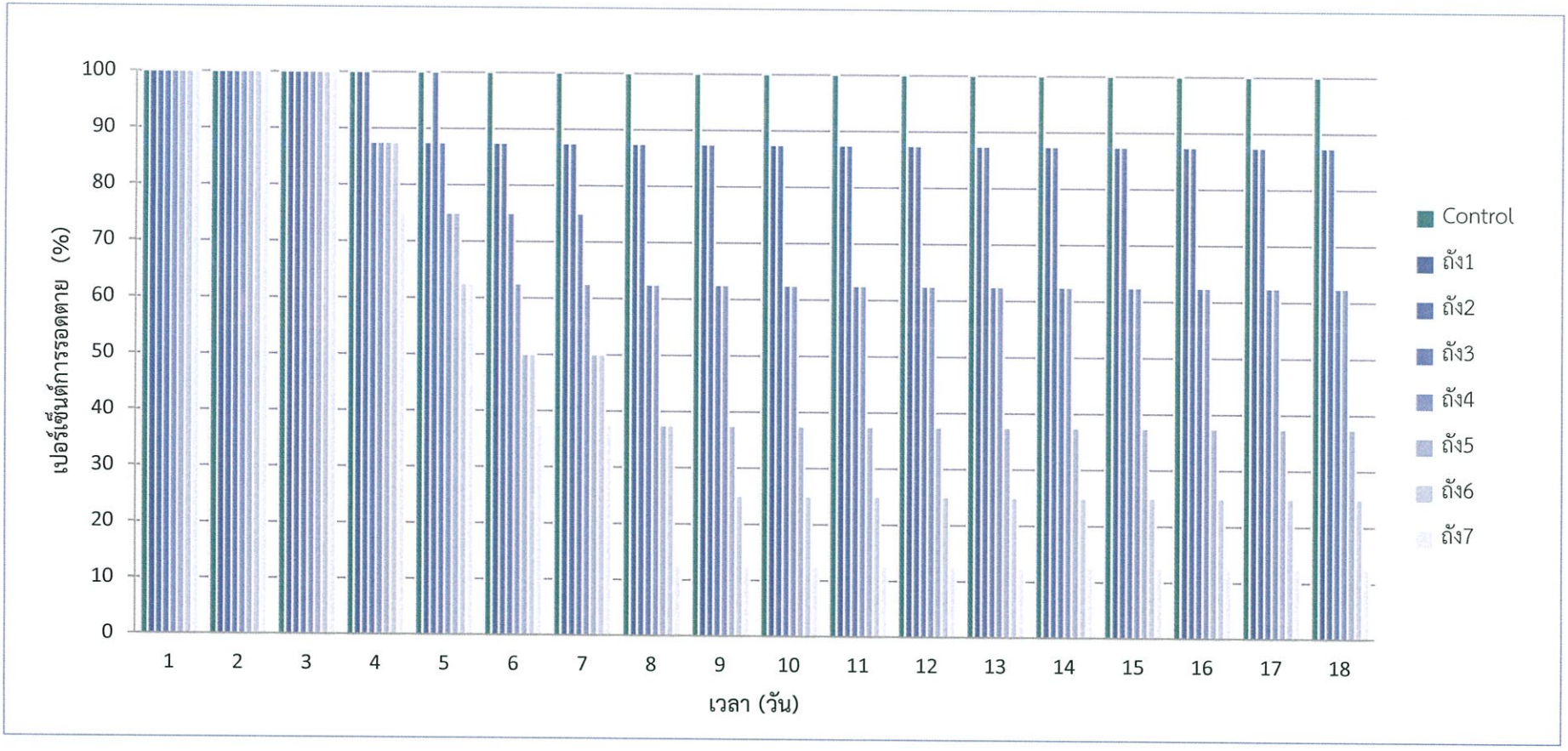
จากตารางที่ 4.3 การเจริญของเชื้อ *V. alginolyticus* บนอาหาร TCBS ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในวันที่ 0 พบการเจริญของเชื้อทุกอัตราส่วน และชุดควบคุม V ที่ใส่แต่เชื้อ *V. alginolyticus* ไม่พบการเจริญของชุดควบคุม P ที่ใส่แต่เชื้อโพรไบโอติก เชื้อโพรไบโอติกต่อเชื้อ *V. alginolyticus* ที่อัตราส่วน 1:1 พบการเจริญของเชื้อ *V. alginolyticus* ตั้งในวันที่ 1-5 แต่มีปริมาณเชื้อที่เจริญน้อยกว่าวันที่ 0 ที่อัตราส่วน 1:2 พบการเจริญของเชื้อ *V. alginolyticus* วันที่ 0 และ 2 ที่อัตราส่วน 1:3 และ 1:4 ไม่พบการเจริญของเชื้อ *V. alginolyticus* ตั้งแต่วันที่ 1-5 และชุดควบคุมที่มีแต่เชื้อ *V. alginolyticus* พบการเจริญตั้งแต่วันที่ 0-5 ชุดควบคุมที่มีแต่เชื้อโพรไบโอติกไม่พบการเจริญของเชื้อ

4.2.2 การศึกษาความสามารถของเชื้อโพรไบโอติกต่อเปอร์เซ็นต์การรอดตายของกุ้งก้ามกรามที่ติดเชื้อ *V. alginolyticus*

คัดแยกกุ้งก้ามกรามที่มีขนาด 5-6 เซนติเมตร ใส่ในตู้กระจก ตู้ละ 8 ตัว แต่ละตู้มีระดับน้ำ 10 ลิตร จำนวน 8 ตู้ โดยแบ่งเป็น ชุดควบคุมที่ไม่ใส่เชื้อ *V. alginolyticus* และเชื้อโพรไบโอติก ตู้ที่ 1- 7 ใส่เชื้อ *V. alginolyticus* ให้กุ้งติดเชื้อ โดยตู้ที่ 1 ให้กุ้งติดเชื้อเป็นเวลา 1 วัน ตู้ที่ 2 ให้กุ้งติดเชื้อเป็นเวลา 2 วัน ตู้ที่ 3 ให้กุ้งติดเชื้อเป็นเวลา 3 วัน ตู้ที่ 4 ให้กุ้งติดเชื้อเป็นเวลา 4 วัน ตู้ที่ 5 ให้กุ้งติดเชื้อเป็นเวลา 5 วัน ตู้ที่ 6 ให้กุ้งติดเชื้อเป็นเวลา 6 วัน และตู้ที่ 7 ให้กุ้งติดเชื้อเป็นเวลา 7 วัน แล้วจึงใส่โพรไบโอติกทุกวันเป็นเวลา 18 วัน

ตารางที่ 4.4 จำนวนกุ้งก้ามกรามที่เหลือรอดหลังจากทำให้ติดเชื้อ *V. alginolyticus*

วันที่ / ระยะเวลาติดเชื้อ	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1 วัน	8	8	8	8	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
2 วัน	8	8	8	8	8	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
3 วัน	8	8	8	7	7	6	6	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
4 วัน	8	8	8	7	6	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
5 วัน	8	8	8	7	6	4	4	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
6 วัน	8	8	8	7	5	4	4	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
7 วัน	8	8	8	6	5	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ชุดควบคุม	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8



รูปที่ 4.7 เปอร์เซ็นต์การรอดตายของกุ้งก้ามกรามที่ติดเชื้อ V. alginolyticus เป็นเวลา 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 วัน ก่อนได้รับเชื้อโพรไบโอติก

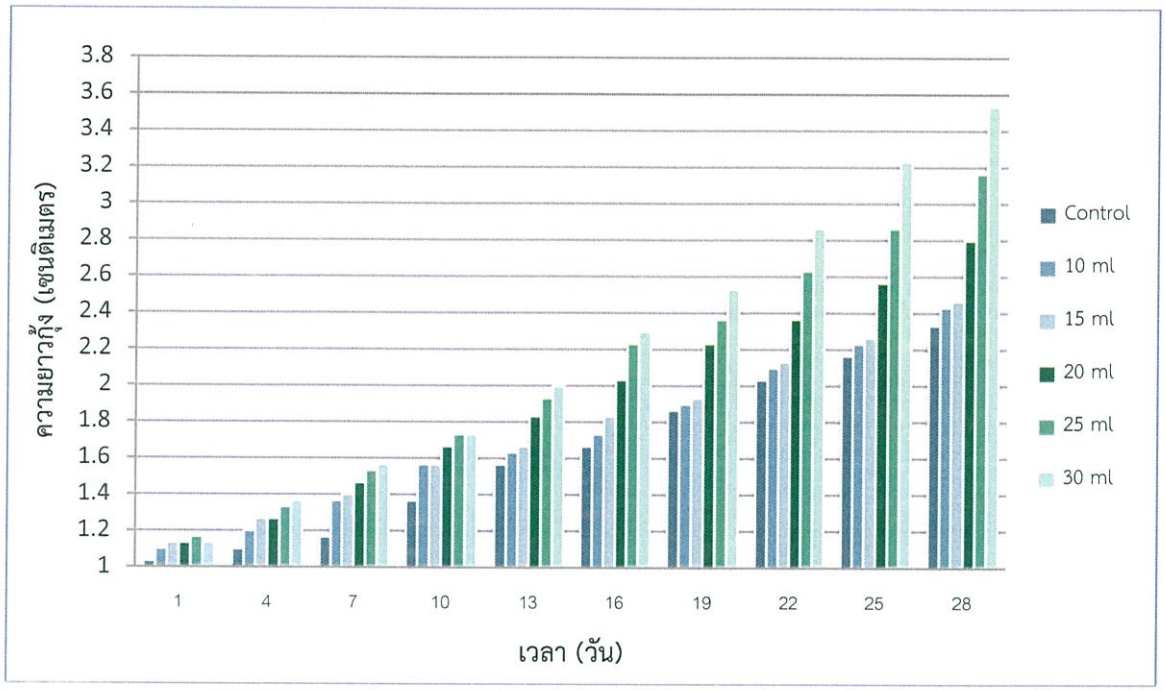
จากตารางที่ 4.4 ภายใน 3 วันแรกหลังจากติดเชื้อ กุ้งไม่มีการตาย ถังที่ติดเชื้อ 3-7 วัน กุ้งเริ่มตายในวันที่ 4 ส่วนถังที่ติดเชื้อ 1-2 วัน กุ้งเริ่มตายในวันที่ 5 ถังที่ 1-2 หลังจากได้รับเชื้อโพรไบโอติกแล้ว มีกุ้งตาย 1 ตัวตลอดการทดลอง ส่วนถังที่ 3-7 หลังจากได้รับเชื้อโพรไบโอติกแล้วยังมีกุ้งตายเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ และถังที่ 7 มีจำนวนกุ้งตายมากที่สุด

จากรูปที่ 4.7 พบว่าเปอร์เซ็นต์การรอดตายของกุ้งก้ามกรามที่ติดเชื้อ *V. alginolyticus* เป็นเวลา 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 วัน ก่อนได้รับเชื้อโพรไบโอติก กุ้งก้ามกรามที่ติดเชื้อเป็นเวลา 1 วัน มีเปอร์เซ็นต์การรอดตายมากกว่ากุ้งก้ามกรามที่ติดเชื้อเป็นเวลา 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 วัน กุ้งที่ติดเชื้อเป็นระยะเวลานานจะทำให้มีเปอร์เซ็นต์การรอดตายต่ำลง โดยกุ้งก้ามกรามที่ติดเชื้อเป็นเวลา 7 วัน มีเปอร์เซ็นต์การรอดตายต่ำที่สุด

หลังจากทำให้กุ้งก้ามกรามติดเชื้อ *V. alginolyticus* เป็นเวลา 1 วัน กุ้งเริ่มไม่ว่ายน้ำ และกินอาหารน้อยลง หลังจากกุ้งก้ามกรามติดเชื้อ *V. alginolyticus* เป็นเวลา 3 วัน เริ่มมีกุ้งตาย โดยตัวเป็นสีส้ม กุ้งที่ได้รับเชื้อโพรไบโอติก กุ้งเริ่มกลับมาว่ายน้ำและกินอาหารเหมือนเดิม

4.3 การศึกษาความสามารถของเชื้อโพรไบโอติกต่อการเจริญเติบโตของกุ้งก้ามกราม

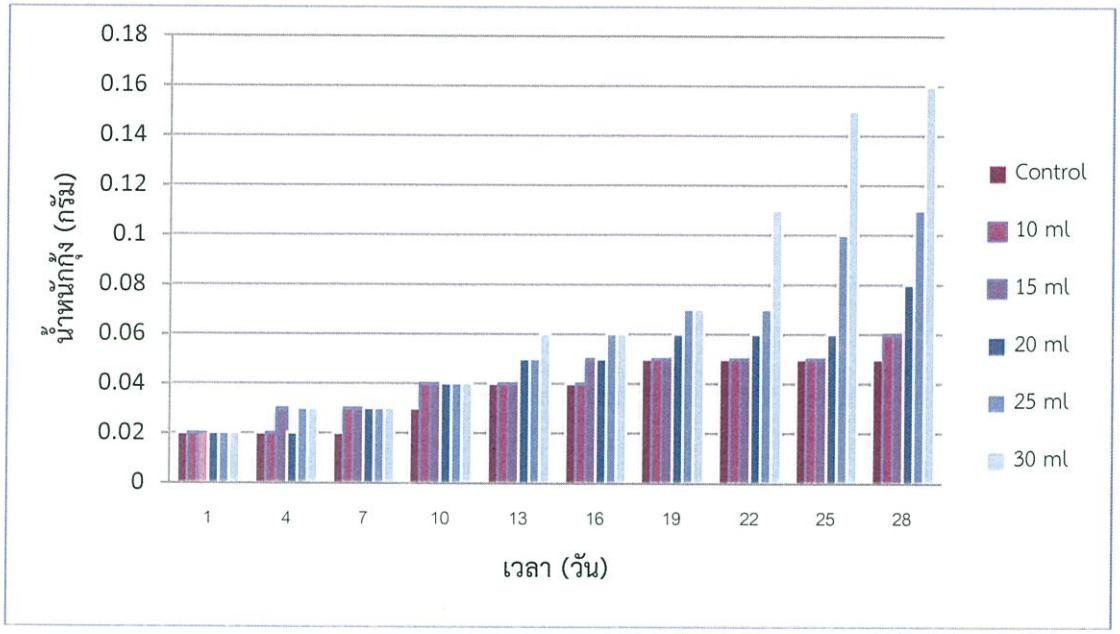
คัดแยกกุ้งก้ามกรามที่มีขนาด 0.5 - 1 เซนติเมตร ใส่ในกะละมัง กะละมังละ 10 ตัว แต่ละกะละมังมีปริมาตรน้ำ 10 ลิตร โดยแบ่งเป็น 6 ชุดการทดลอง โดยชุดควบคุมไม่ใส่เชื้อโพรไบโอติก ชุดทดลองที่ 1 – 5 ใส่เชื้อโพรไบโอติกปริมาตร 10, 15, 20, 25 และ 30 มิลลิลิตรทุกวัน วันละ 1 ครั้ง ชั่งน้ำหนักและวัดความยาวกุ้งทุกๆ 3 วัน สร้างกราฟการเจริญเติบโตของกุ้งก้ามกร้ามที่ใส่เชื้อโพรไบโอติกเทียบกับชุดควบคุม



รูปที่ 4.8 แสดงความยาวของกุ้งก้ามกราม ที่ใส่โพรไบโอติกปริมาตรแตกต่างกัน คือ 10, 15, 20, 25, 30 และชุดควบคุมที่ไม่ใส่โพรไบโอติก

หมายเหตุ ถัง Control คือถังที่ไม่มีการใส่โพรไพโอติก
ถังที่1 ใส่โพรไบโอติกปริมาตร 10 มิลลิลิตรทุกวัน
ถังที่2 ใส่โพรไบโอติกปริมาตร 15 มิลลิลิตรทุกวัน
ถังที่3 ใส่โพรไบโอติกปริมาตร 20 มิลลิลิตรทุกวัน
ถังที่4 ใส่โพรไบโอติกปริมาตร 25 มิลลิลิตรทุกวัน
ถังที่5 ใส่โพรไบโอติกปริมาตร 30 มิลลิลิตรทุกวัน

จากรูปที่ 4.8 ความยาวของกุ้งก้ามกรามที่ใส่โพรไบโอติก มีความยาวมากกว่ากุ้งก้ามกราม ชุดควบคุมที่ไม่ได้เลี้ยงด้วยโพรไบโอติก โดยความยาวของกุ้งก้ามกรามที่เลี้ยงด้วยโพรไบโอติก ปริมาตร 30 มิลลิลิตร มีความยาวมากกว่ากุ้งก้ามกรามที่เลี้ยงด้วยโพรไบโอติกปริมาตร 10, 15, 20 และ 25 มิลลิลิตรอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) โดยความยาวของกุ้งก้ามกรามมีค่ามากขึ้นตามปริมาณโพรไบโอติกที่เลี้ยง และชุดการทดลองที่เลี้ยงด้วยโพรไบโอติกกุ้งก้ามกรามมีความยาวมากกว่าชุดควบคุม



รูปที่ 4.9 แสดงน้ำหนักของกุ้งก้ามกราม ที่ใส่โพรไบโอติกปริมาตรแตกต่างกัน คือ 10, 15, 20, 25, 30 และชุดควบคุมที่ไม่ใส่โพรไบโอติก

หมายเหตุ ถัง Control คือถังที่ไม่มีการใส่โพรไพโอติก
ถังที่1 ใส่โพรไบโอติกปริมาตร 10 มิลลิลิตรทุกวัน
ถังที่2 ใส่โพรไบโอติกปริมาตร 15 มิลลิลิตรทุกวัน
ถังที่3 ใส่โพรไบโอติกปริมาตร 20 มิลลิลิตรทุกวัน
ถังที่4 ใส่โพรไบโอติกปริมาตร 25 มิลลิลิตรทุกวัน
ถังที่5 ใส่โพรไบโอติกปริมาตร 30 มิลลิลิตรทุกวัน

จากรูปที่ 4.9 น้ำหนักของกุ้งก้ามกรามที่ใส่โพรไบโอติก มีค่ามากกว่ากุ้งก้ามกรามชุดควบคุมที่ไม่ได้เลี้ยงด้วยโพรไบโอติก โดยน้ำหนักของกุ้งก้ามกรามที่เลี้ยงด้วยโพรไบโอติกปริมาตร 30 มิลลิลิตร มีค่ามากกว่ากุ้งก้ามกรามที่เลี้ยงด้วยโพรไบโอติกปริมาตร 10, 15, 20 และ 25 มิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) โดยน้ำหนักของกุ้งก้ามกรามมีค่ามากขึ้นตามปริมาณโพรไบโอติกที่เลี้ยง และชุดการทดลองที่เลี้ยงด้วยโพรไบโอติกกุ้งก้ามกรามมีน้ำหนักมากกว่าชุดควบคุม

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

5.1.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อโพรไบโอติกทั้ง 5 ชนิด รหัส BM, BL, BS, BP2 และ BP เชื้อโพรไบโอติกทั้ง 5 ชนิด เป็นแกรมบวกการย้อมแกรมติดสีน้ำเงินของ crystal violet เซลล์มีรูปร่างเป็นแท่งสั้น ลักษณะโคโลนีบนอาหาร YM เป็นสีขาวขุ่น ส่วนเชื้อ *V.alginolyticus* เป็นแกรมลบ การย้อมแกรมติดสีแดงของ safranin o เซลล์มีรูปร่างเป็นแท่งสั้นคล้ายคอมม่า (Comma) มีการเคลื่อนที่บนอาหารแข็ง (Swarming motility)

การศึกษาลักษณะการเจริญของเชื้อโพรไบโอติกในอาหารเหลว YM พบว่า เชื้อโพรไบโอติกรหัส BM มีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วง 3 – 18 ชั่วโมง และเริ่มเข้าสู่ช่วง Early stationary phase ในชั่วโมงที่ 18 เชื้อโพรไบโอติกรหัส BL มีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วง 0-15 ชั่วโมง และเริ่มเข้าสู่ช่วง Early stationary phase ในชั่วโมงที่ 15 เชื้อโพรไบโอติกรหัส BS มีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วง 3-21 ชั่วโมง และเริ่มเข้าสู่ช่วง Early stationary phase ในชั่วโมงที่ 21 เชื้อโพรไบโอติกรหัส BP2 มีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วง 0-18 ชั่วโมง และเริ่มเข้าสู่ช่วง Early stationary phase ในชั่วโมงที่ 18 เชื้อโพรไบโอติกรหัส BP มีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วง 0-15 ชั่วโมง และเริ่มเข้าสู่ช่วง Early stationary phase ในชั่วโมงที่ 15

การเจริญของเชื้อ *V.alginolyticus* ในอาหารเหลว TSB 1.5 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์ พบว่าเชื้อ มีการเจริญอย่างรวดเร็วในชั่วโมงที่ 0 ถึง ชั่วโมงที่ 9 หลังจากนั้นมีการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ ไปจนถึงชั่วโมงที่ 63

จากการศึกษาลักษณะการเจริญของเชื้อโพรไบโอติกทั้ง 5 ชนิด และเชื้อ *V.alginolyticus* พบว่าเชื้อทุกชนิดมีการเจริญอย่างรวดเร็ว และมีการเจริญเข้าสู่ระยะ Early stationary phase ภายใน 24 ชั่วโมง

5.1.2 ความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *V.alginolyticus* ของเชื้อโพรไบโอติก โดยการศึกษาในห้องทดลองพบว่า เชื้อโพรไบโอติกสามารถยับยั้งเชื้อ *V.alginolyticus* ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสได้ดีกว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสต้องใช้เชื้อโพรไบโอติกต่อเชื้อวิบริโอในอัตราส่วน 1:10 จึงจะสามารถยับยั้งเชื้อวิบริโอได้ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสต้องใช้เชื้อโพรไบโอติกต่อเชื้อวิบริโอในอัตราส่วน 1:3 จึงจะสามารถยับยั้งเชื้อวิบริโอได้

การศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *V.alginolyticus* ของเชื้อโพรไบโอติกในกุ้งก้ามกราม พบว่ากุ้งก้ามกรามที่ติดเชื้อเป็นเวลา 1 วันมีเปอร์เซ็นต์การรอดตาย สูงที่สุด และกุ้งก้ามกรามที่ติดเชื้อเป็นเวลา7 วัน มีเปอร์เซ็นต์การรอดตาย ต่ำที่สุด ดังนั้นเชื้อโพรไบโอติกสามารถลดเปอร์เซ็นต์การตายของกุ้งก้ามกรามที่ติดเชื้อ *V.alginolyticus* ได้ โดยประสิทธิภาพของเชื้อโพรไบโอติกจะลดลงหากกุ้งติดเชื้อเป็นเวลานาน

5.1.3 ความสามารถของเชื้อโพรไบโอติกต่อการเจริญเติบโตของกุ้งก้ามกราม

พบว่า ความยาวของกุ้งก้ามกรามที่ใส่โพรไบโอติก มีความยาวมากกว่ากุ้งก้ามกรามชุดควบคุมที่ไม่ได้เลี้ยงด้วยโพรไบโอติก โดยความยาวของกุ้งก้ามกรามที่เลี้ยงด้วยโพรไบโอติกปริมาตร 30 มิลลิลิตร มีความยาวมากกว่ากุ้งก้ามกรามที่เลี้ยงด้วยโพรไบโอติกปริมาตร 10, 15, 20 และ 25 มิลลิลิตรอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) โดยความยาวของกุ้งก้ามกรามมีค่ามากขึ้นตามปริมาณโพรไบโอติกที่เลี้ยง และชุดการทดลองที่เลี้ยงด้วยโพรไบโอติกกุ้งก้ามกรามมีความยาวมากกว่าชุดควบคุม

น้ำหนักของกุ้งก้ามกรามที่ใส่โพรไบโอติก มีค่ามากกว่ากุ้งก้ามกรามชุดควบคุมที่ไม่ได้เลี้ยงด้วยโพรไบโอติก โดยน้ำหนักของกุ้งก้ามกรามที่เลี้ยงด้วยโพรไบโอติกปริมาตร 30 มิลลิลิตร มีค่ามากกว่ากุ้งก้ามกรามที่เลี้ยงด้วยโพรไบโอติกปริมาตร 10, 15, 20 และ 25 มิลลิลิตรอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) โดยน้ำหนักของกุ้งก้ามกรามมีค่ามากขึ้นตามปริมาณโพรไบโอติกที่เลี้ยง และชุดการทดลองที่เลี้ยงด้วยโพรไบโอติกกุ้งก้ามกรามมีน้ำหนักมากกว่าชุดควบคุม

ดังนั้นเชื้อโพรไบโอติกสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของกุ้งก้ามกรามได้ โดยชุดการทดลองที่ใส่โพรไบโอติก 30 มิลลิลิตรมีอัตราการเจริญเติมโตสูงที่สุดเมื่อเทียบกับชุดการทดลองอื่นๆและชุดควบคุม

5.2 ข้อเสนอแนะ

ในการเตรียมน้ำสำหรับใช้เลี้ยงลูกกุ้งก้ามกราม โซเดียมคลอไรด์ที่ใช้ปรับความเค็มควรนำไปทำให้ปลอดเชื้อก่อนนำมาใช้เพื่อเป็นการลดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำ

การเลือกใช้หัวทรายควรเลือกให้เหมาะสมกับขนาดของถังที่ใช้ลี้ยงกุ้งและปริมาตรน้ำ หากใช้หัวทรายใหญ่เกินไปจะเกิดฟองมาก และมีละอองน้ำออกมาจากถังที่ทำการทดลอง ซึ่งหากเป็นถังที่ใส่เชื้อก่อโรค อาจทำให้เชื้อนั้นติดมากับละอองน้ำและทำให้เกิดการปนเปื้อน แต่หากหัวทรายมีขนาดเล็กเกินไปอาจทำให้ออกซิเจนในน้ำไม่เพียงพอ ทำให้กุ้งเครียดและกินอาหารลดลง

การเปลี่ยนถ่ายน้ำในบ่อกุ้ง การถ่ายน้ำออกไม่ควรเกิน 60 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรน้ำในถังทั้งหมดและต้องเติมน้ำเข้าไปให้มีปริมาตรเท่าเดิม ขี้กุ้งที่เกิดขึ้น อาจใช้สายยางในการดูดออกหรือใช้เครื่องกรอง จะทำให้ยืดระยะเวลาในการเปลี่ยนถ่ายน้ำได้

จากการทดลองทำให้กุ้งก้ามกรามติดเชื้อ *V. alginolyticus* เป็นระยะเวลาแตกต่างกันก่อนให้เชื้อโพรไบโอติก พบว่าประสิทธิภาพของเชื้อโพรไบโอติกจะลดลงหากกุ้งติดเชื้อเป็นระยะเวลานาน ดังนั้นการป้องกันการติดโรคของกุ้งก้ามกราม ควรมีการให้อาหารกุ้งร่วมกับเชื้อโพรไบโอติก เพื่อเป็นการป้องกันการติดเชื้อของกุ้งและเป็นการเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของกุ้งก้ามกรามอีกด้วย

เชื้อโพรไบโอติกสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของกุ้งก้ามกรามได้ ปริมาตรโพรไบโอติกที่ใช้เลี้ยงกุ้งก้ามกรามมีผลต่อการเจริญเติมโตของกุ้ง ยิ่งกุ้งมีขนาดใหญ่ขึ้นก็ยิ่งมีความต้องการอาหารและปริมาณเชื้อโพรไบโอติกเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นจึงควรเพิ่มปริมาณเชื้อโพรไบโอติกตามการเจริญเติบโตของกุ้งก้ามกราม เชื้อโพรไบโอติกสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคในกุ้งได้ ในการทำฟาร์มกุ้งหากเลี้ยงกุ้งด้วยเชื้อโพรไบโอติกร่วมกับการให้อาหารปกติ ก็จะเป็นการป้องกันกุ้งจากการติดโรคต่อไป

เอกสารอ้างอิง

กระสินธุ์ หังสพฤกษ์. 2556. การอนุบาลลูกกุ้งก้ามกรามด้วยสาหร่ายสไปรูลิน่าในระบบน้ำหมุนเวียนแบบปิด. วิทยานิพนธ์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

จันทิมา เพียรผล. 2560. สถานการณ์กุ้งก้ามกราม 9 เดือนแรก ปี 2560. กลุ่มเศรษฐกิจการประมง กองนโยบายและยุทธศาสตร์พัฒนาการประมง กรมประมง.

ปวเรศวร์ อินทุเศรษฐ, ศศิวิมล ปิติพรชัย, พรรณทิพย์ สุวรรณสาครกุล, บดินทร์ อิทธิพงษ์ และ สิริรัตน์ จงฤทธิพร. 2549. การใช้แบคทีเรียแลคติคเป็นโปรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม. หน้า 365-377 ใน การประชุมวิชาการประมง ประจำปี 2549. กรุงเทพฯ : เกษตรกลาง จตุจักร.

ยนต์ มุสิก. 2529. โครงการหนังสืออิเล็กทรอนิกส์ด้านการเกษตรเฉลิมพระเกียรติพระบาทสมเด็จพระ เจ้าอยู่หัว.ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ.คณะประมง.มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วณิชยา น้อยวังคลัง. 2544. อนุกรมวิธานของกุ้งน้ำจืดสกุล *Macrobrachium* Bate, 1868 ในลุ่มน้ำภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย.วิทยานิพนธ์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์. 2551. การจัดจำแนกแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างท่อน : วงศ์วิบริโอนาซีอี. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

สุภาพร สุกสีเหลือง. 2538. การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. ศูนย์สื่อเสริม กรุงเทพ.

อุทัย คันโธ. 2535. หลักการโปรไบโอติกในเชิงอาหารสัตว์. ว.สุกรสาส์น 18 : 11-16.

Ajitha S., Sridhar M., SRIDHAR N., Singh I.S.B. and Varghese V. 2004. "Probiotic Effects of Lactic Acid Bacteria Against *Vibrio Alginolyticus* in *Penaeus* (Fenneropenaeus) *Indicus* (H. Milne Edwards)." Asian Fisheries Science. 17 : 71-80.

Author. 2013. **การเลี้ยงกุ้งก้ามกราม**. [Online]. เข้าถึงได้จาก : http://www.thaikasetsart.com/การเลี้ยงกุ้งก้ามกราม/.

Fuller, R. 1989. "Probiotics in man and animals." J Food Microbiol. 66 : 365-78.

Fuller, R. 1993. Probiotic Food Currentuse and Future Development. Int Food Ingred. 3 : 23-26.

Gupta, A. Verma, G. and Gupta P.D. 2016. "Growth Performance, Feed Utilization, Digestive Enzyme Activity, Innate Immunity and Protection Against *Vibrio harveyi* of Freshwater Prawn, *Macrobrachium rosenbergii* Fed Diets

Supplemented with *Bacillus coagulans*." Aquaculture International. 24(5) :1379–1392.

Isolauri E., Sutas Y., Kankaanpaa P., Arvilommi H., Salminen S. and Am J C.N. 2001. "Probiotics : Effect on Immunity." The American Journal of Clinical Nutrition. 73 : 444S-450S.

Kaila M., Isolauri E., Soppi E., Virtanen E., Laine S. and Arvilommi H. 1992. "Enhancement of the Circulating Antibody Secreting Cell Response in Human Diarrhea by a Human *Lactobacillus* strain. Pedialr Res. 32 : 141-144.

Khow-ean U. 2006. "Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine. Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, 90110, Thailand Songkla Med J . 24(4) : 315-323.

Lavilla-Pitogo, C.R ., C.L. Baticados, E.R. Cruz-lacierda and L. and de la Pena. 1990. "Occurrence of Luminous Bacteria Disease of *Penaeusmonodon* Larvae in the Philippines." Aquaculture. 91 : 1-13.

Maanee. 2552. **กุ้งก้ามกราม.** [Online]. เข้าถึงได้จาก : http://animal-of-the-world.blogspot.com/2009/09/blog-post_05.html.

McFarlane G. and Cummings JH. 1999. "Probiotics and Prebiotics: can Regulating the Activities of Intestinal Bacteria Benefit Health." BMJ. 318 : 999-1003.

Michail S., Wei S. and Mack DR. 1997. "*Escherichia coli* strain E 2348/69 in Vitro Adhesion is Reduced in the Presence of a *Lactobacillus* species." Gastroenterology. 112 : A1042.

Miettinen M., Matikainen S., Vuopio-Varkila J., Pirhonen J., Varkila K., Kurimoto M., et al. 1998. "Lactobacilli and Streptococci Induce Interleukin-12 (IL-12), IL-18, and Gamma Interferon Production in Human Peripheral Blood Monocellular Cells." InfectImmun. 66 : 6058-6062.

Munn, C.B. 2004. "Marine Microbiology." BIOS Scientific Publishers, London.

Newaj-Fyzul A.H., Al-Harbi B.A. and Austin B. 2014. "Developments in the Use of Probiotics for Disease Control in Aquaculture." Aquaculture. 431 : 1–11.

Paynter J.L. 1989. "Invertebrates in Aquaculture." Refresher Course for Veterinarians, Proceeding 117. The University of Queensland.

Perdigon G., Macias M.E., Alvarez S., Oliver G. and Holgado A.A. 1986. "Effect of Periorally Administrated Lactobacilli on Macrophage Activation in Mice." Infect Immun. 53 : 404-410.

Pothoulakis C., Kelly C.P., Joshi M.A., Gao N., O'Keane C.J., Castagliuolo I., et al. 1993. "*Saccharomyces boulardii* Inhibits *Clostridium difficile* Toxin A Binding and Enterotoxicity in Rat Ileum." Gastroenterology. 104 : 1108-1115.

Ranjit K., Ram P.R., Sanjay B.J., Rajive K.B., Kundan K. and Gyanaranjan D. 2013. "Effect of Dietary Supplementation of *Bacillus licheniformis* on Gut Microbiota, Growth and Immune Response in Giant Freshwater Prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man, 1879). Aquacult Int. 21 : 387–403.

Salminen S., Bouley C., Boutron-Ruault M.C., Cummings J.H., Franck A., Gibson G.R., et al. 1998. "Functional Food Science and Gastrointestinal Physiology and Function." Br J Nutr. 80(Suppl) : S147-S171.

Silva M., Jacobus N.V., Deneke C. and Gorbach S.L. 1987. "Antimicrobial Substance From a Human Lactobacillus Strain." Antimicrob Agents Chemother. 31 : 1231-3.

Subuntith N., Sunisa S., Traimat B. and Verapong V. 2012. "Potential *Bacillus* Probiotics Enhance Bacterial Numbers, Water Quality and Growth During Early Development of White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*)." Veterinary Microbiology. 159 : 443–450.

Suskovic J., Kos B., Goreta J. and Matosic S. 2001. "Role of Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria in Symbiotic Effect." Food TechnolBiotechnol. 39 : 227-235.

Victor C. and Uwe S. 2014. "Environmental Dependence of Stationary Phase Metabolism in *Bacillus subtilis and Escherichia coli.*" Applied and Environmental Microbiology. 80(9) : 2901- 2909.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อดัดแปลงYM Agar โดยเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนเป็น Fructose syrup

Malt extract	3	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	3	กรัมต่อลิตร
Peptone	5	กรัมต่อลิตร
Fructose	25	มิลลิลิตรต่อลิตร
Agar	15	กรัมต่อลิตร

ขั้นตอนการเตรียม

นำส่วนประกอบต่างๆทั้งหมดมาผสมกันเติมน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปต้ม และคนจนส่วนผสมต่างๆละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำไปบรรจุหลอดทดลองขนาด 20 มิลลิลิตร ปริมาณ 7 มิลลิลิตร ปิดปากหลอดด้วยจุกสำลี จากนั้นนำไปทำให้ปลอดเชื้อด้วยเครื่องความดันไอน้ำ ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.2 การเตรียมอาหารดัดแปลง TSA (Trypticase soy agar) ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์15 ppt

Tryptone	17	กรัมต่อลิตร
Soytone	3	กรัมต่อลิตร
Grucose (Dextrose)	2.5	กรัมต่อลิตร
Sodium chloride	15	กรัมต่อลิตร
Dipotassium HydrogenPhosphate	2.5	กรัมต่อลิตร
Agar	15	กรัมต่อลิตร

ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.3±0.2

ขั้นตอนการเตรียม

นำส่วนประกอบต่างๆทั้งหมดมาผสมกันเติมน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปต้ม และคนจนส่วนผสมต่างๆละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำไปบรรจุในขวดรูปชมพู่ ปิดปากขวดด้วยจุกสำลี จากนั้นนำไปทำให้ปลอดเชื้อด้วยเครื่องความดันไอน้ำ ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

*แยกเกลือจากส่วนประกอบทั้งหมดมาละลายและทำให้ปลอดเชื้อและจึงนำมาผสมรวมกันทั้งหมด

1.3 การเตรียมอาหารดัดแปลง TSB (Tryptic Soy Broth) ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์15 ppt

Tryptone	17	กรัมต่อลิตร
Soytone	3	กรัมต่อลิตร
Grucose (Dextrose)	2.5	กรัมต่อลิตร
Sodium chloride	15	กรัมต่อลิตร
Dipotassium Hydrogen Phosphate	2.5	กรัมต่อลิตร

ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.3±0.2

ขั้นตอนการเตรียม

นำส่วนประกอบต่างๆทั้งหมดมาผสมกันเติมน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปต้ม และคนจนส่วนผสมต่างๆละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำไปบรรจุในขวดรูปชมพู่ ปิดปากขวดด้วยจุกสำลี จากนั้นนำไปทำให้ปลอดเชื้อด้วยเครื่องความดันไอน้ำ ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

*แยกเกลือจากส่วนประกอบทั้งหมดมาละลายและทำให้ปลอดเชื้อและจึงนำมาผสมรวมกันทั้งหมด

1.4 การเตรียมอาหารแข็ง TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose)

Yeast extract	5	กรัมต่อลิตร
Enzymatic Digest of Casein	5	กรัมต่อลิตร
Enzymatic Digest of Animal Tissue	5	กรัมต่อลิตร
Sodium Citrate	10	กรัมต่อลิตร
Sodium Thiosulfate	10	กรัมต่อลิตร
Oxbile	5	กรัมต่อลิตร
Sodium Cholate	3	กรัมต่อลิตร

Sucose	20	กรัมต่อลิตร
Sodium Chloride	10	กรัมต่อลิตร
Ferric Citrate	1	กรัมต่อลิตร
Bromthymol Blue	0.04	กรัมต่อลิตร
Thymol Blue	0.04	กรัมต่อลิตร
Agar	14	กรัมต่อลิตร

ขั้นตอนการเตรียม

เนื่องจากเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปจึงสามารถชั่งตวงแล้วใช้ได้ทันทีโดยอัตราส่วน 90 กรัมต่อน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปต้ม และคนจนส่วนผสมต่างๆละลายเป็นเนื้อเดียวกันจากนั้นนำไปเทลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ โดยไม่ต้องฆ่าเชื้อ รอจนกว่าอาหารจะแข็งตัว ทิ้งไว้ข้ามคืนจึงจะนำไปเพาะเชื้อได้

2.การเตรียมเชื้อ

2.1 การเตรียมเชื้อโพรไบโอติกทั้ง 5 รหัส

2.1.1 เขี่ยเชื้อโพรไบโอติกแต่ละรหัส คือ BS , BL , BM , BP2 , BP บนหลอดวุ้นเอียง YM ในสภาวะปลอดเชื้อ (Aseptic technique) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.1.2 นำเชื้อโพรไบโอติกแต่ละรหัสลงในอาหารวุ้นเอียง มาเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ทำการเขย่าให้ได้เป็น Cell suspension

2.1.3 นำ Cell suspension ของเชื้อที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรให้อยู่ในช่วง 0.2-0.8

2.1.4 ดูดสารละลายเชื้อโพรไบโอติกแต่ละรหัส ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว YM ที่มีปริมาตร 100 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ และนำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียสในสภาวะเขย่า และทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 3 ชั่วโมง เพื่อศึกษาอัตราการเจริญของแต่ละรหัส

2.2 การเตรียมเชื้อ *Vibrio alginolyticus*

2.2.1 เขี่ยเชื้อจาก stock ลงในอาหาร TSA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.2.2 ใช้ลูปแตะเชื้อมา 1 ลูป เลี้ยงในอาหาร TSB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.2.3 ดูดเชื้อลงในหลอดที่มีปริมาตร 50 มิลลิลิตร เพื่อนำไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้ได้ตะกอนเซลล์

2.2.4 ล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ โดยทำการปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้ได้ตะกอนเซลล์

2.2.5 นำตะกอนเซลล์มาทำเป็น Cell suspension โดยเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 5-10 มิลลิลิตรลงในหลอด และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ให้อยู่ในช่วง 0.2-0.8

2.2.6 ปรับค่าการดูดกลืนแสงให้เท่ากับ 1 (OD = 1) จะทำให้สารละลายเชื้อมีความเข้มข้น 10^7-10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้ในการทดลอง

ภาคผนวก ข

วิธีวิเคราะห์

1.วิธีย้อมแกรม

1.1 หยดน้ำกลั่นลงบนสไลด์ 1 หยด ใช้ลูปแตะเชื้อแล้ว smear ให้เป็นแผ่นฟิล์มบางๆและปล่อยให้แห้ง

1.2 Fix สไลด์โดยผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง ทิ้งให้เย็น

1.3 หยดสี Crystal violet ให้ท่วมรอย smear ทิ้งไว้ 1 นาที

1.4 ล้างออกด้วยน้ำกลั่นแล้วย้อมทับด้วย Gram iodine นาน 1 นาที

1.5 ล้างออกด้วยน้ำกลั่น และล้างสีของ Crystal violet ด้วยแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 2-3 วินาที

1.6 ย้อมทับด้วย Safarnin O นาน 30 วินาที และล้างออกด้วยน้ำกลั่น

1.7 ปล่อยให้สไลด์แห้ง แล้วมาส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2. วิธีชั่งน้ำหนัก

2.1 ใช้เครื่องชั่งแบบดิจิตอล ทศนิยม 2 ตำแหน่ง กด tare ก่อนชั่งน้ำหนักทุกครั้ง

2.2 ใส่น้ำลงในบีกเกอร์ให้เพียงพอต่อตัวกุ้ง จดบันทึกน้ำหนัก (น้ำหนักก่อนชั่ง)

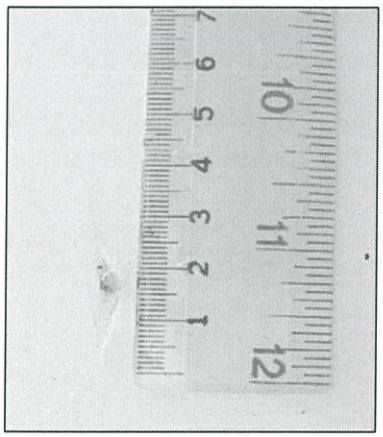
2.3 ชั่งกุ้งขาว รอจนตัวเลขคงที่ (น้ำหนักหลังชั่ง)

2.4 นำน้ำหนักหลังชั่ง (กรัม) – น้ำหนักก่อนชั่ง (กรัม) เท่ากับ น้ำหนักของกุ้งขาว (กรัม)

รูปภาคผนวก ข.1 แสดงวิธีการชั่งน้ำหนักของกุ้งก้ามกราม

3. วิธีวัดความยาว

วางกุ้งก้ามกรามที่จะวัดความยาวในแนวเดียวกับไม้บรรทัด โดยวัดตั้งแต่กรีจนถึงหางกุ้ง จดบันทึกความยาว (เซนติเมตร)



รูปภาคผนวก ข.2 แสดงวิธีการวัดความยาวของกุ้งก้ามกราม

4.วัดค่าการดูดกลืนแสง

4.1 วัดค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อโพรไบโอติกวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรให้อยู่ในช่วง 0.2-0.8

4.2 วัดค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อ *Vibrio alginolyticus*วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น540 นาโนเมตร ให้อยู่ในช่วง 0.2-0.8

ภาคผนวก ค

การอนุบาลลูกกุ้งก้ามกรามเพื่อใช้ในการทดลอง

1.การเตรียมน้ำสำหรับอนุบาลลูกกุ้งก้ามกราม

เตรียมน้ำให้มีความเค็ม 10 ppt วัดปริมาณเกลือในน้ำโดยใช้ Salinity Refractometer จากนั้นเติมปูนขาวเพื่อปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำให้อยู่ที่ระดับ 7 – 8 ในน้ำกรองที่ผ่านการทำให้ปลอดเชื้อ พร้อมให้อากาศด้วยปั๊มลมเป็นเวลา 7 วัน จึงนำน้ำมาใช้เลี้ยงกุ้งในการทดลอง

2.การเตรียมบ่อเลี้ยงกุ้งก้ามกราม

2.1 ใช้บ่อพลาสติก เติมน้ำที่เตรียมไว้สำหรับเลี้ยงกุ้ง ปริมาตร 60 ลิตร จากนั้นปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำในบ่อให้เท่ากับพีเอชของน้ำเลี้ยงกุ้งจากฟาร์ม

2.2 ให้อากาศตลอด 24 ชั่วโมง โดยใช้เครื่องปั๊มอากาศผ่านสายยางต่อด้วยหัวทรายที่ปลายสาย มีวาล์วควบคุมปริมาณลมที่จะออกจากหัวทรายให้มากหรือน้อยตามต้องการ อากาศจะผ่านสายยางไปยังหัวทราย เกิดเป็นฟองอากาศที่กระจายออก หัวทรายจะช่วยให้อากาศละลายในน้ำได้ดี ถ้าขาดอากาศเป็นเวลานานลูกกุ้งจะตายทันที และจะต้องตั้งปั๊มลมให้สูงกว่าระดับตู้กุ้งหรือบ่อกุ้ง เพื่อป้องกันการไหลกลับของน้ำเข้าปั๊ม เวลาที่ปั๊มไม่ทำงาน

2.3 การควบคุมแสง ใช้แผ่นพลาสติกสีทึบกั้นรอบบริเวณที่เลี้ยงกุ้ง โดยเปิดส่วนบนไว้เพื่อให้อากาศสามารถถ่ายเทได้ จะช่วยควบคุมปริมาณแสงและช่วยชะลอการเจริญเติบโตของแพลงค์ตอนพืช การติดเชื้อโรคและสิ่งเจือปนต่างๆ

2.4 เครื่องทำความร้อน (Heater)ใช้ช่วยรักษาระดับอุณหภูมิในน้ำไม่ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งอาจส่งผลให้กุ้งปรับตัวไม่ทันและตายในที่สุด

3.การปล่อยลูกกุ้งลงในบ่อ

ใช้กุ้งระยะ P-15 ที่ได้จากฟาร์ม โดยทำการแช่ถุงที่บรรจุกุ้งลงในบ่ออนุบาลกุ้งเพื่อทำการปรับอุณหภูมิของน้ำภายในถุงและในบ่ออนุบาลให้มีอุณหภูมิใกล้เคียงกัน จากนั้นจึงจะเทลูกกุ้งที่อยู่ในถุงลงในบ่อ

4.อาหารและการให้อาหาร

4.1 อาหารที่ใช้เลี้ยงลูกกุ้งมีหลายชนิด ดังนี้

4.1.1 อาหารที่เป็นสิ่งมีชีวิต ได้แก่ ไรแดง

4.1.2 อาหารที่ไม่มีชีวิต ได้แก่ อาหารเม็ด

4.2 การให้อาหาร

การให้อาหารลูกกุ้ง เวลาและปริมาณการให้อาหารจะแตกต่างกันออกไปตามอายุของกุ้ง ระยะแรก จะให้ลูกกุ้งกินไรแดง 3 มื้อ โดยการให้ไรแดงแต่ละครั้งจะต้องตรวจสอบปริมาณของไรแดงที่ให้ไปก่อนหน้า หากไม่มีเหลืออยู่จะให้ในปริมาณที่น้อย และหากยังไม่พอต่อการเลี้ยงก็ทำการเปลี่ยนเป็นให้อาหารเม็ดเสริม

ระยะที่สอง เมื่อลูกกุ้งสามารถกินอาหารเม็ดได้ทั้งหมดแล้ว ก็จะงดการให้ไรแดงและจะให้อาหารจำนวน 3 ครั้งต่อวัน

5. การดูแลกุ้ง

การดูแลกุ้งที่ต้องปฏิบัติงานประจำวัน ได้แก่ การเปลี่ยนถ่ายน้ำ การวัดค่าความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิของน้ำ

การเปลี่ยนถ่ายน้ำ เปลี่ยนถ่ายน้ำทุกๆ 3 วันหรือเมื่อมีปริมาณขี้กุ้งเยอะอย่างเห็นได้ชัด

วัดค่าความเป็นกรด-ด่างทุกวัน เนื่องจากค่าความเป็นกรด-ด่างส่งผลต่อการอนุบาลลูกกุ้งมาก หากมากกว่า 8.0 หรือต่ำกว่า 7.3 กุ้งจะตายในที่สุด

การวัดอุณหภูมิน้ำ หากอุณหภูมิต่ำกว่า 28-32 องศาเซลเซียส จะใช้ Aquarium heater ในการเพิ่มอุณหภูมิหรือควบคุมอุณหภูมิ

6.การควบคุมปริมาณเชื้อแบคทีเรีย

ตรวจเช็คเชื้อ *Vibrio sp.*ในบ่อเลี้ยงกุ้งก้ามกรามอาทิตย์ละ 1 ครั้ง ทำการ spread ลงบนอาหารแข็ง TCBS ถ้ามีปริมาณ *Vibrio sp.* โคโลนีสีเขียวน้อยกว่า 10 โคโลนีต่อน้ำ 0.1 มิลลิลิตร ถือว่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ส่วน *Vibrio sp.* โคโลนีสีเหลืองไม่ควรเกิน 60โคโลนีต่อน้ำ 0.1 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ง

การวิเคราะห์ทางสถิติ

1.การเปรียบเทียบความยาวกุ้งก้ามกราม

```
ONEWAY Size BY Tank
  /PLOT MEANS
  /MISSING ANALYSIS
  /POSTHOC=LSD ALPHA(0.05).
```

Oneway

Notes

Output Created		15-JUN-2018 11:39:08
Comments		
Input	Active Dataset	DataSet0
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	60
Missing Value Handling	Definition of Missing	User-defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics for each analysis are based on cases with no missing data for any variable in the analysis.
Syntax		ONEWAY Size BY Tank /PLOT MEANS /MISSING ANALYSIS /POSTHOC=LSD ALPHA(0.05).
Resources	Processor Time	00:00:00.94
	Elapsed Time	00:00:04.99

[DataSet0]

ANOVA

Size

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.674	5	.535	1.588	.179
Within Groups	18.189	54	.337		
Total	20.863	59			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Size

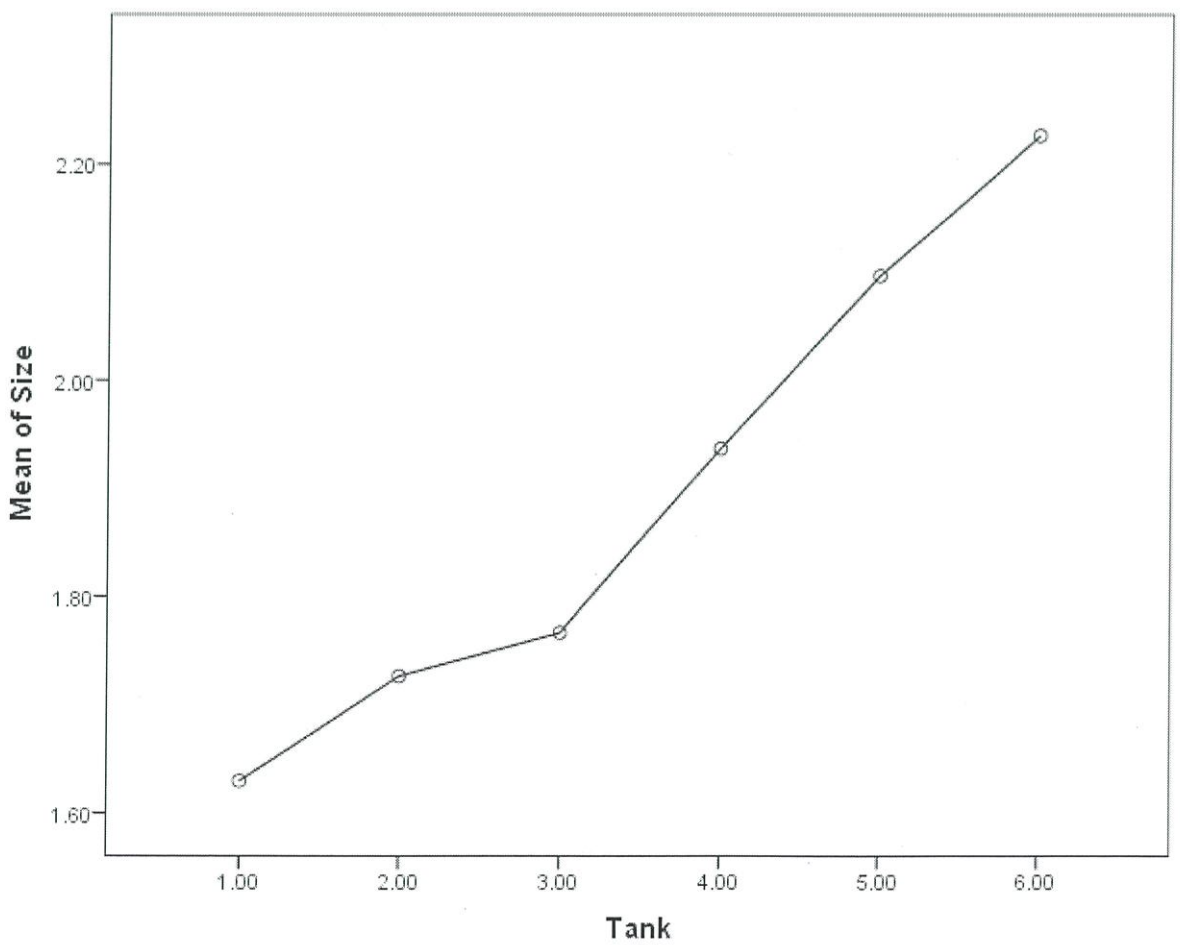
LSD

(I) Tank	(J) Tank	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1.00	2.00	-.09667	.25955	.711	-.6170	.4237
	3.00	-.13667	.25955	.601	-.6570	.3837
	4.00	-.30667	.25955	.243	-.8270	.2137
	5.00	-.46667	.25955	.078	-.9870	.0537
	6.00	-.59667*	.25955	.025	-1.1170	-.0763
2.00	1.00	.09667	.25955	.711	-.4237	.6170
	3.00	-.04000	.25955	.878	-.5604	.4804
	4.00	-.21000	.25955	.422	-.7304	.3104
	5.00	-.37000	.25955	.160	-.8904	.1504
	6.00	-.50000	.25955	.059	-1.0204	.0204
3.00	1.00	.13667	.25955	.601	-.3837	.6570
	2.00	.04000	.25955	.878	-.4804	.5604
	4.00	-.17000	.25955	.515	-.6904	.3504
	5.00	-.33000	.25955	.209	-.8504	.1904
	6.00	-.46000	.25955	.082	-.9804	.0604
4.00	1.00	.30667	.25955	.243	-.2137	.8270
	2.00	.21000	.25955	.422	-.3104	.7304

	3.00	.17000	.25955	.515	-.3504	.6904
	5.00	-.16000	.25955	.540	-.6804	.3604
	6.00	-.29000	.25955	.269	-.8104	.2304
5.00	1.00	.46667	.25955	.078	-.0537	.9870
	2.00	.37000	.25955	.160	-.1504	.8904
	3.00	.33000	.25955	.209	-.1904	.8504
	4.00	.16000	.25955	.540	-.3604	.6804
	6.00	-.13000	.25955	.618	-.6504	.3904
6.00	1.00	.59667*	.25955	.025	.0763	1.1170
	2.00	.50000	.25955	.059	-.0204	1.0204
	3.00	.46000	.25955	.082	-.0604	.9804
	4.00	.29000	.25955	.269	-.2304	.8104
	5.00	.13000	.25955	.618	-.3904	.6504

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Means Plots



2. การเปรียบเทียบน้ำหนักกุ้งก้ามกราม

```
ONEWAY Weight BY Tank
  /PLOT MEANS
  /MISSING ANALYSIS
  /POSTHOC=LSD ALPHA(0.05).
```

Oneway

Notes

Output Created		15-JUN-2018 11:46:07
Comments		
Input	Active Dataset	DataSet1
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	61
	Definition of Missing	User-defined missing values are treated as missing.
Missing Value Handling	Cases Used	Statistics for each analysis are based on cases with no missing data for any variable in the analysis.
Syntax		ONEWAY Weight BY Tank /PLOT MEANS /MISSING ANALYSIS /POSTHOC=LSD ALPHA(0.05).
Resources	Processor Time	00:00:00.09
	Elapsed Time	00:00:00.15

[DataSet1]

ANOVA

Weight

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.007	5	.001	1.733	.142
Within Groups	.044	55	.001		
Total	.051	60			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Weight

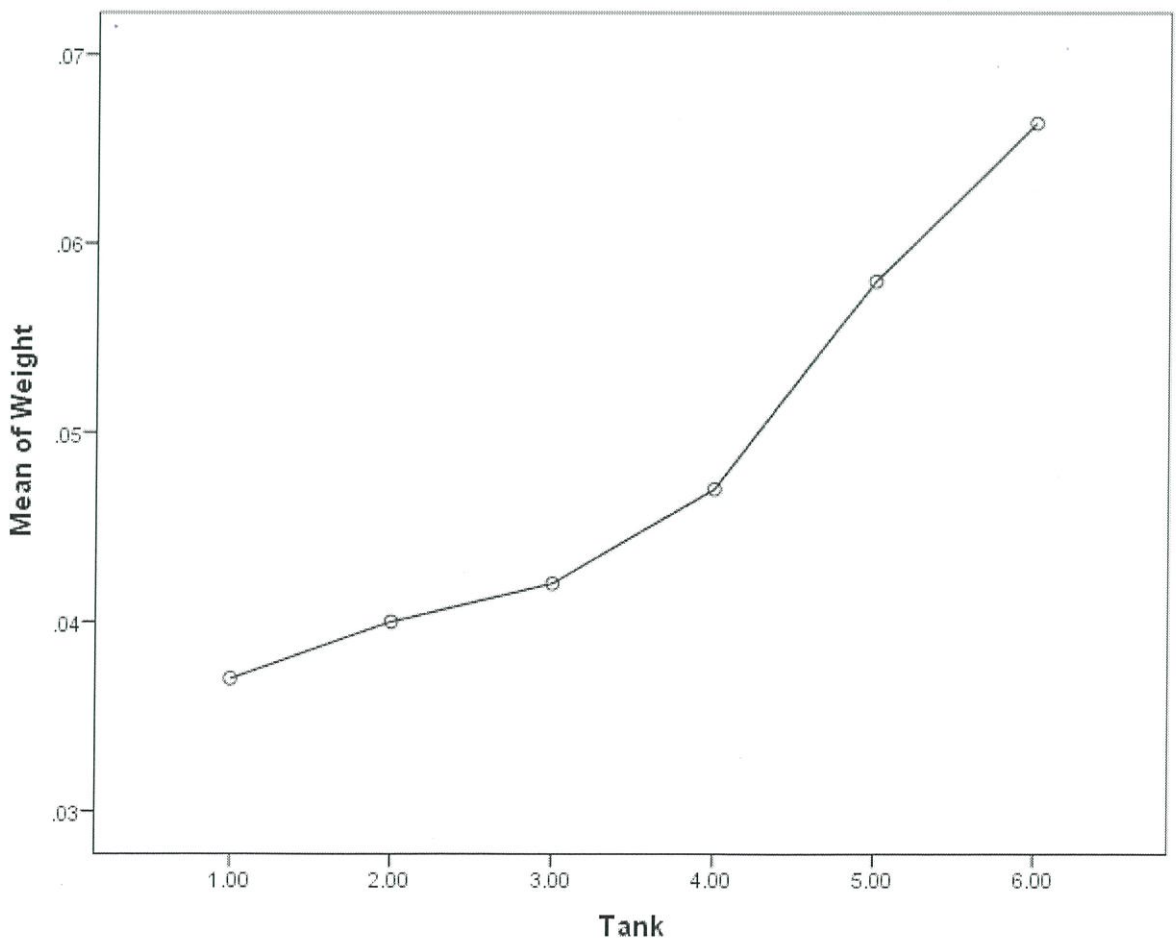
LSD

(I) Tank	(J) Tank	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1.00	2.00	-.00300	.01262	.813	-.0283	.0223
	3.00	-.00500	.01262	.693	-.0303	.0203
	4.00	-.01000	.01262	.432	-.0353	.0153
	5.00	-.02100	.01262	.102	-.0463	.0043
	6.00	-.02936*	.01233	.021	-.0541	-.0047
2.00	1.00	.00300	.01262	.813	-.0223	.0283
	3.00	-.00200	.01262	.875	-.0273	.0233
	4.00	-.00700	.01262	.581	-.0323	.0183
	5.00	-.01800	.01262	.159	-.0433	.0073
	6.00	-.02636*	.01233	.037	-.0511	-.0017
3.00	1.00	.00500	.01262	.693	-.0203	.0303
	2.00	.00200	.01262	.875	-.0233	.0273
	4.00	-.00500	.01262	.693	-.0303	.0203
	5.00	-.01600	.01262	.210	-.0413	.0093
	6.00	-.02436	.01233	.053	-.0491	.0003

4.00	1.00	.01000	.01262	.432	-.0153	.0353
	2.00	.00700	.01262	.581	-.0183	.0323
	3.00	.00500	.01262	.693	-.0203	.0303
	5.00	-.01100	.01262	.387	-.0363	.0143
	6.00	-.01936	.01233	.122	-.0441	.0053
5.00	1.00	.02100	.01262	.102	-.0043	.0463
	2.00	.01800	.01262	.159	-.0073	.0433
	3.00	.01600	.01262	.210	-.0093	.0413
	4.00	.01100	.01262	.387	-.0143	.0363
	6.00	-.00836	.01233	.500	-.0331	.0163
6.00	1.00	.02936*	.01233	.021	.0047	.0541
	2.00	.02636*	.01233	.037	.0017	.0511
	3.00	.02436	.01233	.053	-.0003	.0491
	4.00	.01936	.01233	.122	-.0053	.0441
	5.00	.00836	.01233	.500	-.0163	.0331

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Means Plots



งานทะเบียนคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
คำรับรองเล่มโครงงานพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษา

วันที่ 10 เดือน กรกฎาคม พ.ศ. 2561

ข้าพเจ้า ~~นาย~~/~~นาง~~/นางสาว ร่มฉัตร แสงสง่าศรี รหัสประจำตัว 57050882
~~นาย~~/~~นาง~~/นางสาว ฉัญชิสา พิบูรณ์ รหัสประจำตัว 57050921
นาย/นาง/นางสาว ..... รหัสประจำตัว .....

นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาควิชา ชีววิทยา

ขอรับรองว่าโครงงานพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษา เรื่อง

ชื่อภาษาไทย ผลของโพรไบโอติกต่อลักษณะการเจริญเติบโตของกุ้งก้ามกราม (Macrobachium rosenbergii)

ชื่อภาษาอังกฤษ Effect of probiotics on growth performance of giant freshwater prawn (Macrobachium rosenbergii)

ปีการศึกษา 2560

เป็นผลงานวิจัยที่มิได้คัดลอกหรือละเมิดลิขสิทธิ์ของผู้อื่นและได้ผ่านการตรวจสอบความซ้ำซ้อนเรียบร้อยแล้ว และได้แนบเอกสารการตรวจสอบการลอกเลียนงานวรรณกรรมที่ตรวจสอบจากเล่มโครงงานพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษาฉบับสมบูรณ์แล้ว

โปรแกรมอักขราวิสุทธิ์ 1.83 % หรือโปรแกรม Turnitin ..... %

ลงชื่อ ร่มฉัตร แสงสง่าศรี ลงชื่อ ฉัญชิสา พิบูรณ์
(นางสาวร่มฉัตร แสงสง่าศรี) (นางสาวฉัญชิสา พิบูรณ์)
นักศึกษา นักศึกษา

ข้าพเจ้า ~~ศ.~~ /~~รศ.~~ / ผศ. / ดร. /~~อ.~~ สมชาย ไกรรักษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษา ได้ตรวจสอบโครงงานพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษาของนักศึกษาข้างต้น แล้ว ขอรับรองว่าเป็นผลงานวิจัยของนักศึกษาจริงและมีเนื้อหาสมบูรณ์ จึงลงชื่อไว้เป็นหลักฐาน

ลงชื่อ ..... ลงชื่อ ..... ลงชื่อ .....
อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม