สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การพัฒนาและประยุกต์ใช้โพรไบโอติกในการลดปริมาณของเสียและป้องกันโรคในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

(Development and application of probiotic on the waste management and disease control in the black tiger shrimp culture)

โดย

นางสุบัณฑิต นิ่มรัตน์ [1]

นายวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย [2]

นายมานพ กาญจนบุรางกูร [3]

[1]ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

[2]ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

[3]ภาควิชาประมง คณะเกษตรศาสตร์บางพระ
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก

BK 0106457
- 9 มี.ค. 2552
251545

เสนอต่อ

เริ่มบริการ
- 3 มิ.ย. 2552

สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2548

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องการพัฒนาและประยุกต์ใช้โพรไบโอติกในการลดปริมาณของเสียและป้องกันโรคในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (Development and application of probiotic on the waste management and disease control in the black tiger shrimp culture) สำเร็จเรียบร้อยลงได้โดยได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา ประจำปีงบประมาณ 2548 ข้าพเจ้าและคณะทำงานขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยาที่ให้ความอนุเคราะห์และอำนวยความสะดวกในการทดลองและอุปกรณ์ต่างๆ

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และคณะ

พฤษภาคม 2549

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ.....1
สารบัญ.....2
สารบัญตาราง.....3
สารบัญรูป.....5
บทคัดย่อ 6
Abstract 7
บทที่ 1 บทนำ..... ..8
บทที่ 2 เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา.....11
บทที่ 3 วัสดุและอุปกรณ์ 24
บทที่ 4 วิธีการทดลอง.....26
บทที่ 5 ผลการทดลอง.....30
บทที่ 6 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง.....52
เอกสารอ้างอิง.....58
ภาคผนวก.....62
ภาคผนวก ก.....63
ภาคผนวก ข.....69
ภาคผนวก ค.....71
ภาคผนวก ง.....77

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 คุณสมบัติทั่วไปของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกมาจากลำไส้กุ้งกุลาดำ.....30

2 ประสิทธิภาพในการย่อยโปรตีนด้วยขนาดโคโลนีและเคลียร์โซน ที่เกิดขึ้นบนอาหาร skim milk agar..... 31

3 ประสิทธิภาพในการย่อยคาร์โบไฮเดรตด้วยขนาดโคโลนีและ เคลียร์โซนที่เกิดขึ้นบนอาหาร starch agar.....32

4 ประสิทธิภาพในการย่อยไขมันด้วยขนาดโคโลนีและเคลียร์โซน ที่เกิดขึ้นบนอาหาร tributyrin agar 33

5 การย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของเชื้อที่แยกได้จาก ลำไส้กุ้งกุลาดำบนอาหาร blood agar.....35

6 ประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอาหารและความทนทานต่อ สิ่งแวดล้อมของแบคทีเรียที่แยกจากลำไส้กุ้งกุลาดำ.....37

7 การจำแนกแบคทีเรียที่แยกจากลำไส้กุ้งกุลาดำที่มีคุณสมบัติ เป็นโพรไบโอติก.....38

8 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในตัวอย่างผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก.....38

9 ลักษณะต่าง ๆ ของแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างผลิตภัณฑ์ โพรไบโอติก 39

10 ลักษณะต่าง ๆ ของแบคทีเรียกลุ่ม Lactic acid ที่แยกได้จาก ตัวอย่างผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก.....41

11 อัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส ต่อเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของโพรไบโอติกที่ย่อยสลายโปรตีน.....42

12 อัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส ต่อเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของโพรไบโอติกที่ย่อยสลายโปรตีน.....42

13 อัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส ต่อ เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของโพรไบโอติกที่ย่อยสลายไขมัน.....43

14 อัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส ต่อเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของโพรไบโอติกที่สามารถ ต่อต้านเชื้อก่อโรคในกุ้งกุลาดำได้.....44

15 ขนาดของบริเวณใสที่ทดสอบโดยนำส่วนใสของผลิตภัณฑ์
ที่สามารถต่อต้าน *V. harveyi*.....45
16 ผลการจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก.....45
17 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียสกุล *Staphylococcus*
ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก.....46
18 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียสกุล *Bacillus*
ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก.....47
19 ประสิทธิภาพในการย่อยโปรตีนระหว่างแบคทีเรียที่แยกได้
จากลำไส้ของกุ้งกุลาดำและผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก.....49
20 ประสิทธิภาพในการย่อยคาร์โบไฮเดรตระหว่างแบคทีเรียที่แยกได้
จากลำไส้ของกุ้งกุลาดำและผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก.....50
21 ประสิทธิภาพในการย่อยไขมันระหว่างแบคทีเรียที่แยกได้
จากลำไส้ของกุ้งกุลาดำและผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก.....51

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	ลักษณะของกุ้งกุลาดำ	12
2	ลักษณะวงชีวิตกุ้งกุลาดำ	13
3	เปรียบเทียบการย่อยสลายโปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต ของเชื้อที่แยกได้จากลำไส้กุ้งกุลาดำ	34
4	การเจริญของแบคทีเรียต่อโซเดียมคลอไรด์	35
5	การเจริญของแบคทีเรีย ณ อุณหภูมิช่วงต่างๆ	36
6	การเจริญของแบคทีเรีย ณ pH ช่วงต่างๆ	36
7	ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอาหาร	43

บทคัดย่อ

จากการคัดเลือกแบคทีเรียที่แยกได้จากลำไส้กุ้งกุลาดำจำนวน 14 สายพันธุ์พบว่าแบคทีเรียที่ไม่สามารถย่อยสลายเม็ดแดงจำนวน 6 สายพันธุ์ คือ S2, S3, T0, T1, T2 และ T3 และจากแบคทีเรียกลุ่มนี้พบว่าแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายโปรตีน คาร์โบไฮเดรตและไขมัน คือ S2, S3, T2 และ S3, T3 รวมทั้ง S2, S3, T1, T2 ตามลำดับ ส่วนแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ทนทานต่อสิ่งแวดล้อมได้ดีที่สุดคือ S2 และ T0 แต่ไม่พบว่ามีแบคทีเรียสายพันธ์ใดที่สามารถต่อต้าน *V. harveyi* ได้เลย ดังนั้นการประยุกต์ใช้แบคทีเรียที่แยกได้จากลำไส้กุ้งกุลาดำในการนำมาใช้เป็นโพรไบโอติกคือ เป็นแบคทีเรียผสมโดยนำสายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติที่ดีในด้านต่างๆของโพรไบโอติก ได้แก่ S2, S3, T1, T2 และ T3 ส่วนการคัดแยกแบคทีเรียจากผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกจำนวน 6 ตัวอย่าง ได้แก่ ผลิตภัณฑ์ A, B, C, D, E และ F พบแบคทีเรียปริมาณในช่วง 613.3 ± 344.4 ถึง 85,666.7 ± 3511.9 CFU/g ซึ่งมีปริมาณที่น้อยและไม่เท่ากับปริมาณที่ได้มีการโฆษณาของแต่ละผลิตภัณฑ์นั้นๆ และแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในทุกผลิตภัณฑ์คือแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ผสมกับแบคทีเรียสกุล *Staphylococcus, Micrococcus*, Coryneform และ lactic acid bacterium อยู่บ้าง จากการศึกษาความสามารถในการย่อยสลายสารอาหารพบว่าผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายโปรตีน คาร์โบไฮเดรตและไขมัน ได้ปานกลาง แต่จากการศึกษาความสามารถในการต่อต้านเชื้อก่อโรคในกุ้งกุลาดำพบว่าไม่มีผลิตภัณฑ์ใดเลยที่สามารถต่อต้านเชื้อก่อโรค *Vibrio harveyi* จากผลการทดลองในครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่าแบคทีเรียที่แยกจากลำไส้ของกุ้งกุลาดำสามารถนำมาพัฒนาและประยุกต์ใช้เป็นโพรไบโอติกที่ดีต่อไปได้จากคุณสมบัติที่ดีหลายประการ ส่วนผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกในการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีปริมาณที่น้อยกว่าที่ได้โฆษณาไว้ข้างผลิตภัณฑ์และมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายโปรตีน คาร์โบไฮเดรตและไขมันได้ปานกลางเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียที่แยกจากลำไส้กุ้งกุลาดำ และแบคทีเรียสกุล *Bacillus* และ *Micrococcus* เป็นแบคทีเรียส่วนประกอบหลักทั้งในผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกและในแบคทีเรียกลุ่มที่แยกจากลำไส้กุ้งกุลาดำที่มีคุณสมบัติที่น่าจะพัฒนาเป็นโพรไบโอติกได้

คำสำคัญ : โพรไบโอติก, กุ้งกุลาดำ, *Vibrio harveyi*, *Bacillus*, *Micrococcus*

Abstract

In this study, 14 strains of bacteria were isolated from gastrointestinal tract of black tiger shrimps. Six strains (S2, S3, T0, T1, T2 and T3) from 14 strains were not able to hemolyze red blood cells, indicating that they are potentially nonpathogenic bacteria to both human and animals. Within these bacteria, biodegradation efficiency of protein, carbohydrate and lipid isolates were S2, S3, T2; S3, T3 and S2, S3, T1, T2, respectively. Only S2 and T0 showed the highest toleratant to environmental parameters. However, none of isolated bacteria can not resist to *V. harveyi*. Result concluded that the mixture of S2, S3, T1, T2 and T3 could be developed to be potential probiotic bacteria. Bacteria from six types of commercial probiotic products (A, B, C, D, E and F) were enumerated which showed in the range of 613.3 $\pm$ 344.4 CFU/g to 85,666.7 $\pm$ 3511.9 CFU/g. The concentration of bacteria in all probiotic products were less than those advertised in each products. All of probiotic products consisted of *Bacillus* and mixed with either *Staphylococcus, Micrococcus*, Coryneform or lactic acid bacterium. The efficiency of protein, carbohydrate and lipid degrading probiotic products were medium; however, no products showed the efficiency of *Vibrio harveyi* resistant. Results showed that bacteria isolated from gastrointestinal tract of black tiger shrimp could be developed into effective probiotic bacteria. Application of commercial probiotic bacteria should be pretested before field use due to less numbers of advertised products. *Bacillus* and *Micrococcus* were the major bacteria in both commercial probiotic products and isolated bacteria from gastrointestinal tracts of black tiger shrimps.

Key word : Probiotic, black tiger shrimp, *Vibrio harveyi*, *Bacillus*, *Micrococcus*

บทที่ 1

การเลี้ยงกุ้งกุลาดำในประเทศไทยแม้ว่าจะมีการพัฒนารูปแบบและวิธีการเลี้ยงอย่างต่อเนื่องในช่วงระยะเวลา 10 ปีที่ผ่านมาแต่การจัดการเกี่ยวกับสภาวะแวดล้อมในการเลี้ยงกุ้งยังไม่ได้มีการนำเทคโนโลยีใหม่ๆเข้ามาช่วยบรรเทาปัญหามลภาวะหรือการควบคุมคุณภาพน้ำที่เกิดจากการเลี้ยงกุ้งอย่างเพียงพอ รูปแบบการเลี้ยงกุ้งกุลาดำในปัจจุบันเป็นการเลี้ยงแบบพัฒนาโดยปล่อยลูกกุ้งจำนวนมากทำให้ต้องให้อาหารกุ้งอย่างเต็มที่เร่งเพิ่มผลผลิต (รณชัย, 2535; สุบัณฑิตและคณะ, 2547) ซึ่งจะมีผลทำให้สารอินทรีย์มีปริมาณสูงขึ้นสารอินทรีย์เหล่านั้นได้แก่ เศษอาหารที่เหลือจากการให้อาหารมากเกินไป (Schroder, 1975) ซากแพลงตอนพืชและแพลงตอนสัตว์ (Boyd, 1982) ของเสียที่กุ้งปล่อยออกมาและเปลือกกุ้งที่เกิดจากการลอกคราบ เป็นต้น (ธนาคารกสิกรไทย, 2535) การย่อยสลายของสารอินทรีย์สามารถเกิดขึ้นได้โดยจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะทั้งที่มีอ๊อกซิเจนและไม่มีอ๊อกซิเจน จุลินทรีย์กลุ่มแรกจะทำให้มีการลดลงของก๊าซออกซิเจน และผลิตฟอสเฟต ไนเทรตและไนไทรต์ ในขณะที่จุลินทรีย์ในกลุ่มหลังจะย่อยสลายแบบไม่ใช้ออกซิเจน ทำให้เกิดก๊าซแอมโมเนีย (NH_3)และก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ (สุวิทย์, 2531) สารอาหารเหล่านี้จะกระตุ้นให้เกิดการแพร่ขยายพันธุ์อย่างรวดเร็วของแพลงตอน (Plankton bloom) และเมื่อแพลงตอนพืชเหล่านี้ตายลงก็ยิ่งจะเป็นการเพิ่มให้มีการใช้ออกซิเจนในการย่อยสลายซากแพลงตอน มีผลทำให้เกิดปัญหาการขาดออกซิเจนที่ละลายในน้ำตามมา ถ้าออกซิเจนมีปริมาณลดลงในระดับต่ำต่อเนื่องกันเป็นระยะเวลานานก็จะมีผลต่อการเจริญเติบโตของกุ้ง (บรรจง, 2542)

ในปัจจุบันนี้แม้ว่าผู้ประกอบการการเลี้ยงกุ้งกุลาดำได้หันมานิยมเลี้ยงกุ้งกุลาดำในระบบปิดโดยมีการถ่ายเทน้ำในปริมาณน้อยหรือเกือบจะไม่มีการถ่ายเทน้ำเลยตลอดการเลี้ยงเพื่อหลีกเลี่ยงความเสี่ยงที่อาจเกิดจากการแพร่ระบาดของโรคกุ้งกุลาดำเนื่องจากการเลี้ยงกุ้งกุลาดำในระบบเปิดซึ่งเป็นการเลี้ยงในแบบดั้งเดิมนั้นจำเป็นต้องถ่ายน้ำเข้าออกบ่อยครั้งทำให้มีความเสี่ยงมากขึ้นที่จะเกิดโรคในบ่อกุ้งและเป็นการประหยัดทั้งเวลาและค่าใช้จ่ายในการเลี้ยงกุ้งเพราะการเลี้ยงกุ้งจำเป็นต้องใช้น้ำในปริมาณสูงมากการเลี้ยงกุ้งหนึ่งรุ่นในบ่อเลี้ยง 0.9-6 ไร่ได้ผลผลิตกุ้ง 0.4-2.5 ตันต่อไร่จำเป็นต้องใช้น้ำ 6,000 – 168,000 ตันต่อรุ่น (คณิตและพุทธ, 2535; สุบัณฑิตและคณะ, 2547) ลิลา (2541) ได้รายงานผลงานวิจัยว่าแบคทีเรียวิบริโอในบริเวณชายฝั่งทะเลในปี 2535 มีปริมาณสูงขึ้นเป็น 50-100 เท่า จากที่เคยตรวจพบในปี 2530 จึงเกิดปัญหาโรคระบาดสร้างความเสียหายต่อการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำเป็นอย่างมาก นอกจากนี้การขยายพื้นที่เลี้ยงกุ้งกุลาดำอย่างรวดเร็วก็มีผลทำให้สารอินทรีย์ในบ่อเลี้ยงกุ้งถูกปล่อยลงในแหล่งน้ำธรรมชาติมากขึ้นบริเวณชายฝั่งและปากแม่น้ำจนจุลินทรีย์ในธรรมชาติไม่สามารถย่อยสลายสารอินทรีย์เหล่านั้นได้ทันทำให้คุณภาพน้ำชายฝั่งเสื่อมโทรมและมีผลทำให้มีการขยายพื้นที่การเลี้ยงกุ้งกุลาดำเข้ามาเลี้ยงในบริเวณน้ำจืดหรือบริเวณน้ำที่มีความเค็มต่ำในพื้นที่จังหวัดฉะเชิงเทรา ปราจีนบุรีและนครนายก ซึ่งส่งผลกระทบ

ต่อการปลูกข้าวในบริเวณพื้นที่เหล่านั้น ดังนั้นปัญหามลภาวะน้ำเน่าเสียในบ่อกุ้งจึงเป็นอุปสรรคสำคัญที่ทำให้พื้นที่การเลี้ยงกุ้งได้รับความเสียหายทำให้เกษตรกรย้ายแหล่งเลี้ยงกุ้งไปยังบริเวณที่ไม่มีปัญหามลภาวะของแหล่งน้ำ นอกจากนี้ผู้เลี้ยงกุ้งกุลาดำยังพบกับปัญหาการระบาดของโรคกุ้งแม้ว่าจะได้ป้องกันอย่างดีแล้วก็ตาม เช่น โรคตัวแดงดวงขาว, โรคเหงือกดำ, โรคเรืองแสงในลูกกุ้งจาก *V. harveyi*, โรคไวรัสหัวเหลือง เป็นต้น (สุบัณฑิตและคณะ, 2548) การแก้ไขที่ผ่านมาและยังคงใช้กันถึงทุกวันนี้ก็คือการนำยาปฏิชีวนะมาใช้กันอย่างกว้างขวางทั่วไป

อย่างไรก็ตามการใช้ยากันอย่างอิสระไร้ขอบเขต และขาดการควบคุมอย่างถูกต้องเช่นนี้จึงนำมาซึ่งความสิ้นเปลืองแล้วยังก่อให้เกิดปัญหาตามมาอันได้แก่ ปัญหาการดื้อยาของจุลินทรีย์ต่างๆ ในสิ่งแวดล้อม เกิดปัญหาการตกค้างและสะสมของยาในสัตว์น้ำ ซึ่งเมื่อมนุษย์บริโภคเข้าไป อาจมีผลโดยตรงต่อสมดุลของจุลินทรีย์ที่อาศัยตามปกติในลำไส้ของมนุษย์หรือจุลินทรีย์ที่ดื้อยาอาจเพิ่มจำนวนขึ้นภายในลำไส้จนกระทั่งไปรบกวนการทำงานหรือการป้องกันการติดเชื้อของจุลินทรีย์ภายในลำไส้ได้ ท้ายที่สุดทำให้เกิดการกีดกันทางการค้าส่งออกที่กำลังเป็นปัญหาอยู่ เพื่อเป็นการหลีกเลี่ยงและลดปริมาณการใช้ยาลงจึงเริ่มมีการใช้วิธีการต่างๆ ในการป้องกันและควบคุมโรคในกุ้งกุลาดำ โดยเฉพาะการนำจุลินทรีย์ที่ไม่มีโทษต่อคน สัตว์และสิ่งแวดล้อมมาใช้ในการควบคุมโรคติดเชื้อต่อสัตว์ชนิดต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสัตว์น้ำ วิธีหนึ่งที่นิยมคือ การนำแบคทีเรียที่สามารถควบคุมปริมาณของแบคทีเรียก่อโรคโดยการผลิตสารบางชนิดมากำจัดแบคทีเรียก่อโรค (Chythanya et al., 2002) หรืออาจจะเป็นการกระตุ้นให้เกิดความต้านทานโรคใน host ที่เราเรียกว่าโพรไบโอติก (Hasler, 2002; Panigrahi et al., 2005)) นอกจากนั้นแบคทีเรียมักจะมีอายุที่ไม่ยาวนานนักเช่น แบคทีเรียโดยทั่วไปมีอายุอยู่ระหว่าง 48-72 ชั่วโมงเท่านั้น หลังจากนั้นแบคทีเรียจะตายและถูกย่อยสลายในน้ำหรือในสิ่งแวดล้อมดังกล่าว รวมทั้งยังสามารถเป็นอาหารของกุ้งและสัตว์หน้าดินและรวมทั้งสิ่งมีชีวิตเล็กๆ ในบ่อต่อไป (องอาจ, 2545)

โพรไบโอติกได้รับความนิยมที่นำมาช่วยเหลือในการย่อยอาหารเพื่อช่วยให้กุ้งกุลาดำสามารถใช้อาหารได้อย่างมีประสิทธิภาพและลดปัญหาของเสียได้อย่างมาก (Verschuere et al., 2000; Nimrat et al., 2003) รวมทั้งเป็นการเพิ่มภูมิคุ้มกันโรคแก่กุ้ง (Fuller, 1992; Panigrahi et al., 2005) โดยที่ไม่ต้องใช้สารเคมีหรือยาปฏิชีวนะซึ่งเป็นสารเคมีที่ต้องห้ามและก่อให้เกิดปัญหาต่อการส่งออกของกุ้งกุลาดำดังที่หลายประเทศได้มีมาตราการสั่งห้ามนำเข้ากุ้งกุลาดำที่มียาปฏิชีวนะตกค้างเข้ามาจำหน่าย การใช้โพรไบโอติกผสมลงไปในอาหารกุ้งจะช่วยให้กุ้งย่อยอาหารได้ดีขึ้น แต่อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพการย่อยอาหารของกุ้งก็ขึ้นอยู่กับตัวแปรจำนวนมาก เช่น อุณหภูมิน้ำ ชนิดของอาหาร และวิธีการให้อาหารเป็นต้น นอกจากนั้นยังมีการใช้โพรไบโอติกเพื่อควบคุมสมดุลย์ของสภาพแวดล้อมภายในบ่อ (Fungesminth and Howthorn, 1996; Nimrat et al., 2003)

อย่างไรก็ตามในปัจจุบันเกษตรกรได้มีการนำเอาโพรไบโอติกจากต่างประเทศมาใช้ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำในประเทศอย่างแพร่หลายซึ่งนอกจากก่อให้เกิดปัญหาค่าใช้จ่ายต้นทุนการเลี้ยงกุ้งกุลาดำสูงขึ้นแล้ว ยังเป็นการสูญเสียเงินตราไปยังต่างประเทศโดยไม่ได้พัฒนาขึ้นใช้เองในประเทศ อย่างไรก็ตามการศึกษาทดลองเกี่ยวกับประสิทธิภาพของโพรไบโอติก และความจำเป็นที่นำมาใช้ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำตามความเหมาะสมในแต่ละพื้นที่ สภาพแวดล้อม และวิธีการเลี้ยงที่แตกต่างกัน ก็ยังมีเอกสารวิชาการที่อ้างอิงได้ค่อนข้างจำกัด (สุบัณฑิตและคณะ, 2006) ทำให้ผู้ผลิตขาดข้อมูลพื้นฐานที่ต้องใช้ในการปรับปรุงและพัฒนาคุณภาพของผลิตภัณฑ์ และเป็นการเพิ่มต้นทุนการผลิตต่อเกษตรกรผู้ใช้ ดังนั้น การพัฒนาศึกษารูปแบบและวิธีการพัฒนาสายพันธุ์จุลินทรีย์เพื่อใช้เป็นผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำในประเทศไทยจึงเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อสามารถนำเอาโพรไบโอติกที่ผลิตภายในประเทศมาใช้อย่างมีประสิทธิภาพ ประหยัดค่าใช้จ่าย ไม่ก่อให้เกิดปัญหากับค่าใช้จ่ายที่สูงเกินไป และยังทำให้ประเทศไทยไม่ต้องพึ่งพาผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกจากต่างประเทศ ทำให้การเลี้ยงกุ้งกุลาดำมีความยั่งยืน

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกจากลำไส้กุ้งกุลาดำที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงหรือมีคุณสมบัติที่เหนือกว่าผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก
2. เพื่อศึกษาความสามารถของสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารอาหารและความสามารถของแบคทีเรียต่อการต่อต้านเชื้อก่อโรคในกุ้งกุลาดำ
3. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบความสามารถของโพรไบโอติกที่จำหน่ายในประเทศและต่างประเทศในการย่อยสลายสารอาหาร และความสามารถของแบคทีเรียต่อการต่อต้านเชื้อก่อโรคในกุ้งกุลาดำ

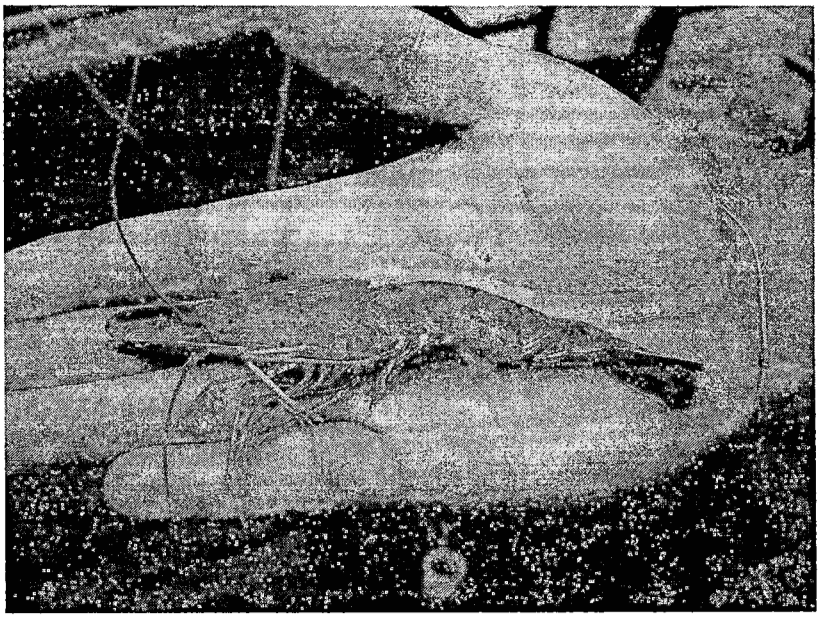
บทที่ 2
เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา จำแนกได้

1. รายละเอียดเกี่ยวกับกุ้งกุลาดำ
2. รายละเอียดเกี่ยวกับโพรไบโอติก
3. รายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

1. รายละเอียดเกี่ยวกับกุ้งกุลาดำ

กุ้งกุลาดำ มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Penaeus monodon* เป็นสัตว์น้ำที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศไทยเป็นอย่างมาก เนื่องจากสามารถเลี้ยงและผลิตได้เป็นอันดับ 1 ของโลก ในปัจจุบันผลผลิตมากกว่า 2 แสนตันต่อปี และส่งออกทำรายได้เข้าสู่ประเทศปีละหลายหมื่นล้านบาท เช่นในปี 2540 มีมูลค่าการส่งออก 49,374.5 ล้านบาท ในปี 2541 มีมูลค่าการส่งออก 58,597.4 ล้านบาท (กรมประมง, http://oae.go.th/statistic/yearbook/2000-01/ Section10/sec10table103. html) และในปี 2545 มีมูลค่าการส่งออกถึง 63,826.26 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, http://www.oae.go.th/statistic/export/1301TP.xls) จะเห็นว่ามีมูลค่าการส่งออกมากขึ้นทุกปี สร้างอาชีพให้ผู้เกี่ยวข้อง เช่น อุตสาหกรรม ห้องเย็น การแปรรูปอาหาร อุตสาหกรรมอาหารสัตว์ การขนส่ง เป็นต้น การเลี้ยงกุ้งเดิมเลี้ยงแบบธรรมชาติ คือ ปล่อยให้น้ำทะเลเข้ามาในนากุ้ง แล้วให้กุ้งที่ติดมาเจริญเติบโตโดยปราศจากการให้อาหาร เมื่อโตขึ้นจึงจับขายซึ่งได้ผลผลิตไม่แน่นอนจึงเปลี่ยนมาเลี้ยงแบบพัฒนาเมื่อ 5-10 ปีที่แล้ว คือ มีการเพาะลูกกุ้งจากพ่อแม่กุ้งซึ่งจากการเลี้ยงและจากธรรมชาติ นำลูกกุ้งที่เพาะได้มาเลี้ยงในบ่อ มีการจัดการที่ดี คือให้อาหาร ถ่ายเทน้ำ ให้อากาศ อย่างสม่ำเสมอ ได้ผลผลิตเพิ่มขึ้นและผลตอบแทนสูง จึงมีการเลี้ยงมากขึ้น (สุบัณฑิตและคณะ, 2547) ในปัจจุบันมีพื้นที่ที่เหมาะสมกับการเลี้ยง ได้แก่ บริเวณชายฝั่งตะวันออก ภาคใต้ฝั่งอ่าวไทยและอันดามัน หรือบริเวณที่นาดินเค็ม เสื่อมสภาพหลังแนวป่าชายเลนที่สามารถกักเก็บน้ำได้ กุ้งกุลาดำมีลักษณะทางชีววิทยา คือ เป็นกุ้งทะเลที่มีขนาดใหญ่ ลำตัวมีสีแดงอมน้ำตาล ลำตัวน้ำตาลเข้มมีลายบาดขวางด้านหลังประมาณ 9 ลาย กรีด้านบนมี 6-8 ซี่ ดังรูปที่ 1

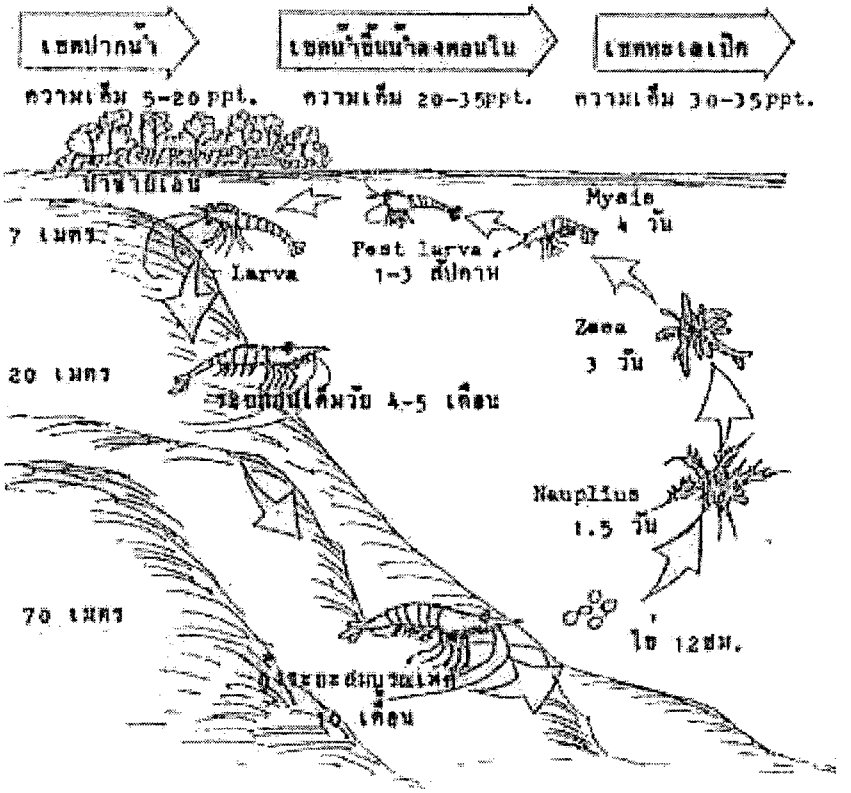


รูปที่ 1 ลักษณะและขนาดของกุ้งกุลาดำ (ภาพโดย สุบัณฑิต นิ่มรัตน์)

กุ้งกุลาดำพบได้ทั่วไปในทะเลแถบเอเชีย ชอบอาศัยพื้นที่ดินทรายปนโคลน ปรับตัวได้ดีในสภาพน้ำกร่อยจนเกือบน้ำจืดได้ สามารถเลี้ยงในบ่อได้ดี การเจริญ อายุ 6 เดือนมีขนาด ประมาณ 70 กรัม ยาว 20 ซม. มีความแข็งแรงเลี้ยงง่ายกว่ากุ้งทะเลชนิดอื่น ชอบกินอาหารตามพื้นทะเลเศษซากสัตว์หน้าดิน กินได้ทั้งพืชและสัตว์แต่ชอบทางเนื้อสัตว์ที่มีกลิ่นคาวมากกว่า เมื่อลอกคราบจะกินอาหารลดลง มีวงจรชีวิต คือ เมื่อออกจากไข่จะเป็นระยะตัวอ่อน Nauplius ต่อมาเป็นระยะ Zoea ระยะ Mysis และระยะ Post Larva ตามลำดับ ดังรูปที่ 2 เมื่อถึงระยะ Post Larva (PL) แล้วจะเรียกว่า ระยะ PL_1 เมื่อถึงระยะ PL ได้ 5 วันจะเรียกว่า PL_5 หลังจาก ระยะ PL_5 เป็นต้นไปถือเป็นการสิ้นสุดระยะวัยอ่อนช่วงต้น สามารถนำไปเลี้ยงในนาเพื่อให้โตได้ขนาดที่ต้องการได้ โดยกุ้งกุลาดำ ระยะ PL_{15} น้ำหนักเฉลี่ย 0.01 กรัม เมื่อเลี้ยงนาน 1 เดือนควรมีน้ำหนัก 2-4 กรัม 2 เดือนมีน้ำหนัก 10-15 กรัม 3 เดือนมีน้ำหนัก 20-25 กรัม 4 เดือน 30-35 กรัม น้ำที่เหมาะสมกับการเลี้ยงกุ้งควรมีคุณรูป เช่น ค่าออกซิเจน 5-8 ppm, ความโปร่งใส 50-60 ซม., pH 6.5-9, ความเค็ม 15-25 ppt, อุณหภูมิ 18-20 °C ไฮโดรเจนซัลไฟท์ ไม่เกิน 1.3 ppm, แอมโมเนียไม่เกิน 1.6 ppm เป็นต้น (เกรียงศักดิ์, 2543)

กุ้งนั้นหากกินอาหารได้มากก็จะสามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วดังนั้นหากเพิ่มสารอาหารบางชนิดซึ่งมีคุณสมบัติดึงดูดให้กุ้งกินอาหารเร็วและมาก ก็จะทำให้กุ้งนั้นเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งมีรายงานสารอาหารนั้นได้แก่ กรดอะมิโน ไกลซีน ทูรีน กลูตาเมท และบีเทน

ซึ่งควรจะให้ในปริมาณพอเหมาะจึงจะดึงดูดกุ้งได้ดี และเปลือกกุ้ง ซึ่งจะช่วยให้อาหารกุ้งมีกลิ่นรสที่ดี และทำให้กุ้งโตเร็วและสีสวย และทำให้กุ้งที่ลอกคราบเปลือกแข็งเร็วขึ้นด้วย



รูปที่ 2 ลักษณะวงชีวิตกุ้งกุลาดำ (เกรียงศักดิ์, 2543)

กุ้งมีความต้องการคลอเลสเตอรอลสูงกว่าสัตว์น้ำชนิดอื่นเพื่อนำไปสร้างฮอร์โมนที่ช่วยในการลอกคราบ ซึ่งโภชนาการที่กุ้งกุลาดำต้องการมี โปรตีน กรดไขมัน ที่จำเป็น ลีซีติน คลอเลสเตอรอล เกลือแร่ วิตามิน คาร์โบไฮเดรต และสารสี สำหรับวิตามินนั้น Fisher et al. (1957) พบว่าวิตามินเอจำเป็นต่อการมองเห็นของกุ้งกุลาดำ ส่วนวิตามินซีช่วยป้องกันโรคตัวดำตายในกุ้ง และหากใส่วิตามินซี 1,000-2,000 มิลลิกรัมต่ออาหาร 100 กรัมทำให้กุ้งโตและลอกคราบดีด้วย รวมทั้งกุ้งกุลาดำยังต้องการวิตามินอีกมากมายหลายชนิด เช่น Na-Ascorbate, Inositol, Choline chloride วิตามินดี เป็นต้น (มะลิ, 2531)

2. รายละเอียดของโพรไบโอติก (Probiotic)

มีผู้ได้ให้ความหมายของโพรไบโอติกไว้มากมาย เช่น หมายถึงสารที่ผลิตขึ้นจากจุลินทรีย์และส่งเสริมให้สัตว์มีการเจริญเติบโตที่ดี (Lilly and Stillwell, 1965) หรือหมายถึงสิ่งมีชีวิตหรือสารใดก็ตามที่มีประโยชน์ต่อสัตว์โดยไม่มีผลกับจุลินทรีย์ที่พบปกติภายในลำไส้ (Parker, 1974) ต่อมาอีก 15 ปี Fuller (1989) ได้จำกัดความหมายจำเพาะลงไปว่าโพรไบโอติกเป็น จุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่เติมลงไปในอาหารแล้วไปปรับปรุงสมดุลของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ภายในลำไส้ของเจ้าบ้าน Havenaar และ Veid (1992) ได้ขยายคำจำกัดความของโพรไบโอติกว่าจะต้องประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่มีชีวิตซึ่งอาจมีเพียงชนิดเดียวหรือเป็นส่วนผสมของจุลินทรีย์หลายๆ ชนิดที่สามารถไปปรับปรุงคุณสมบัติของจุลินทรีย์ดั้งเดิมที่อาศัยอยู่ภายในลำไส้ของสัตว์นั้น โดยที่จุลินทร์เหล่านี้อาจอยู่ในรูปของเซลล์แห้งจากขบวนการระเหิดแห้ง (freeze-dried cells) หรืออยู่ในรูปผลิตภัณฑ์หมักซึ่งนอกจากไปส่งเสริมการเจริญเติบโตแล้วคนและสัตว์มีสุขภาพดีขึ้นด้วย และโพรไบโอติกไม่ใช่จำกัดการใช้เฉพาะในทางเดินอาหารเท่านั้น ยังอาจไปมีผลกระทบต่อระบบอื่นๆ เช่น ทางเดินหายใจส่วนต้นหรือระบบปัสสาวะและระบบสืบพันธุ์

ตามที่กล่าวมานี้คือความหมายของคำว่า โพรไบโอติก ที่ใช้ในคนและสัตว์บก แต่เนื่องจากสัตว์น้ำอาศัยอยู่ในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างจากสัตว์บกมาก จึงทำให้ความหมายของโพรไบโอติก ที่ใช้กับสัตว์น้ำแตกต่างออกไปบ้าง โดย Moriaty (1998) ได้ให้ความหมายของโพรไบโอติกไว้ว่า เป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่เติมลงในน้ำแล้วสามารถไปปรับสภาพของสิ่งแวดล้อมในบ่อให้ดีขึ้นด้วย แต่ Gatesoupe (1999) ได้เสนอว่าความหมายนี้ไม่ตรงกับที่มีผู้กล่าวไว้ก่อนหน้านี้จึงได้เสนอว่าโพรไบโอติกควรหมายถึง เซลล์ของจุลินทรีย์ที่เติมลงไปโดยวิธีใดๆแล้วสามารถเข้าไปอยู่ในลำไส้ของเจ้าบ้านและมีชีวิตอยู่ได้เพื่อพร้อมที่จะไปปรับปรุงสุขภาพของเจ้าบ้านนั้นให้ดีขึ้น

จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกนี้อาจเป็นแบคทีเรีย รา ยีสต์ ซึ่งคุณสมบัติและกลไกการออกฤทธิ์จะแตกต่างกัน จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ากลไกการออกฤทธิ์ของแบคทีเรียและยีสต์ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดแต่คาดว่าน่าจะเป็นดังนี้

2.1 กลไกการออกฤทธิ์ของแบคทีเรีย

1. เมื่อสัตว์กินจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกเข้าไปแบคทีเรียนั้นนั้นจะแพร่พันธุ์และก่อตัวที่ผิวทางเดินอาหาร เป็นผลให้จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคซึ่งสัตว์กินเข้าไปภายหลังเจริญเติบโต และเกาะที่ผนังลำไส้ยากมากขึ้น
2. Lactic acid bacteria จะสร้างกรดอินทรีย์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ซึ่งเป็นผลให้ค่า pH ในระบบทางเดินอาหารเปลี่ยนแปลงไปซึ่งผลดังกล่าว ไม่เหมาะกับการคงตัว หรือการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค

3. การสร้างเอนไซม์ แบคทีเรียบางชนิด เช่น Lactobacilli สร้างแล็คเทส (Lactase) และอะไมเลส (Amylase) ทำให้ร่างกายได้รับเอนไซม์เพิ่มขึ้นเป็นผลให้การย่อยอาหารดีขึ้นโดยมีการทำงานเป็นแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน (symbiosis) ของเอนไซม์ในทางเดินอาหาร และกระบวนการย่อยอาหาร
4. การสร้างวิตามิน บี เป็นที่ทราบกันว่าจุลินทรีย์ที่เป็นสารชีวนะบางชนิดสามารถสร้างวิตามินบีหลายชนิดในทางเดินอาหาร ทำให้การเจริญเติบโตของสัตว์ดีขึ้นเนื่องจากมีส่วนเกี่ยวข้องกับการสังเคราะกรดอะมิโน การสร้างโปรตีนและยังเกี่ยวข้องกับการทำงานของระบบประสาทส่วนกลาง ตรงส่วนนี้จึงอาจทำให้สัตว์มีการเจริญเติบโตที่ดีขึ้นเมื่อให้โพรไบโอติก
5. การสร้างยาปฏิชีวนะ ได้มีผู้พบการสร้างยาปฏิชีวนะหลายชนิดจากสายพันธุ์ที่แน่นอนของ Lactobacilli และ Streptococci นอกร่างกายสัตว์ดังนี้ Acidophilin, Lactocidin, Acidolin, Lactolin, Niasin และ diplococcin สารเหล่านี้ในร่างกายสัตว์ยังไม่ทราบแน่นอนว่ามีผลต่อร่างกายสัตว์อย่างไร แต่อาจทำให้สัตว์ลดการติดเชื้อลง
6. การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารโดยการให้จุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ และช่วยขจัดหรือควบคุมจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค
7. การแข่งขันเพื่อยับยั้งการออกฤทธิ์ โพรไบโอติกมักจะก่อตัวและแย่งจับกับผนังลำไส้ทางเดินอาหารได้ดีกว่าแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคทำให้จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคไม่สามารถเกาะหรือก่อตัวในทางเดินอาหาร หรือป้องกันการเกาะตัวโดยตรงต่อเซลล์ทางเดินอาหาร ยับยั้งการออกฤทธิ์ของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค ทำให้สัตว์มีสุขภาพดีไม่เจ็บป่วย
8. การป้องกันพิษของเอไมน์ (amine) และก๊าซแอมโมเนียเนื่องจากโปรตีนถูกเปลี่ยนเป็น เอไมน์และก๊าซแอมโมเนียโดยการเพิ่ม metabolic activity ของเชื้อที่อยู่ภายในลำไส้ โดยเอไมน์จะทำให้เกิดการระคายเคืองและเป็นพิษเพิ่มการบีบตัวของลำไส้ ทำให้ท้องเสีย
9. เป็นตัวเพิ่มภูมิคุ้มกันที่ไม่จำเพาะเจาะจงโดยโพรไบโอติกจะทำหน้าที่เหมือนตัวกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยกระตุ้นภูมิต้านทานบางชนิดในทางเดินอาหาร

2.2 กลไกการออกฤทธิ์ของยีสต์

1. ยีสต์มีสารปรุงแต่งรสธรรมชาติ (glutamic acid) ซึ่งทำให้อาหารสัตว์น่ากินขึ้น
2. ยีสต์มีวิตามินบีรวม และปัจจัยการเจริญเติบโตที่ไม่ทราบ ซึ่งทั้ง 2 อย่างนี้เป็นสิ่งที่มีประโยชน์ต่อจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารและการเมตาโบลิซึมของสัตว์
3. ยีสต์ดูดซึมโปรตีนจำนวนมากและขับกรดอะมิโนที่จำเป็นออกมามากเช่นกัน
4. ยีสต์ขับเอนไซม์ช่วยย่อย เช่น amylase, lipase, Protease และเอนไซม์อื่นๆ เป็นต้น

ลักษณะของโพรไบโอติกที่ดี

1. เป็นสายพันธุ์ที่ให้ประโยชน์ทำให้สัตว์มีการเจริญเติบโตมากขึ้นและเร็วขึ้น แข็งแรงขึ้น ทนต่อความเครียดมากขึ้น และมีความต้านทานต่อโรคสูงขึ้น
2. ไม่ทำให้เกิดโรคและไม่เป็นพิษ (non-pathogenic and non-toxic)
3. เป็นเซลล์ที่มีชีวิตและมีจำนวนมากพอควรที่จะเดินทางไปจนถึงทางเดินอาหารส่วนท้ายได้ และสามารถยึดเกาะผนังลำไส้ได้ดี หรืออยู่ในลำไส้ได้นาน
4. ทนต่อสภาพกรดในกระเพาะและน้ำดีในลำไส้ แต่สามารถย่อยสลายในลำไส้ได้ดี
5. มีความคงตัวและมีชีวิตอยู่ได้นานในสภาพเก็บรักษาและการใช้จริงในสภาพแวดล้อมจริง
6. มีความคงตัวและมีชีวิตอยู่ได้นานในการผสมอาหารสัตว์ เนื่องจากการผลิตอาหารสัตว์บางชนิดต้องผ่านกระบวนการความร้อน, แรงอัดเพื่อการอัดเม็ด และสภาพเป็นกรด
7. ไม่ตกค้างในซากสัตว์
8. ราคาไม่แพง
9. ไม่ถูกดูดซึมในระบบทางเดินอาหาร
10. ไม่เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมหรือจุลินทรีย์ที่คัดเลือกมาต้องไม่เปลี่ยนแปลงพันธุกรรมง่าย
11. ไม่ทำให้เกิดการแพ้
12. เป็นสายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตจำนวนมากในอุตสาหกรรมได้

หลักการทำงานของโพรไบโอติกที่ดี

1. ลดจำนวนจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคโดย
    - สร้างสาร Antibacterial substance
    - ขัดขวางเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค
    - สามารถจับกับผนังลำไส้ทำให้จุลินทรีย์ที่ก่อโรคไม่สามารถเกาะ และก่อตัวในทางเดินอาหาร
2. ช่วยระบบย่อยอาหาร โดยการสร้าง Lactic acid ทำให้กระเพาะมีสภาพเป็นกรดมากขึ้น การย่อยอาหารดีขึ้น สร้างน้ำย่อย เช่น Pectinase, Cellulase และลดพิษของ amine และแอมโมเนีย
3. กระตุ้นภูมิคุ้มกันโรค โดยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของ Immune Response มากขึ้น เช่น เพิ่ม Phagocytic activity , เพิ่ม hemocytes หรือเพิ่ม Antibacterial activity เป็นต้น

ประโยชน์และผลของการใช้โพรไบโอติก

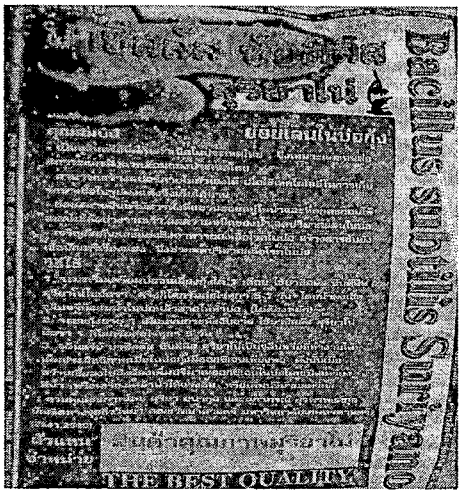
1. ด้านอาหารสัตว์ เร่งการเจริญเติบโตมีผลเหมือนการใช้ยาปฏิชีวนะ หรือสารเคมีสังเคราะห์ คือ ให้การเจริญเติบโตมากขึ้น แต่ว่าไม่ตกค้างในเนื้อสัตว์ หรือเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม เหมือนกับยาปฏิชีวนะ
2. ด้านสุขภาพ
   - ลดอัตราการป่วย และตายของสัตว์
   - ลดอัตราการท้องผูกของสัตว์
   - มีปฏิกิริยาในการยับยั้งการลดหรือเกิดการยับยั้งเนื้องอกโดยไปยับยั้งการสร้างเซลล์เนื้องอก หรือไปควบคุมการสร้างย่อยที่ใช้ในการหลั่งสารคาร์ซิโนเจน หรือไปทำลายสารคาร์ซิโนเจน เช่น สารไนโตรซามีน
   - มีผลการยับยั้งการสร้างคลอเลสโตรรอล
3. ด้านสิ่งแวดล้อม
   - จุลินทรีย์พวกนี้หมดสภาพในสิ่งขับถ่ายจึงไม่ตกค้างในน้ำ มูลสัตว์ หรือบ่อน้ำ
   - ไม่เป็นอันตรายต่อคน,สัตว์ และพืชทั่วไป

ปัญหาของโพรไบโอติก

ในความเป็นจริงเราไม่สามารถที่จะหาโพรไบโอติกที่มีคุณสมบัติเพียบพร้อมได้อย่างในอุดมคติทั้งนี้เนื่องจากคุณสมบัติเฉพาะตัว โพรไบโอติกบางชนิดไม่สามารถทนต่อความร้อนได้ โดยเฉพาะความร้อนที่เกิดจากการอัดเม็ดได้ แต่อย่างไรก็ตามความก้าวหน้าในทางวิชาการทำให้สามารถที่จะเพิ่มขีดจำกัดต่างๆ เหล่านี้ได้ เช่น การเคลือบเพื่อให้โพรไบโอติกสามารถเข้าไปอยู่ในลำไส้ได้ ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มันจะทำงานได้ดีที่สุด

ผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกที่ใช้ในปัจจุบัน (สุบัณฑิตและวีรพงศ์, 2548)

1. บาซิลลัส ซับติลิส สุริยาโน่



จุลินทรีย์ คือ *Bacillus subtilis* Suriyano
ขนาด 1,000 กรัม
ราคา 120 บาท

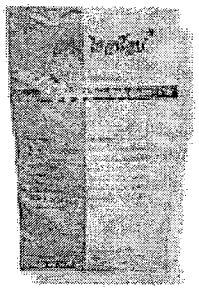
คุณสมบัติ

1. เป็นจุลินทรีย์ที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศไทย จึงเหมาะและทนต่อสภาวะและสิ่งแวดล้อมของประเทศไทย
2. สามารถสร้างสปอร์ภายในตัวเองได้ เมื่อใช้เทคโนโลยีในการเก็บรักษาเชื้อในรูปผงแห้งจึงเก็บได้นาน
3. ย่อยสลายสารอินทรีย์ทั้งที่แขวนลอยอยู่ในน้ำและที่ตกตะกอนให้หมดไปได้อย่างรวดเร็ว ลดความหนืดของน้ำ ลดปริมาณเลนในบ่อ
4. เจริญกีดกันและแย่งชิงอาหารของเชื้อก่อโรคในบ่อ สร้างสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเรืองแสง จึงช่วยลดปริมาณเชื้อก่อโรคในบ่อ

วิธีใช้

1. ระยะเริ่มเตรียมบ่อจนเลี้ยงกุ้งได้ 1 เดือน ใช้ในอัตราครึ่งกิโลกรัมต่อไร่ทุกๆ 5 – 7 วัน โดยนำผงจุลินทรีย์ผสมน้ำในบ่อแล้วสาดให้ทั่ว (ไม่ต้องหมัก)
2. ระยะกุ้งอายุ 1 เดือนจนกระทั่งจับขาย ใช้อัตรา 1 กิโลกรัมต่อไร่ทุกๆ 5 วัน
3. เมื่อหว่านเชื้อลงไปต้องเพิ่มปริมาณออกซิเจนในบ่อโดยเปิดเครื่องออกซิเจน

2. กรีน ไคลน็อป (Green Klinop)



ผู้ผลิต บริษัทออลเวท จำกัด

คุณสมบัติ

1. ช่วยลดปริมาณแก๊สพิษ เช่น แอมโมเนีย ไฮโดรเจนซัลไฟด์อย่างรวดเร็ว
2. ช่วยเพิ่มปริมาณออกซิเจน และแร่ธาตุที่เป็นประโยชน์
3. ช่วยสร้างสีน้ำ เพิ่มปริมาณแพลงค์ตอน
4. ช่วยจับโลหะหนักและสนิมเหล็กที่บริเวณพื้นบ่อ

3. กลู – เค็นเนี่ยม (Glue - Kenium)

ผู้ผลิต บริษัทออลเวท จำกัด

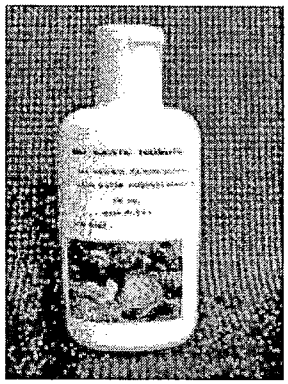
จุลินทรีย์ คือ ยีสต์

ราคา 500 บาท

คุณสมบัติ

1. ช่วยเสริมความแข็งแรง กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันและการกินอาหาร
2. ควบคุมปริมาณเชื้อก่อโรค

4. บลู มารีน (Blue Marine)

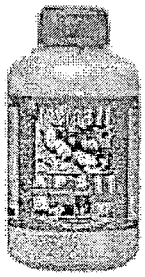


ผลิตในประเทศสหรัฐอเมริกา
ขนาด 120 ซี ซี
ราคา 350 บาท

คุณสมบัติ

ช่วยกำจัดแอมโมเนีย ไนเทรตที่เป็นอันตรายต่อกุ้ง และย่อยสลายของเสียได้เป็นอย่างดี

5. เอ พี เอส 11 (APS 11)



ผู้ผลิต บริษัทออลเวท จำกัด
จุลินทรีย์ คือ *Bacillus* BS11
ราคา 600 บาท

คุณสมบัติ

1. เจริญเติบโตในลำไส้ได้ทันที เสริมการย่อยและดูดซึมภายในลำไส้
2. ป้องกันและลดปัญหาการติดเชื้อลำไส้อักเสบ
3. ช่วยย่อยสลายสารอินทรีย์บริเวณขี้เลน

3. รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาการใช้โพรไบโอติก

วรรณิภา (2539) แยก *Bacillus* S11 (*Bacillus mycoides*) ซึ่งมีคุณสมบัติสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบสายพันธุ์ที่ก่อโรคในคนและในกุ้ง ได้จากทางเดินอาหารกุ้งกุลาดำแล้วนำมาผสมในอาหารกุ้งกุลาดำและมาเพาะเลี้ยงในระบบน้ำหมุนเวียนแบบปิด เป็นเวลา 100 วัน พบว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสม *Bacillus* S11 จะมีการเจริญเติบโตและมีอัตราการรอดชีวิตมากกว่ากุ้งกุลาดำที่ไม่ได้รับอาหารผสม *Bacillus* S11 อย่างมีนัยสำคัญ และสามารถต้านทานการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคจาก *Vibrio harveyi* ได้ โดยกลุ่มที่ได้รับ *Bacillus* S11 มีอัตราการรอดร้อยละ 100 กลุ่มที่ไม่ได้รับอาหารผสม *Bacillus* S11 มีอัตราการรอดร้อยละ 26 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ขจีนาฏและคณะ (2540) ศึกษาการแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส และ ไลเปส จากตัวอย่างดินที่ต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส พบว่าแบคทีเรียที่จำแนกได้นั้นอยู่ในจีนัส *Bacillus* ทั้งหมด

Maeda และ Liao (1992) ศึกษาการใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ PM ที่แยกได้จากดิน โดยใส่ไปในถัง diatom และ rotifers เพื่อใช้เลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) พบว่ากุ้งกุลาดำ มีชีวิตอยู่รอดหลังจาก 13 วันถึง 57% ในขณะที่กลุ่มที่ไม่ได้ใช้จะมีชีวิตอยู่รอดแค่เพียง 5 วัน

Austin et al. (1995) ศึกษาผลของโพรไบโอติกแบคทีเรียพบว่าเชื้อก่อโรค *Vibrio ordalii* สูญเสียความสามารถในการก่อโรคภายใน 3 ชั่วโมง หลังใช้ freeze dried supernatant ของโพรไบโอติกในอาหาร

Rengpipat และ Rukpratanporn (1998) ศึกษาการใช้ *Bacillus* strain S11 ในกุ้งกุลาดำ โดยใช้ร่วมกับ Artimia พบว่าระยะเวลาในการพัฒนาการสั้นลงและอัตราการตายน้อยกว่ากุ้งที่ไม่ให้ *Bacillus* และทดสอบต่อต้านการก่อโรคของ *Vibrio harveyi* strain D331 พบว่ากลุ่มที่ใช้ *Bacillus* strain S11 รอดตาย 100% ในขณะที่กลุ่มไม่ได้ให้แบคทีเรียรอดตายเพียง 26%

Gibson et al. (1998) ศึกษาความสามารถของ BLIS (bacteriocin-like inhibitory substance) ที่ผลิตจาก *Aeromonas media* strain A199 ที่ใช้เป็นโพรไบโอติกในสัตว์ คือ *Crassostrea gigas* ทดสอบโดยใช้ หรือ ไม่ใช้ strain A199 เพื่อป้องกันการตายของตัวอ่อนหอยนางรมเมื่อถูกโจมตีด้วย *Vibrio tubiashii* ตัวอ่อนที่ถูกโจมตีด้วย *Vibrio* ตายภายใน 5 วัน การให้ A199 จะยับยั้งเชื้อก่อโรคของปลาและหอยซึ่งทำในหลอดทดลอง

Moriarty (1998) ได้ใช้ *Bacillus* สายพันธุ์ที่คัดเลือกมา เป็นโพรไบโอติกในควบคุม *Vibrio* ที่ฟาร์มกุ้งที่อินโดนีเซีย พบว่าในฟาร์มที่ไม่ได้ใช้ โพรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้ง กุ้งจะตายหมดก่อน 80 วัน ด้วย *Vibrio* เรืองแสง ส่วนในฟาร์มที่ใช้โพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงกุ้ง กุ้งจะอยู่ได้

มากกว่า 160 วัน โดยไม่มีปัญหา ซึ่งใช้ *Bacillus* ประมาณ 10^4-10^5/ml เป็นไปได้ว่า *Bacillus* จะเหนี่ยวนำให้ *Vibrio* ในบ่อลดลง

Gatesoupe (1999) ได้รวบรวมผลงานการวิจัยการใช้โพรไบโอติกสำหรับสัตว์น้ำได้ว่า โพรไบโอติกหมายถึงการควบคุมทางชีวภาพ เมื่อใช้ในการต่อต้านเชื้อก่อโรค หรือเป็นการฟื้นฟูทางชีวภาพเมื่อใช้ในการปรับปรุงคุณภาพน้ำ ซึ่งโพรไบโอติกส่วนใหญ่จะแยกมาจากสิ่งแวดล้อมในน้ำ จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโพรไบโอติกได้แก่ Vibrionaceae, Pseudomonads, lactic acid bacteria, *Bacillus* spp. และยีสต์ ซึ่งลักษณะหลักที่ใช้ในการหาจุลินทรีย์ที่ช่วยในการปรับปรุงคุณภาพของสุขภาพเจ้าบ้านของผู้ให้อาศัย คือ 1.) ต่อต้านเชื้อก่อโรคซึ่งแสดงได้ในการทดลอง. 2.) มีศักยภาพในการยึดพื้นที่ภายในลำไส้กุ้ง 3.) ทดสอบการเหนี่ยวนำ ทำให้เพิ่มความสามารถในการต้านทานโรค หรืออาจจะดูลักษณะอื่นๆอีก คือ การแข่งขันกับเชื้อก่อโรคทั้งในด้านสารอาหารและตำแหน่งยึดเกาะภายในลำไส้กุ้ง, กระตุ้นภูมิคุ้มกันโรค เป็นต้น ตัวอย่างโพรไบโอติกที่ใช้ในสัตว์น้ำได้แก่ *Thalassobacter utilis* ใช้ควบคุมเชื้อก่อโรค *Vibrio angvillarum* และ *Haliphthoros* sp., *V. alginolyticus* ใช้ควบคุม *V. harveyi* , *Bacillus* sp.ใช้ควบคุม *V. harveyi* เป็นต้น

Gomez-Gil et al. (2000) ศึกษาการใช้โพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงไม่ปรากฏชื่อผู้แต่ง มีการทดสอบกลุ่มแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติก ในการเพาะเลี้ยงกุ้ง ปู หอยนางรม และปลา ซึ่งได้แก่ *Vibrio, Pseudomonas, Bacillus* และ Lactobacilli แล้วทดลองหาค่าวิกฤต โดยส่วนใหญ่จะทำการทดลองในตัวอ่อนของปลา พบว่าการตายลดลง

De Schrijver และ Ollevier (2000) ศึกษาการย่อยโปรตีนของ juvenile turbot ระหว่างการเคลื่อนที่จากท้องถึงทวาร อาหารเสริมกับศักยภาพโพรไบโอติกแบคทีเรียสกุล *Vibrio proteolyticus* ถูกประเมินค่าด้วยการย่อยโปรตีนช่วง 3 สัปดาห์ ปลาที่มีน้ำหนัก 25-30 กิโลกรัม ได้รับอาหารผ่านทางปาก ได้รับของเหลวที่ไม่บริสุทธิ์ 40% และ60% ของน้ำหรือของเหลวนี้มี 10^{10} ml ของ *V. proteolyticus* กระบวนการย่อยจากท้องถึง foregut, hindgut และ rectum พบการย่อยสลายไนโตรเจน ถูกติดตามโดยปริมาณแอมโมเนียที่สูงขึ้นซึ่งเกี่ยวข้องกับจุลินทรีย์ในบริเวณดังกล่าวในการย่อยโปรตีนในท่อส่วนปลายของระบบทางเดินอาหาร ปริมาณไนโตรเจนที่ละลายน้ำมีนัยสำคัญที่สูงใน foregut ดังนั้น สรุปได้ว่าการให้ *Vibrio proteolyticus* ผสมร่วมกับอาหารจะช่วยในการย่อยไนโตรเจน

Gram และ คณะ (2001) ศึกษา *Pseudomonas fluorescens* strain AH2 ที่เป็นโพรไบโอติกใน rainbow trout ซึ่งลดการตายที่เกิดโรคจาก *A. salmonicida* โดยที่ *Pseudomonas fluorescens* strain AH2 ยับยั้งการเจริญของ *A. salmonicida* ในอาหารที่มี glucose-casamino acid ทั้งในวิธี agar-well-diffusion และในอาหารเหลว การยับยั้งจะมีความสำคัญมากยิ่งขึ้นในสภาพที่มีเหล็กจำกัดเปรียบเทียบกับสภาพที่มีเหล็ก 0.1 mM กิจกรรมของโพรไบโอติก strain AH 2 ที่ต้านทานต่อโรค furunculosis ในปลาซัลมอล (Salmo salar L.) ดังนั้นจากการทดลองนี้ปริมาณของเหล็กน่าจะมีผล

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

ต่อการเจริญของโพรไบโอติก *Pseudomonas fluorescens* strain AH2 ว่ามีผลยับยั้งการเจริญของ *A. salmonicida*

Meunpol et al. (2002) ได้ทดลองผลของโอโซน และโพรไบโอติกต่ออัตราการรอดชีวิตของกุ้งกุลาดำ พบว่าถ้าใช้ residual ozone concentration (ROC) 0.38 gO_3/l จากการให้โอโซน 5 นาที จะยับยั้ง *Vibrio harveyi* D331 ได้ 3 log unit ในเวลา 6 ชั่วโมง และยับยั้ง *Bacillus* S11 2 log unit ในเวลา 9 ชั่วโมง และในกุ้งระยะ postlarvae ถ้าใช้ 0.35-0.50 mg O_3/l จากการให้โอโซน 8 ชั่วโมง จะทำให้เกิดความผิดปกติกับกุ้ง คือ เกิดการทำลายโครงสร้างของ gill lamellar epithelium ของกุ้ง ในการทดลองของ juvenile กุ้งกุลาดำที่ให้ probiotic 1 เดือนโดยให้ โอโซน 0.35 mg/l ROC เป็นเวลา 30 นาที จะยับยั้ง *Vibrio harveyi* D331 ได้ 3 log unit ใน 1 วัน ปริมาณของ ROC นี้จะไม่มีผลกับกุ้งหรือโพรไบโอติกในลำไส้กุ้ง อัตราการรอดชีวิตของกุ้งกุลาดำจากการให้โพรไบโอติกและการให้โอโซนจะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งกุลาดำกลุ่มที่ไม่ให้โอโซนและโพรไบโอติก

Chythanya et al. (2002) ศึกษาแบคทีเรียทางทะเลสายพันธุ์ *Pseudomonas* I-2 ว่าผลิตสารยับยั้งเชื้อก่อโรคของ Vibrios ประกอบด้วย *Vibrio harveyi, V. fluvialis, V. parahaemolyticus, V. damsela* และ *V. vulnificus* ในกุ้ง สารยับยั้งเชื้อก่อโรคนี้มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ทนความร้อน ละลายในคลอโรฟอร์ม และ ต้านทานเอนไซม์โปรติโอไลติก โคลีฟอร์มสกัดทำให้ *Vibrio harveyi* ในน้ำลดลงเมื่อใช้ที่ 20 μg/ml ขณะที่สารสกัดนี้จะไม่มีผลกับตัวอ่อนของกุ้งที่ระดับ 50 μg/ml *Pseudomonas* I-2 เป็นการประยุกต์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมการก่อโรคของ Vibrios ในระบบการเพาะเลี้ยง

Gomez-Gil et al. (2002) ศึกษาความสามารถในการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของโพรไบโอติก *Vibrio alginolyticus* strain C7b เมื่อเจริญควบคู่ไปกับสาหร่ายขนาดเล็กคือ *Chaetoceros muelleri* หรือเมื่อเจริญโดยไม่มีสาหร่ายขนาดเล็กพบว่าแบคทีเรียสามารถเจริญได้ดีเมื่อเลี้ยงสาหร่ายร่วมด้วยและความหนาแน่นของสาหร่ายขนาดเล็กนี้ไม่มีผลกับการเจริญของแบคทีเรีย ดังนั้น จากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าอาจจะนำเอาโพรไบโอติก *Vibrio alginolyticus* strain C7b มาเพาะเลี้ยงร่วมกับสาหร่ายขนาดเล็กก่อนที่จะนำไปให้อาหารกุ้ง

Robichaud และ John (2003) ศึกษาการย่อยคาร์โบไฮเดรตโดยเอนไซม์อะไมเลสโดยคัดเลือกจากดิน พบว่าสามารถเจริญบน Starch agar โดยที่แบคทีเรียที่ย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตได้ดีที่สุดคือ สกุล *Bacillus*

639.68
ร328ก
ฉ.3
251545

บทที่ 3
วัสดุและอุปกรณ์

วัสดุอุปกรณ์

1. ตัวอย่างผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกที่นำมาศึกษา จำนวน 6 ตัวอย่างได้แก่ A, B, C, D, E, F ซึ่งวางจำหน่ายในประเทศไทยและต่างประเทศ
2. ตัวอย่างกุ้งกุลาดำจากตลาดในเมืองชลบุรี
3. สารเคมี
    - 3.1 Crystal violet
    - 3.2 Gram's iodine
    - 3.3 95% Ethanol
    - 3.4 Safranin O
    - 3.5 Malachite green
    - 3.6 Iodine solution for starch hydrolysis test
    - 3.7 3% Hydrogen peroxide solution
    - 3.8 Kovac's reagent
    - 3.9 Zinc dust
    - 3.10 Sulfanilic acid
    - 3.11 ∝-naphthylamind
4. วัสดุอุปกรณ์
    - 4.1 จานเพาะเชื้อ
    - 4.2 Vortex mixture
    - 4.3 UV-Visible Spectrophotometer
5. อาหารเลี้ยงเชื้อ
    - 5.1 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์
        - 5.1.1 0.85% NaCl
        - 5.1.2 Plate count agar
        - 5.1.3 Thiosulphate Citrate Bile Salt Sucrose Agar (TCBS)
        - 5.1.4 Lactobacillus MRS Agar (MRS)
    - 5.2 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับศึกษากิจกรรมการย่อยสลายสารอินทรีย์แต่ละชนิด
        - 5.2.1 Skim milk agar
        - 5.2.2 Tributyrin agar

5.2.3 Starch agar

5.3 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบ คุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ

5.3.1 Nutrient agar (NA)

5.3.2 Nutrient broth (NB)

5.3.3 Nutrient broth pH 6.8

5.3.4 Motility test

5.3.5 Nitrate test

5.3.6 Indole test

5.3.7 Oxidation-Fermentation test

5.3.8 Citrate Utilization test

5.3.9 Starch Hydrolysis test

5.3.10 Casein Hydrolysis test

5.3.11 VP test

5.3.12 Coagulase test

5.3.13 L-Arabinose

6. เชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในกุ้งกุลาดำ

Vibrio harveyi จากสถาบันวิจัยโรคสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

บทที่ 4
วิธีการทดลอง

I. การแยกจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติโพรไบโอติกจากกุ้งกุลาดำ

1. การแยกจุลินทรีย์โดยใช้คุณสมบัติการย่อยสลายโปรตีน คาร์โบไฮเดรตและไขมัน

1.1 ชำแหละกุ้งเลือกเอาส่วนลำไส้กุ้งมาจำนวน 1 กรัม ใส่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% 10 มิลลิลิตร แล้ว enrich ด้วย Tryptic soy broth (TSB) โดยดูดละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% ที่ใส่เชื้อไป 1 มิลลิลิตรใส่ลงใน Tryptic soy agar (TSA) 100 มิลลิลิตร และทำการเจือจางให้ได้ 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

1.2 กระจาย (spread) ตัวอย่างจากข้อ 1.1 โดยเลือกกำลัง 10^3,10^4,10^5, ลงบนอาหาร Skim milk agar, Starch agar, Tributyrin agar ซึ่งจะนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30° ดังนี้

Skim milk agar บ่มนาน 2-3 วัน

Tributyrin agar บ่มนาน 2-3 วัน

Starch agar บ่มนาน 3 วัน แล้วราดไอโอดีนให้ท่วมลงไปทดสอบ

1.3 เลือกโคโลนีที่เกิดวงใสจาก Skim milk agar, Starch agar, Tributyrin agar

1.4 คำนวณหาประสิทธิภาพการย่อยสลายโดยคำนวณจากขนาดเคลียร์โซนหารด้วยขนาดโคโลนี

2. การทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรค *V. harveyi*

2.1 นำเชื้อก่อโรค *V. harveyi* ที่เจริญในอาหาร Alkaline peptone water (APW) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ไปวัด OD ที่ 600 nm แล้วนำไปปรับให้ได้ OD 0.01 แล้วดูด 0.1 มิลลิลิตรและนำไป spread ลงบน Nutrient agar (NA) ด้วยแท่งแก้วสเปรดเพลท แล้วทิ้งไว้ 15 นาทีเพื่อรอให้เพลทแห้ง

2.2 นำเชื้อที่แยกบริสุทธิ์ที่แยกได้จากข้อ 1 ซึ่งบ่มใน Nutrient broth (NB) 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องแล้ว นำไปปรับเชื้อที่ OD ที่ 600 nm ให้ได้ประมาณ 1.0 แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็ว 5000 rpm อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนที่ใส 100 µl ไปทดสอบการยับยั้งโดยหยดลงไปในกระดาษกรองแล้วนำไปวางลงบนอาหาร NA ที่ spread เชื้อก่อโรคไว้แล้วในข้อ 2.1 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C 24-48 ชั่วโมง (ดัดแปลงมาจาก วลัยพร, 2544)

2.3 ดูผลการยับยั้งการเกิดบริเวณใสรอบโคโลนีของเชื้อที่ใช้ทดสอบแล้ววัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสที่เกิดขึ้น

3. ทดสอบความสามารถในการก่อโรคของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากลำไส้กุ้ง

3.1 นำเชื้อที่แยกบริสุทธิ์แล้วมาขีดลงบน blood agar

3.2 บ่มที่ 30-37 ^{o}C เป็นเวลา 2-3 วัน

3.3 คัดเลือกเชื้อที่ไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดรอบโคโลนีไปศึกษาต่อไป

4. ศึกษาคุณสมบัติการทนต่อสิ่งแวดล้อม

4.1 ทดสอบการทนที่ความเข้มข้นเกลือต่างๆ

4.1.1 เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้จากขั้นตอนที่ 3 ใส่ลงไปใน NB บ่ม 1 วัน แล้วนำไปวัด OD แล้วปรับให้เป็น 1

4.1.2 ดูดเชื้อที่ปรับแล้ว 1 มิลลิลิตรใส่ลงใน NB ซึ่งปรับให้มีความเข้มเข้นเกลือ 0, 2, 4, 6, 8,10% โซเดียมคลอไรด์ แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 วัน

4.1.3 วัดค่า OD ของเชื้อที่เลี้ยงในสภาวะต่างๆด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 nmโดยใช้อาหาร NB ที่ไม่ได้ใส่เชื้อเป็นแบลงค์

4.2 ทดสอบการทนที่ pH ต่างๆ

4.2.1 เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้จากขั้นตอนที่ 3 ใส่ลงไปใน NB บ่ม 1 วัน แล้วนำไปวัด OD แล้วปรับให้เป็น 1

4.2.2 ดูดเชื้อที่ปรับแล้ว 1 มิลลิลิตรใส่ลงใน NB ซึ่งปรับให้มี pH 2, 4, 6, 7, 8, 10แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 วัน

4.2.3 วัดค่า OD ของเชื้อที่เลี้ยงในสภาวะต่างๆด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 nm โดยใช้อาหาร NB ที่ไม่ได้ใส่เชื้อเป็นแบลงค์

4.3 ทดสอบการทนที่อุณหภูมิต่างๆ

4.3.1 4.3.1เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้จากขั้นตอนที่ 3 ใส่ลงไปใน NB บ่ม 1 วัน แล้วนำไปวัด OD แล้วปรับให้เป็น 1

4.3.2 ดูดเชื้อที่ปรับแล้ว 1 มิลลิลิตรใส่ลงใน NB แล้วบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ ดังนี้ 10, 25, 37, 55 องศาเซลเซียส 1 วัน

4.3.3 วัดค่า OD ของเชื้อที่เลี้ยงในสภาวะต่างๆ ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 nm โดยใช้อาหาร NB ที่ไม่ได้ใส่เชื้อเป็นแบลงค์

II. การแยกจุลินทรีย์จากผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก

5. การนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียผสมจากผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกด้วยวิธี total plate count agar (จำนง, 2522)

5.1 นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกจำนวน 6 ตัวอย่างซึ่งกำหนดเรียกผลิตภัณฑ์ชนิด A, B, C, D, E และ F มาแยกชนิดแบคทีเรียจากผลิตภัณฑ์ดังกล่าว โดยนำตัวอย่างมา 1 กรัม ใส่ใน 0.85% NaCl 9 มิลลิลิตร (10 fold dilution method) ซึ่งจะได้ระดับความเจือจาง 10^{-1} ทำการเจือจางต่อไปเป็นลำดับครั้งละ 10 เท่า จนได้ความเจือจาง 10^{-5}

5.2 ปิเปตตัวอย่างจากแต่ละระดับความเจือจาง 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหาร plate count agar เพื่อทำการหาค่า CFU/g

5.3 กระจาย (spread) ตัวอย่างทั้งหมด (10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}) บนจานอาหารโดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

5.4 ปิเปตตัวอย่างจากระดับความเจือจาง 10^{-1} มา 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหาร MRS agar เพื่อคัดแยกเชื้อกลุ่ม Lactic acid bacteria ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ทำการเลี้ยงเชื้อสภาวะ anaerobe โดยนำไปใส่กล่องพลาสติกแล้วใช้ก๊าซไนโตรเจนไล่ออกซิเจนออกไปเป็นเวลา 20 นาที

5.5 นำจานเพาะเชื้อทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5.6 นับจำนวนโคโลนีบน plate count agar คำนวณหาแบคทีเรียทั้งหมดต่อตัวอย่าง 1 กรัม

6. การศึกษากิจกรรมของผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกในการย่อยสลายสารอาหารประเภทโปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต (กัญจนา, 2542)

6.1 นำผลิตภัณฑ์ตัวอย่างที่ทราบจำนวนจากข้อ 5 มาทำเป็นสารละลายที่ปรับให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากันด้วย 0.85% NaCl แล้ว pipet สารละลายของทุกผลิตภัณฑ์มา 20 ไมโครลิตร จุดลงบนอาหารแต่ละชนิดที่เหมาะสมคือ Skim milk agar, Tributryrin agar และ Starch agar ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

6.2 นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ดังนี้

Skim milk บ่มนาน 2-3 วัน

Tributyrin agar บ่มนาน 2-3 วัน

Starch agar บ่มนาน 3 วัน แล้วราดไอโอดีนให้ท่วมลงไปทดสอบ

6.3 ตรวจดูการย่อยสลายโดยโพรไบโอติกที่ย่อยสลายโปรตีนและไขมันบนจานเพาะ

เชื้อ Skim milk agar และ Tributyrin agar ตามลำดับจะเกิดบริเวณใสรอบโคโลนี สำหรับโพรไบโอติกที่ย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต บนจานเพาะเชื้อ Starch agar เมื่อทดสอบด้วยสารละลายไอโอดีน จะเกิดวงใสเช่นเดียวกัน

6.4 คำนวณหาอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสรอบโคโลนี ต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี เปรียบเทียบอัตราส่วนที่ได้ ถ้าเชื้อใดให้อัตราส่วนนี้มีค่ามาก แสดงว่าย่อยสลายได้ดี

7. การศึกษาความสามารถของผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกในการต่อต้านเชื้อก่อโรคในกุ้งกุลาดำ

7.1 นำเชื้อก่อโรคในกุ้ง ได้แก่ *Vibrio harveyi* ทำการ enrich ด้วย APW บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง

7.2 นำเชื้อ *Vibrio harveyi* มาวัดปรับความเข้มข้นของเชื้อที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้มีค่า OD เท่ากับ 0.01

7.3 ปิเปตเชื้อจาก *Vibrio harveyi* ที่ปรับความเข้มข้นแล้วจากข้อ 7.2 ลงในอาหาร NA

7.4 กระจาย (spread) บน NA โดยใช้แท่งแก้ว

7.5 นำผลิตภัณฑ์ตัวอย่างมาทำเป็นสารละลายที่ปรับให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากัน แบ่งออกเป็น 2 ชุดการทดลอง โดย

7.5.1 pipet ผลิตภัณฑ์ตัวอย่างมา 20 ไมโครลิตร จุดลงจานเพาะเชื้อ

7.5.2 นำตัวอย่างมา centrifuge ที่ 8000 rpm นาน 10 นาที แล้วกรองผ่านหัวกรอง 0.45 ไมโครเมตร ปิเปตส่วนใสมา 20 ไมโครลิตร จุดลงจานเพาะเชื้อ

7.6 บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยทำการทดลองชุดละ 3 ซ้ำ

7.7 คำนวณหาอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสรอบโคโลนี ต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี เปรียบเทียบอัตราส่วนที่ได้ ถ้าเชื้อให้อัตราส่วนนี้มีค่ามาก แสดงว่ามีสามารถในการต่อต้านเชื้อก่อโรคในกุ้งได้ดี

7.8 จำแนกชนิดโพรไบโอติกโดยอาศัยหลักการจำแนกของ Bergey's manual of systematic Bacteriology และใช้ API kit

7.9 เปรียบเทียบความสามารถในการย่อยสารอาหารและความสามารถในการต่อต้านเชื้อ *Vibrio harveyi*

บทที่ 5

ผลการทดลอง

1. การแยกและทดสอบคุณสมบัติของแบคทีเรียจากลำไส้กุ้งกุลาดำ

ในการแยกและคัดเลือกแบคทีเรียจากลำไส้กุ้งเพื่อนำมาใช้เป็นโพรไบโอติกนั้น ในขั้นตอนแรกสุดจากการเลี้ยงในอาหาร NA ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชม. ได้แบคทีเรียทั้งหมด 14 สายพันธุ์ ซึ่งต่อมาจะให้รหัสเชื้อคือ ซึ่ง S, T โดยที่ S คือ เชื้อที่แยกมาจากเชื้อที่เกิดวงใสบน skim milk agar และรหัส T คือ เชื้อที่แยกมาจากเชื้อที่เกิดวงใสบนอาหาร tributyrin agar ซึ่งสามารถแสดงลักษณะทั่วไปของเชื้อได้ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 คุณสมบัติทั่วไปของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกมาจากลำไส้กุ้งกุลาดำ

รหัสเชื้อ	ลักษณะเชื้อบนอาหาร NA	ขนาดโคโลนี (มม.) 24 ชม.	แกรม	รูปร่าง
S1	โคโลนีสีครีม ด้าน แผ่	12	บวก	ท่อน
S2	โคโลนีสีครีม มัน	5	บวก	กลม
S1	โคโลนีสีครีม แผ่	23	บวก	ท่อน
S4	โคโลนีสีครีม มัน เข้มตรงกลาง	4	บวก	ท่อน
S4	โคโลนีสีครีม	4	ลบ	ท่อน
S6	โคโลนีสีครีม มัน แผ่	23	ลบ	ท่อน
S1	โคโลนีสีครีม มัน	4	ลบ	ท่อน
S8	โคโลนีสีครีม มัน	2	ลบ	ท่อน
T0	โคโลนีสีครีม มัน	5	ลบ	กลม
T1	โคโลนีสีเหลือง มัน	2	ลบ	ท่อน
T2	โคโลนีสีครีม มัน	4	บวก	กลม
T3	โคโลนีสีส้ม มัน	3	บวก	ท่อน
T3	โคโลนีสีขาว ด้าน	10	บวก	กลม
T5	โคโลนีสีครีม มัน	2	บวก	ท่อน

1.1 คุณสมบัติการย่อยสลายโปรตีน ไขมันและคาร์โบไฮเดรต

จากการนำแบคทีเรียที่แยกได้จากลำไส้กุ้งกุลาดำแต่ละชนิดมาทดสอบความสามารถในการย่อยสลายโปรตีน ไขมันและคาร์โบไฮเดรต โดยนำมาทดสอบบนอาหาร Skim milk agar tributyrin agar และ starch agar ตามลำดับ ถ้าแบคทีเรียสามารถย่อยสลายสารอาหารได้ จะเกิดวงใสรอบโคโลนี (รูปที่ 3) ส่วนประสิทธิภาพของการย่อยสลายคำนวณได้จากอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส ต่อเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี ซึ่งถ้ามีค่ามากแสดงว่าย่อยสลายได้ดี

จากการทดลองพบว่าแบคทีเรียชนิด S1-S8, T2, T4 และ T5 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายโปรตีนบนอาหาร skim milk agar ตั้งแต่ช่วง 1.5-3.81 โดยแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสูงสุด ได้แก่ S1, S2, S3 และ S7 ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ประสิทธิภาพในการย่อยโปรตีนด้วยขนาดโคโลนีและเคลียร์โซนที่เกิดขึ้นบนอาหาร skim milk agar

รหัสเชื้อ	ขนาดโคโลนี โดยเฉลี่ย (มม.)	ขนาดเคลียร์โซน โดยเฉลี่ย (มม.)	ประสิทธิภาพ การย่อยสลาย
S1	3.7	11.3	3.05
S2	1.0	3.7	3.70
S3	3.7	3.0	3.05
S4	2.3	3.7	1.61
S2	1.0	3.0	1.5
S4	2.3	3.7	3.70
S7	2.3	8.0	2.96
S8	1.7	2.7	1.59
T0	3.3	0.0	-
T0	1.0	0.0	-
T2	3.7	7.7	2.33
T3	3.3	0	-
T0	1.0	5.0	1.67
T5	3.7	7.3	1.97

หมายเหตุ – คือเชื้อไม่เจริญ และไม่สามารถคำนวณหาประสิทธิภาพในการย่อยสลายได้

และจากการทดสอบการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตบนอาหาร starch agar พบว่าเชื้อ S1, S3, S6, S7, T3, T4 และ T5 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตบน starch agar อยู่ในช่วง 1.0-2.0 ซึ่งเชื้อที่มีค่าประสิทธิภาพการย่อยสลายสูงสุด คือ S7 ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ประสิทธิภาพในการย่อยคาร์โบไฮเดรตด้วยขนาดโคโลนีและเคลียร์โซนที่เกิดขึ้นบนอาหาร starch agar

รหัสเชื้อ	ขนาดโคโลนี โดยเฉลี่ย (มม.)	ขนาดเคลียร์โซน โดยเฉลี่ย (มม.)	ประสิทธิภาพ การย่อยสลาย
S1	11.3	11.3	1.0
S2	3.3	-	-
S2	3.3	8.3	1.0
S4	3.0	-	-
S4	3.0	-	-
S6	9.3	9.3	1
S7	4.0	8.0	1.0
S8	4.0	-	1
T0	4.0	-	1
T1	4.0	-	1
T2	3.0	-	-
T3	11.0	15.0	1.0
T4	10.0	14.0	1.4
T5	11.3	15.3	1.0

หมายเหตุ – คือเชื้อไม่เจริญ และไม่สามารถคำนวณหาประสิทธิภาพในการย่อยสลายได้

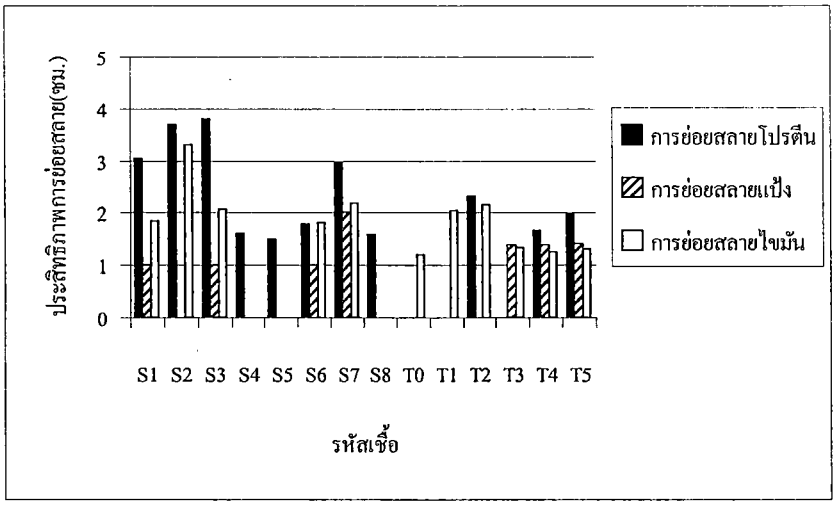
ส่วนในการย่อยสลายไขมันพบว่าเชื้อ S1, S2, S3, S6, S7 และ T0-T5 สามารถย่อยสลายไขมันบนอาหาร tributyrin agar ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชม. โดยมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันอยู่ในช่วง 1.19 – 3.3 โดยเชื้อที่สามารถย่อยสลายไขมันได้ดี คือ S2 ดังตาราง ที่ 4

ตารางที่ 4 ประสิทธิภาพในการย่อยไขมันด้วยขนาดโคโลนีและเคลียร์โซนที่เกิดขึ้นบนอาหาร **tributyrin agar**

รหัสเชื้อ	ขนาดโคโลนี โดยเฉลี่ย (มม.)	ขนาดเคลียร์โซน โดยเฉลี่ย (มม.)	ประสิทธิภาพ การย่อยสลาย
S1	4.3	8.7	1.85
S2	1.0	3.3	3.30
S3	4.7	9.7	2.06
S4	-	-	-
S5	-	-	-
S6	3.7	6.7	1.81
S2	4.0	9.7	3.38
S6	3.7	-	-
T0	7.3	9.7	1.19
T1	7.3	9.7	2.06
T1	7.3	8.0	2.06
T3	3.7	4.0	1.33
T4	3.7	6.7	1.27
T5	3.7	3.7	1.33

หมายเหตุ คือเชื้อไม่เจริญ และไม่สามารถคำนวณหาประสิทธิภาพในการย่อยสลายได้

จากการทดลองสามารถเขียนกราฟเปรียบเทียบการย่อยสลายโปรตีน,ไขมัน,คาร์โบไฮเดรต ได้ดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 เปรียบเทียบการย่อยสลายโปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต ของเชื้อที่แยกได้จากลำไส้กุ้งกุลาดำ

จากกราฟแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าเชื้อที่สามารถย่อยสลายโปรตีนและไขมันได้ดีคือ S2 และ S3 โดยที่มี S1, S3, S6, S7, T4 และ T5 นั้นสามารถย่อยสลายได้ทั้งโปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต

1.2 การต่อต้านเชื้อก่อโรค *V. harveyi*

จากการทดสอบให้เชื้อ *V. harveyi* มีค่า OD ตั้งแต่ 1.0, 0.5, 0.3, 0.2, 0.1, 0.05, 0.01 แล้วนำไป spread plate พบว่าทุกความเข้มข้นของ *V. harveyi* เชื้อที่คัดแยกมาจากลำไส้กุ้งกุลาดำครั้งนี้ไม่สามารถต่อต้าน *V. harveyi* ได้เลย

1.3 การทดสอบการก่อโรคของแบคทีเรียที่แยกได้จากการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง

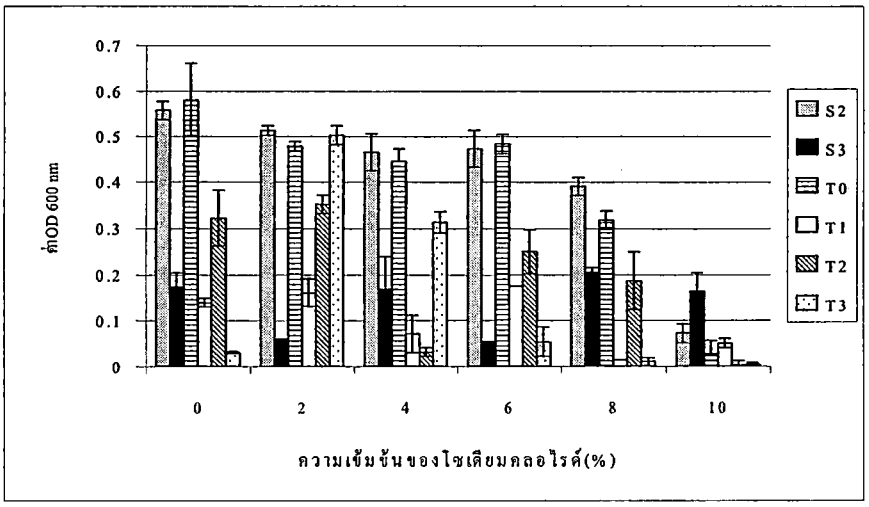
จากเชื้อ 14 สายพันธุ์พบว่าเชื้อที่ไม่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดง คือ S2, S3, T0, T1, T2 และ T3 ซึ่งให้ผลดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 การย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของเชื้อที่แยกได้จากลำไส้กุ้งกุลาดำบนอาหาร blood agar

รหัสเชื้อ	การย่อยสลายเม็ดเลือดแดง	รหัสเชื้อ	การย่อยสลายเม็ดเลือดแดง
S1	ß- hemolysis	S8	ß- hemolysis
S1	ไม่เกิดการย่อยสลาย	T0	ไม่เกิดการย่อยสลาย
S3	ไม่เกิดการย่อยสลาย	T1	ไม่เกิดการย่อยสลาย
S4	œ- hemolysis	T2	ไม่เกิดการย่อยสลาย
S3	œ- hemolysis	T3	ไม่เกิดการย่อยสลาย
S6	ß- hemolysis	T9	ß- hemolysis
S7	ß- hemolysis	T5	ß- hemolysis

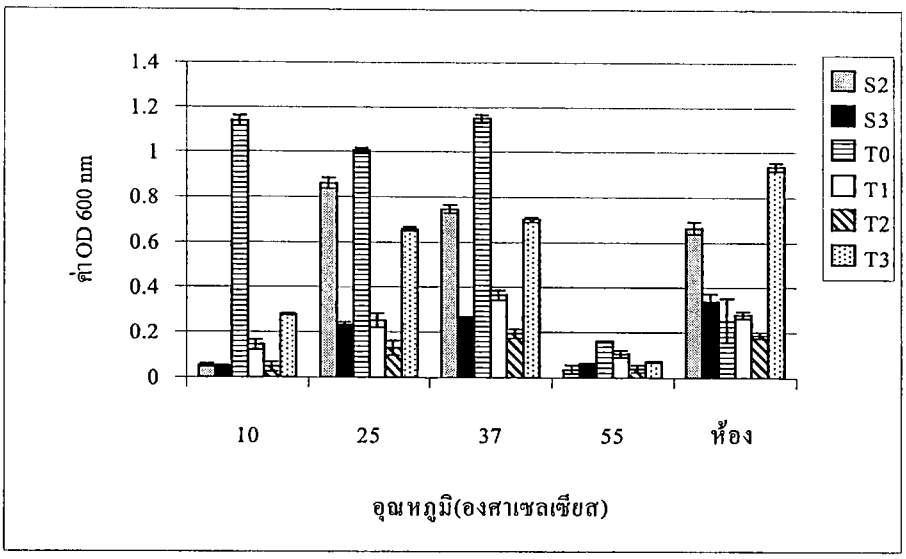
1.4 การทดสอบคุณสมบัติของแบคทีเรียต่อการทนต่อสิ่งแวดล้อม

จากการทดลองคุณสมบัติการทนต่อสิ่งแวดล้อมนั้น พบว่าแบคทีเรียมีการเจริญที่แตกต่างกันโดยในการทดสอบการทนต่อโซเดียมคลอไรด์นั้นแบคทีเรียสายพันธุ์ S2 และ T0 จะมีการเจริญที่ดีที่สุดและกว้างที่สุดคือสามารถเจริญได้ดีในความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในช่วง 0-8 % ดังรูปที่ 4



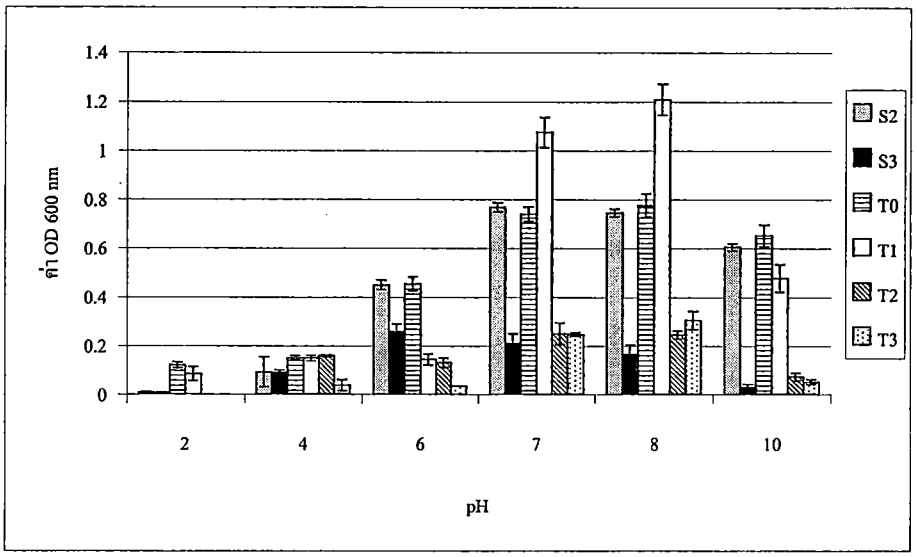
รูปที่ 4 การเจริญของแบคทีเรียต่อโซเดียมคลอไรด์

ส่วนในการทดสอบการทนต่ออุณหภูมินั้นพบว่าเชื้อที่สามารถเจริญได้ดีสุดคือ S2 และ T0 ซึ่งพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ T0 นั้นสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ดังรูปที่ 5



รูปที่ 5 การเจริญของแบคทีเรีย ณ อุณหภูมิช่วงต่างๆ

ในการทดสอบการทนต่อ pH เชื้อที่ทนต่อ pH ได้กว้างก็คือ S2 และ T0 ซึ่งสามารถทนได้ตั้งแต่ที่ pH 6-10 ดังแสดงได้ในรูป 6



รูปที่ 6 การเจริญของแบคทีเรีย ณ pH ช่วงต่างๆ

1.5 แบคทีเรียจากลำไส้ของกุ้งกุลาดำที่มีคุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการเป็นโพรไบโอติก

จากการศึกษาคุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการเป็นโพรไบโอติกนั้นในตารางที่ 6 แสดงให้เห็นว่า S2 เป็นแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติของการเป็นโพรไบโอติกได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียชนิดอื่นๆ เพียงแต่มีความสามารถในการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตได้ปานกลาง และแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆในตารางที่ 6 นั้นจะมีคุณสมบัติแตกต่างกันไปบ้าง เช่น สายพันธุ์ S3 จะมีประสิทธิภาพในการย่อยสารอาหารทั้ง 3 ชนิดแต่มีความคงทนต่อสภาพแวดล้อมได้ปานกลาง ส่วน T0 นั้นถึงแม้จะมีความคงทนต่อสภาพแวดล้อมดีที่สุดแต่มีความสามารถในการย่อยสารอาหารได้ต่ำจึงทำให้ T0 มีคุณสมบัติไม่เหมาะสมในการเป็นโพรไบโอติก ส่วน T1 และ T3 นั้นมีคุณสมบัติที่โดดเด่นคือ มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันและคาร์โบไฮเดรตได้ดี ตามลำดับ และสายพันธุ์ T2 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายโปรตีนและไขมันได้ดี

ตารางที่ 6 ประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอาหารและความทนทานต่อสิ่งแวดล้อมของแบคทีเรียที่แยกจากลำไส้กุ้งกุลาดำ

แบคทีเรีย	ประสิทธิภาพในการย่อยสลายสูง			ความทนทานต่อสิ่งแวดล้อมสูง		
	โปรตีน	คาร์โบไฮเดรต	ไขมัน	โซเดียมคลอไรด์	pH	อุณหภูมิ
S2	+		++	+	+	+
S3	+		+	+	+	+
T0			+	+	+	++
T1			+	+	+	+
T2	+		+			
T3			+	+		+

\+ หมายถึง มีประสิทธิภาพหรือความทนทานสูง

++ หมายถึง มีประสิทธิภาพหรือความทนทานสูงมาก

จากนั้นได้ทำการจำแนกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอาหารและความทนทานต่อสิ่งแวดล้อม ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 การจำแนกแบคทีเรียที่แยกจากลำไส้กุ้งกุลาดำที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก

แบคทีเรีย	จำแนกชนิดของแบคทีเรีย
S2	*Micrococcus*
S2	*Bacillus pasteuri*
T0	*Methylococcus*
T●	*Pantoea*
S2	*Micrococcus*
S2	*Listeria denitrificans*

2. การแยกและทดสอบคุณสมบัติของแบคทีเรียจากผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก

2.1 การแยกแบคทีเรียจากผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก

จากการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในตัวอย่างผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก 6 ตัวอย่าง โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ plate count agar พบแบคทีเรียในตัวอย่างผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก แสดงผลดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในตัวอย่างผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก

ผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (CFU/g)
A	20733.3 ± 1594.8
B	613.3 ± 344.4
C	85666.7 ± 3511.9
D	12633.3 ± 737.1
E	4433.3 ± 2182.5
F	8233.3 ± 493.3

หมายเหตุ : CFU/g หมายถึง colony forming unit ต่อตัวอย่าง 1 กรัม

จากการสังเกตลักษณะโคโลนีบน plate count agar การติดสีแกรม และรูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบลักษณะที่แตกต่างกันดังตารางที่ 9 และจากการศึกษาลักษณะโคโลนีบน MRS agar พบลักษณะดังตารางที่ 10

ตารางที่ 9 ลักษณะต่าง ๆ ของแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก

ผลิตภัณฑ์	ไอโซเลท	ลักษณะโคโลนี	การติดสี	รูปร่าง
A	1	สีเหลือง มันวาว ขอบ wavy	Gram +	Rod
	2	สีขาว กลม แห้ง ขอบ lobate	Gram +	Rod
	3	สีขาว มันเยิ้ม ขอบ lobate	Gram +	Rod
B	1	สีขาว กลม มัน ขอบ wavy	Gram +	Rod
	2	สีขาว กลม มัน ขอบ wavy	Gram +	Rod
	3	สีขาว กลม แห้ง ขอบ smooth	Gram +	Rod
	4	สีขาว กลม แห้ง ขอบ lobate	Gram +	Rod
C	1	สีขาว กลม แห้งด้าน ขอบ wavy	Gram +	Rod
	2	สีเหลืองใส กลม ขอบ smooth	Gram +	Cocci
	3	สีขาว กลม แห้ง ขอบ wavy	Gram +	Rod
	4	สีครีม กลม แห้ง ขอบ wavy	Gram +	Rod
	5	สีขาว กลม แห้ง ขอบ lobate	Gram +	Rod
	6	สีขาว กลม แห้ง ขอบ wavy	Gram +	Rod
	7	สีครีม กลม มันวาว ขอบ smooth	Gram +	Rod
D	1	สีครีม กลมขนาดเล็ก(pin point)	Gram +	Cocci
	2	สีขาว กลมขนาดเล็ก(pin point)	Gram +	Cocci
	3	สีขาว กลม มัน ขอบ smooth	Gram +	Rod
	4	สีครีม กลม มัน ขอบ smooth	Gram +	Rod
	5	สีขาว กลม มันวาว ขอบ smooth	Gram +	Cocci
	6	สีขาว มัน ขอบ lobate	Gram +	Rod
	7	สีขาว ด้าน ขอบ lobate	Gram +	Rod

ผลิตภัณฑ์	ไอโซเลท	ลักษณะโคโลนี	การติดสี	รูปร่าง
E	1	สีขาว กลมขนาดเล็ก(pin point)	Gram +	Cocci
	2	สีครีม กลมขนาดเล็ก(pin point)	Gram +	Cocci
	3	สีขาว มัน ขอบ wavy	Gram +	Rod
	4	สีขาว มัน กลม ขอบ smooth	Gram +	Rod
	5	สีขาว แห้ง ขอบ lobate	Gram +	Rod
	6	สีเหลือง มัน ขอบ wavy	Gram +	Rod
	7	สีขาว ด้าน ขอบ smooth	Gram +	Rod
	8	สีขาว ด้าน ขอบ wavy	Gram +	Rod
F	1	สีเลือง กลม ขอบ wavy	Gram +	Cocci
	2	สีขาว กลม แห้ง ขอบ lobate	Gram +	Rod
	3	สีครีม กลม มัน ขอบ smooth	Gram +	Rod
	4	สีเหลือง กลม ขนาดเล็กมากขอบ smooth	Gram +	Cocci
	5	สีครีม กลม แห้ง ขอบ lobate	Gram +	Rod
	6	สีครีม กลม ขนาดเล็กมากขอบ smooth	Gram +	Rod

<u>หมายเหตุ</u> : Gram + ติดสี Crystal violet (สีม่วง)

Gram - ติดสี Safranin O (สีแดง)

ตารางที่ 10 ลักษณะต่าง ๆ ของแบคทีเรียกลุ่ม Lactic acid ที่แยกได้จากตัวอย่างผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก

ผลิตภัณฑ์	ไอโซเลท	ลักษณะโคโลนี	การติดสี	รูปร่าง
A	1	สีขาว ขนาดเล็ก (pin point)	Gram +	Coccobacilli
B	-			
C	-			
D	-			
E	-			
F	-			

หมายเหตุ : - หมายถึง ไม่พบแบคทีเรีย

2.2 ความสามารถของผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกในการย่อยสารอาหารประเภทโปรตีน คาร์โบไฮเดรตและไขมัน

จากการนำตัวอย่างผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกแต่ละตัวอย่างมาทดสอบความสามารถในการย่อยสลายโปรตีน คาร์โบไฮเดรตและไขมัน โดยนำมาทดสอบบนอาหาร Skim milk agar, starch agar และ tributyrin agar ตามลำดับเหมือนกับการทดสอบแบคทีเรียที่แยกจากลำไส้ของกุ้งกุลาดำ ผลจากการทดลองพบว่าผลิตภัณฑ์ทั้ง 6 ชนิดมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตใกล้เคียงกัน คือ อยู่ในช่วง 1.33 ± 0.00 ถึง 1.72 ± 0.28 และ 1.08 ± 0.11 ถึง 1.42 ± 0.32 ตามลำดับ

ตารางที่ 11 อัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส ต่อเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี ของโพรไบโอติกที่ย่อยสลายโปรตีน

ผลิตภัณฑ์	ประสิทธิภาพการย่อยสลาย
A	1.63
B	1.33
C	1.72
D	1.69
E	1.59
F	1.52

หมายเหตุ : ประสิทธิภาพการย่อยสลาย หมายถึง อัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสต่อเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี

ตารางที่ 12 อัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสต่อเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี ของโพรไบโอติกที่ย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต

ผลิตภัณฑ์	ประสิทธิภาพการย่อยสลาย
A	1.63
B	1.33
C	1.72
D	1.69
E	1.59
F	1.52

หมายเหตุ : ประสิทธิภาพการย่อยสลาย หมายถึง อัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส ต่อเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี

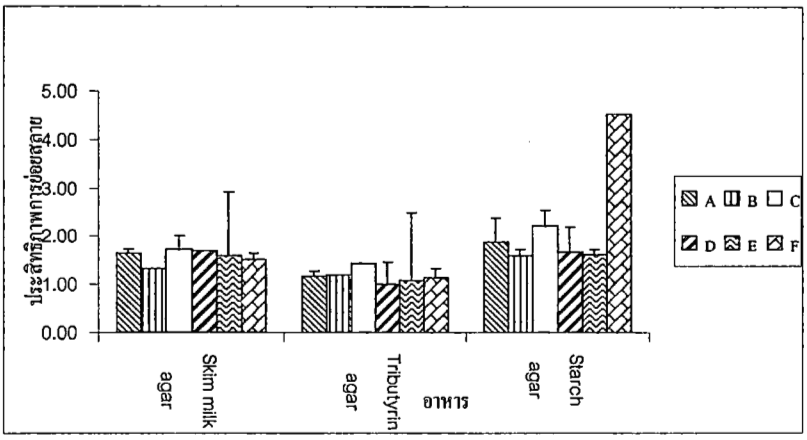
ส่วนประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันนั้นผลิตภัณฑ์ A – E มีค่าใกล้เคียงกันและค่อนข้างจะใกล้เคียงกับประสิทธิภาพในการย่อยสลายโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต ยกเว้น ผลิตภัณฑ์ F ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันสูงมากถึง 4.52

ตารางที่ 13 อัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส ต่อเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี ของโพรไบโอติกที่ย่อยสลายไขมัน

ผลิตภัณฑ์	ประสิทธิภาพการย่อยสลาย
A	1.88
B	1.60
C	2.22
D	1.67
E	1.62
F	4.52

หมายเหตุ : ประสิทธิภาพการย่อยสลาย หมายถึง อัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส ต่อเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี

จากการศึกษาความสามารถของผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกในการย่อยสลายสารอาหารประเภทโปรตีน คาร์โบไฮเดรตและไขมัน สามารถนำมาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายได้ดังรูปที่ 7



รูปที่ 7 ประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอาหาร

2.3 ความสามารถของโพรไบโอติกในการต่อต้านเชื้อก่อโรคในกุ้งกุลาดำ

จากการนำตัวอย่างผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกแต่ละตัวอย่างมาทดสอบความสามารถในการต่อต้านเชื้อก่อโรคในกุ้งกุลาดำ คือ *Vibrio harveyi* ในการทดสอบความสามารถในการต่อต้านแบคทีเรีย *V. harveyi* ด้วย 2 วิธีคือ

(1) ด้วยการใช้ whole cell ร่วมด้วยสารที่ละลายในอาหาร nutrient agar โดยนำมาทดสอบด้วยจุดลงบนอาหาร Nutrient agar ที่ผสมด้วย 3%NaCl ถ้าแบคทีเรียมีความสามารถในการต่อต้านเชื้อก่อโรคในกุ้งกุลาดำได้ จะเกิดวงใสรอบโคโลนี และคำนวณประสิทธิภาพในการต่อต้าน *V. harveyi* โดยการเปรียบเทียบอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส ต่อเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี ซึ่งถ้ามีค่ามากแสดงว่าย่อยสลายได้ดี แสดงผลได้ดังตารางที่ 14 และ

(2) ด้วยส่วนใสจากการนำผลิตภัณฑ์ไปปั่นเหวี่ยงที่ 8000 rpm นาน 10 นาที จากนั้นกรองผ่านหัวกรอง 0.45 ไมโครเมตร นำส่วนใสมาจุดลงบนอาหาร Nutrient agar ที่ผสมด้วย 3%NaCl เพื่อดูว่าส่วนใสสามารถต่อต้านเชื้อก่อโรคได้หรือไม่ แสดงได้ดังตารางที่ 15

ตารางที่ 14 อัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส ต่อเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของโพรไบโอติกที่สามารถต่อต้านเชื้อก่อโรคในกุ้งกุลาดำได้

ผลิตภัณฑ์	ประสิทธิภาพการต่อต้าน *V. harveyi*
A	-
B	-
C	-
D	-
E	-
F	-

หมายเหตุ : ประสิทธิภาพการต่อต้านเชื้อก่อโรคหมายถึง อัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสต่อเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี

- หมายถึง ไม่พบว่าสามารถต่อต้านเชื้อก่อโรคในกุ้งได้

ตารางที่ 15 ขนาดของบริเวณใสที่ทดสอบโดยนำส่วนใสของผลิตภัณฑ์ที่สามารถต่อต้าน *V. harveyi*

ผลิตภัณฑ์	ขนาดส่วนใส (mm)
A	A
B	B
C	C
D	D
E	E
F	F

หมายเหตุ : - หมายถึง ไม่พบว่าสามารถต่อต้านเชื้อก่อโรคในกุ้งได้

2.4 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก

จากการนำแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก มาจำแนกชนิดโดยนำมาศึกษารูปร่างลักษณะ และการติดสีแกรมของเซลล์ รวมทั้งทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีพบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่อยู่ในสกุล *Bacillus* และพบแบคทีเรียในสกุล *Staphylococcus, Micrococcus* และ Coryneform แสดงผลได้ดังตารางที่ 16-18

ตารางที่ 16 ผลการจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก

ผลิตภัณฑ์ โพรไบโอติก	จำนวนไอโซเลทของแบคทีเรีย				รวม
	Bacillus	*Staphylococcus*	*Micrococcus*	Coryneform	
A	3	-	-	-	3
B	4	-	-	-	4
C	6	-	1	-	7
D	4	1	2	-	7
E	6	1	1	-	8
F	3	-	2	1	6

หมายเหตุ : - หมายถึง ไม่พบแบคทีเรีย

ตารางที่ 17 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียสกุล *Staphylococcus* ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก

การทดสอบ	ผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก	
	D เชื้อที่ 2	E เชื้อที่ 2
Catalase test	+	+
Oxidase test	+	+
Coagulase test	-	-
ผล	*Staphylococcus* non aureus	*Staphylococcus* non aureus

หมายเหตุ : + หมายถึงให้ผลการทดสอบทางชีวเคมีเป็นผลบวก

- หมายถึงให้ผลการทดสอบทางชีวเคมีเป็นผลลบ

ตารางที่ 18 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก

การทดสอบ	ผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก																									
	A			B				C						D				E						F		
	1	2	3	2	3	4	5	1	3	4	5	6	7	3	4	6	7	3	4	5	6	7	8	3	4	6
Hydrolysis of starch	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
Hydrolysis of casien				+									-						-			+		-	-	
VP test	+	-	+		-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+		-	-	-	+	+	-	+
VP test pH<6		-			-	-				-	-	-		-	-	-	-			-		-		-	-	
Indole	-		-					-	-			-	-					-					-	+		
Growth in NB pH6.8	+	-	+		+	+		+	+		+	+	+	-	-	+		+	+	+	+	-	+	+	+	+
Growth in NB 40°C		+					+			+				+			+									
Growth in NB 55°C		+			-	-	+			+	-			+	-	-	+				-		-			
Catalase				+															+			+			-	
Nitrate																			+						-	
Acid from L-Arabinose	-		+		+	+		-	+		+	+	+			+		+		-	+		+	+	+	+
ผลการทดสอบ	**6,7**	**2**	**1**	**4**	**8**	**8**	**2**	**6,7**	**1**	**2**	**8**	**1**	**1**	**2**	**5**	**8**	**2**	**1**	**3**	**9**	**8**	**10**	**1**	**1**	**8**	**1**

หมายเหตุ : 1 หมายถึง *Bacillus subtilis*

2 หมายถึง *Bacillus stearothermophilus*

3 หมายถึง *Bacillus schlegelii*

5 หมายถึง *Bacillus firmus*

8 หมายถึง *Bacillus lentus*

9 หมายถึง *Bacillus macquariensis*

10 หมายถึง *Bacillus badius*

\+ หมายถึงให้ผลการทดสอบทางชีวเคมีเป็นผลบวก

\- หมายถึงให้ผลการทดสอบทางชีวเคมีเป็นผลลบ

3. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการย่อยสลายโปรตีน คาร์โบไฮเดรตและไขมันระหว่างแบคทีเรียที่แยกได้จากลำไส้ของกุ้งกุลาดำและผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก

จากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการย่อยสลายโปรตีนระหว่างแบคทีเรียที่แยกได้จากลำไส้ของกุ้งกุลาดำและผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก พบว่าผลิตภัณฑ์ทั้ง 6 ชนิดมีประสิทธิภาพต่ำกว่าสายพันธุ์ S1, S2 และ S3 ประมาณ 2 เท่า

ตารางที่ 19 ประสิทธิภาพในการย่อยโปรตีนระหว่างแบคทีเรียที่แยกได้จากลำไส้ของกุ้งกุลาดำและผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก

ชนิดของแบคทีเรีย	ประสิทธิภาพ การย่อยสลาย
S1	3.05
S2	3.70
S2	3.70
S1	3.05
S1	3.05
S1	3.05
S2	2.96
S8	3.70
T0	3.05
T0	3.05
S2	3.70
T0	3.05
S1	3.05
T0	3.05
ผลิตภัณฑ์ A	3.70
ผลิตภัณฑ์ B	3.70
ผลิตภัณฑ์ C	3.05
ผลิตภัณฑ์ D	3.05
ผลิตภัณฑ์ E	3.70
ผลิตภัณฑ์ E	3.70

หมายเหตุ – คือเชื้อไม่เจริญ และไม่สามารถคำนวณหาประสิทธิภาพในการย่อยสลายได้

จากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตระหว่างแบคทีเรียที่แยกได้จากลำไส้ของกุ้งกุลาดำและผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก ส่วนใหญ่มีประสิทธิภาพการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต ยกเว้น S7 ที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าผลิตภัณฑ์ทั้ง 6 ชนิดประมาณ 2 เท่าดังแสดงในตารางที่ 20

ตารางที่ 20 ประสิทธิภาพในการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตระหว่างแบคทีเรียที่แยกได้จากลำไส้ของกุ้งกุลาดำและผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก

รหัสเชื้อ	ประสิทธิภาพ การย่อยสลาย
S1	1.0
S1	1.0
S1	1.0
S1	1.0
S1	1.0
S1	1.0
S1	1.0
S1	1.0
S1	1.0
S1	1.0
S1	1.0
S1	1.0
T3	1.0
T3	1.0
T3	1.0
ผลิตภัณฑ์ A	1.16
ผลิตภัณฑ์ B	1.16
ผลิตภัณฑ์ C	1.42
ผลิตภัณฑ์ D	1.42
ผลิตภัณฑ์ E	1.42
ผลิตภัณฑ์ F	1.42

หมายเหตุ – คือเชื้อไม่เจริญ และไม่สามารถคำนวณหาประสิทธิภาพในการย่อยสลายได้

จากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันระหว่างแบคทีเรียที่แยกได้จากลำไส้ของกุ้งกุลาดำและผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก ส่วนใหญ่มีประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันปานกลาง ยกเว้นสายพันธุ์ S2 ที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าผลิตภัณฑ์ทั้ง 5 ชนิดแต่ผลิตภัณฑ์ชนิด F มีประสิทธิภาพสูงสุดดังแสดงในตารางที่ 21

ตารางที่ 21 ประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันระหว่างแบคทีเรียที่แยกได้จากลำไส้ของกุ้งกุลาดำและผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก

รหัสเชื้อ	ประสิทธิภาพ การย่อยสลาย
S1	1.85
S1	3.30
S3	1.85
S1	1.85
S1	-
S1	1.85
S1	1.85
S8	-
T0	1.85
S3	2.04
T2	2.04
T2	2.04
T0	1.85
T0	1.85
ผลิตภัณฑ์ A	1.85
ผลิตภัณฑ์ A	3.30
ผลิตภัณฑ์ C	2.22
ผลิตภัณฑ์ D	1.67
ผลิตภัณฑ์ E	1.67
ผลิตภัณฑ์ E	4.52

หมายเหตุ – คือเชื้อไม่เจริญ และไม่สามารถคำนวณหาประสิทธิภาพในการย่อยสลายได้

บทที่ 6
สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

สรุปผลการทดลอง

ผลจากการแยกเชื้อจากลำไส้ที่น่าจะเป็นโพรไบโอติกพบว่าสามารถจำแนกแบคทีเรียได้ 14 สายพันธุ์โดยตั้งชื่อแบคทีเรียกลุ่มนี้คือ S1-S8 และ T0-T5 หลังจากนั้นนำแบคทีเรียทั้ง 14 สายพันธุ์ศึกษาคุณสมบัติ 4 ประการของการเป็นโพรไบโอติกที่ดี คือ การย่อยสลายสารอาหาร (โปรตีน ไขมันและคาร์โบไฮเดรต) การต่อต้าน *V. harveyi* การย่อยสลายเม็ดเลือดแดง และการทนต่อสิ่งแวดล้อม (โซเดียมคลอไรด์, pH และอุณหภูมิ)

จากคุณสมบัติขั้นต้นในการทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายโปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต พบว่า จากมีจำนวน 11 สายพันธุ์จาก 14 สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายโปรตีนและสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยโปรตีนสูง คือสายพันธุ์ S1, S2 (*Micrococcus*), S3 (*Bacillus pasteuri*), S7 และ T2 (*Micrococcus*) ส่วนจำนวน 7 สายพันธุ์จาก 14 สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตคือ S1, S3 (*Bacillus pasteuri*), S6, T3 (*Listeria denitrificans*), T4 และ T5 แต่พบว่าเมื่อเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพในการย่อยสลายโปรตีนพบว่าไม่มีสายพันธุ์ใดที่มีประสิทธิภาพในการย่อยคาร์โบไฮเดรตสูง และพบว่าจากมีจำนวน 11 สายพันธุ์จาก 14 สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันและสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยไขมันสูงสุด คือสายพันธุ์ S2 (*Micrococcus*) และรองลงมาคือ S1, S3 (*Bacillus pasteuri*), S6, S7, T1 (*Pantoea*) และ T2 (*Micrococcus*) ดังนั้นเมื่อนำมาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอาหารทั้ง 3 ชนิดพบว่ามีแบคทีเรีย 6 สายพันธุ์จาก 14 สายพันธ์ คือ S1, S3, S6, S7, T4 และ T5 ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอาหารทั้ง 3 ชนิดได้และแบคทีเรียสายพันธุ์ S7 เป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอาหารทั้ง 3 ชนิดดีที่สุด

หลังจากนั้นได้ทำแบคทีเรียทั้ง 14 สายพันธุ์ไปทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงเพื่อบ่งบอกถึงการก่อโรคของแบคทีเรีย พบว่ามีเชื้อที่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดง 8 สายพันธุ์และสายพันธุ์ที่มีการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงจะไม่นำมาทดสอบคุณสมบัติอื่นๆ ต่อไป ดังนั้นที่พบว่า S7 แม้จะเป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอาหารทั้ง 3 ชนิดดีที่สุดแต่พบว่าเป็นสายพันธุ์ที่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงจึงเป็นสายพันธุ์ที่ไม่เหมาะสมต่อการเป็นโพรไบโอติก เนื่องจากน่าจะมีโอกาสสูงในการก่อโรคต่อคนและสัตว์

สายพันธุ์ที่ไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงคือแบคทีเรียสายพันธุ์ S2, S3, T0, T1, T2 และ T3 ที่จะนำไปทดสอบใน คุณสมบัติอื่นๆต่อไป คุณสมบัติที่ทำการทดสอบต่อมาคือ ทดสอบการทนทานต่อสิ่งแวดล้อมและผลจากการทดสอบความทนทานต่อปริมาณโซเดียมคลอไรด์พบว่าเชื้อที่ทนทานต่อโซเดียมคลอไรด์ได้ในช่วงกว้างคือแบคทีเรียสายพันธุ์ T0 และ S2 ที่มีความสามารถใน

การทนทานต่อความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์จาก 0-8 % การทนทานต่อสิ่งแวดล้อมที่ 2 ที่นำมาทดสอบ คือ pH ต่อการเจริญทั้ง 6 สายพันธุ์ พบว่าได้ผลเหมือนกับการทนทานของโซเดียมคลอไรด์คือ สายพันธุ์ของ S2 และ T0 สามารถเจริญได้ใน pH กว้างคือในช่วง pH 6-10 และปัจจัยของสิ่งแวดล้อมสุดท้ายคืออุณหภูมิ พบว่าสายพันธุ์ T0 เท่านั้นที่สามารถเจริญได้ในอุณหภูมิที่กว้างตั้งแต่ 10-37 องศาเซลเซียส ส่วน S2 สามารถเจริญได้ในช่วง 25-37 องศาเซลเซียสเท่านั้น

ดังนั้นสรุปได้ว่าแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์มีความสามารถที่แตกต่างกัน คือ S2 เป็นสายพันธุ์สามารถย่อยสลายโปรตีนและไขมันอย่างมีประสิทธิภาพสูง แต่ไม่สามารถย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตได้ แต่สามารถเจริญได้ในสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกันได้ดีทั้งทนทานต่อความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ pH และอุณหภูมิในช่วงกว้าง ส่วนสายพันธุ์ S3 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอาหารได้ทั้ง 3 ชนิดโดยไม่ก่อโรค แม้จะมีการเจริญในสภาวะต่างๆไม่ดีนักก็ตาม สายพันธุ์ T0 ถึงแม้จะมีความสามารถทนทานต่อสิ่งแวดล้อมได้ดีแต่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอาหารค่อยข้างต่ำดังนั้นสายพันธุ์ T0 จึงน่าจะเป็นสายพันธุ์ที่ไม่ควรนำมาพัฒนาเป็นโพรไบโอติก ยกเว้น จะพบว่ามีคุณสมบัติของการเป็นโพรไบโอติกอื่น และสายพันธุ์ T1 มีประสิทธิภาพในการย่อยไขมันได้ดี สายพันธุ์ T2 มีประสิทธิภาพในการย่อยโปรตีนและไขมันได้ดีและ T3 มีประสิทธิภาพในการย่อยคาร์โบไฮเดรตได้ดี ดังนั้นหากนำแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ยกเว้น T0 มาผสมกันน่าจะใช้เป็นโพรไบโอติกที่ดีได้และน่าจะทำการศึกษาต่อไป

ส่วนการคัดแยกแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก จำนวน 6 ตัวอย่าง ได้แก่ A, B, C, D, E และ F พบแบคทีเรียทั้ง 6 ตัวอย่าง โดยพบว่ามีแบคทีเรียปริมาณใกล้เคียงกัน คือ อยู่ในช่วง 6.13×10^{2} ถึง 8.57×10^{4} CFU/g ซึ่งแตกต่างจากที่ได้เขียนโฆษณาไว้ข้างขวดที่มีปริมาณสูงถึง 10^{9} ถึง 10^{12} CFU/g ดังนั้นในการใช้โพรไบโอติกนั้นควรต้องทำการทดลองใช้ก่อนถ้าได้ผลดีแล้วค่อยมีการใช้อย่างมากขึ้นเพื่อป้องกันการสิ้นเปลืองต้นทุนในการเลี้ยงสัตว์น้ำโดยเฉพาะอย่างยิ่งกุ้งกุลาดำหรือกุ้งเศรษฐกิจอื่นๆ และแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างทั้งหมดมาจำแนกสกุล พบว่าแบคทีเรียที่พบอยู่ในทุกผลิตภัณฑ์และมีอยู่ด้วยกันหลากหลายสายพันธุ์ผสมกันอยู่ในสกุล *Bacillus* นอกจากนี้ก็พบ *Staphylococcus*, *Micrococcus* และ Coryneform เมื่อศึกษาความสามารถในการย่อยสลายสารอาหาร คือ โปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต ของผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก พบว่าทุกผลิตภัณฑ์มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอาหารได้ทั้ง 3 ชนิด และการศึกษาความสามารถในการต่อต้านเชื้อก่อโรคในกุ้งกุลาดำ พบว่าส่วนที่เป็นส่วนใสและตัวเชื้อของทุกผลิตภัณฑ์ไม่สามารถต่อต้านเชื้อก่อโรคในกุ้งกุลาดำ

เมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างแบคทีเรียที่แยกได้และผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกในด้านการย่อยสลายสารอาหาร (โปรตีน ไขมันและคาร์โบไฮเดรต) พบว่าในด้านการย่อยสลายโปรตีนนั้นแบคทีเรียที่แยกได้จากลำไส้ของกุ้งกุลาดำนั้นส่วนใหญ่มีประสิทธิภาพที่สูงกว่าผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกทั้ง 6 ชนิดและส่วนใหญ่จะเป็นแบคทีเรียในสกุลที่คล้ายกันคือ *Micrococcus* และ

Bacillus ส่วนประสิทธิภาพในการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตและไขมันของทั้ง 2 กลุ่มใกล้เคียงกันยกเว้นผลิตภัณฑ์ F ที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมันสูงมาก ส่วนในด้านความสามารถในการต่อต้าน *V. harveyi* พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้และผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกไม่สามารถต่อต้าน *V. harveyi* ทั้งตัวเซลและส่วนใสของแบคทีเรีย

อภิปรายผลทดลอง

จากการแยกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติ 4 ประการของการเป็นโพรไบโอติกที่ดีจากลำไส้กุ้งกุลาดำ คือ การย่อยสลายสารอาหาร (โปรตีน ไขมันและคาร์โบไฮเดรต) การต่อต้าน *V. harveyi* การย่อยสลายเม็ดเลือดแดง และการทนต่อสิ่งแวดล้อม (โซเดียมคลอไรด์, pH และอุณหภูมิ; Gatesoupe, 1999) จากคุณสมบัติในการย่อยสลายโปรตีน คาร์โบไฮเดรตและไขมันขึ้นอยู่กับการผลิตเอนไซม์คือ โปรติเอส อะไมเลสและไลเปส ตามลำดับ แบคทีเรียที่แยกได้ที่มีความสามารถในการย่อยสลายโปรตีน ได้แก่ สายพันธุ์ S1, S2 (*Micrococcus*), S3 (*Bacillus pasteuri*), S7 และ T2 (*Micrococcus*) และพบว่าสายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตคือ สายพันธุ์ S1, S3 (*Bacillus pasteuri*), S6, T3 (*Listeria denitrificans*), T4 และ T5 และสายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายไขมันคือสายพันธุ์ S2 (Micrococcus) และรองลงมาคือสายพันธุ์ S1, S3 (*Bacillus pasteuri*), S6, S7, T1 (*Pantoea*) และ T2 (*Micrococcus*) และขจีนาฏและคณะ ในปี พ.ศ. 2540 สามารถแยก *Bacillus* จากดินจำนวนหลายสายพันธุ์ที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอส อะไมเลสและไลเปส

รวมทั้ง Sonnenschein et al. (1993) ได้กล่าวไว้ว่า *Bacillus* ส่วนใหญ่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารในกลุ่มโปรตีน คาร์โบไฮเดรตและไขมันให้เป็นสารที่มีขนาดเล็กลงได้ ส่วน Ochoa-Solano และ Olmos-Soto (2006) ได้แยก *B. subtilis* และ *B. megaterium* ที่มีคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส คาร์บอกไฮดรอเลสและไลเปส และคุณสมบัติดังกล่าวทำให้ *Bacillus* กลุ่มนี้มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกที่ดี และ De Schrijver และ Ollevier (2000) รายงานถึงโพรไบโอติกที่มีความสามารถในการย่อยโปรตีนของปลา juvenile turbot พบว่าการให้โพรไบโอติกดังกล่าวผสมร่วมกับอาหารจะช่วยในการย่อยไนโตรเจนหรือโปรตีนของปลา juvenile turbot ได้

ดังนั้นเมื่อนำมาเปรียบเทียบการย่อยสลายสารอาหารทั้ง 3 ชนิด พบว่ามีแบคทีเรีย 6 สายพันธุ์จาก 14 สายพันธ์ คือ S1, S3, S6, S7, T4 และ T5 ที่สามารถย่อยสลายสารอาหารทั้ง 3 ชนิดได้และแบคทีเรียสายพันธุ์ S7 เป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอาหารทั้ง 3 ชนิดดีที่สุด แต่ต่อมาพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นี้มีการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงซึ่งเป็นดัชนีที่บ่ง

บอกว่าน่าจะเป็นสายพันธุ์ที่อาจจะก่อโรคต่อคนและสัตว์ ดังนั้นถ้ามีเวลาทดลองต่อไปควรจะทำการจำแนกชนิดและทำการทดสอบการก่อโรคของสายพันธุ์ดังกล่าวก่อนที่นำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

นอกจากนั้นพบว่าแบคทีเรียที่แยกได้นี้มีคุณสมบัติอื่นๆ คือ โดยไม่เป็นเชื้อก่อโรคและมีการทนต่อสภาวะแวดล้อมได้ดีพอสมควรคือ สามารถทนต่ออุณหภูมิ โซเดียมคลอไรด์ และ pH ได้กว้าง และอยู่ในช่วงที่มีสภาวะเหมาะสมในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำคือ pH 6.5-9 และความเค็ม 15-25 ppt แต่ไม่พบแบคทีเรียชนิดที่ต่อต้าน *V .harveyi* ได้เลยแสดงว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้น่าจะไม่สามารถผลิตสารที่ออกมาต่อต้าน *V. harveyi* ได้โดยตรง แต่อย่างไรก็ตามโพรไบโอติกที่ดีและสามารถช่วยเพื่อเพิ่มอัตราการรอดหรือทนทานต่อเชื้อก่อโรคอาจจะเกิดจากปัจจัยอื่นๆ ร่วมด้วย เช่น โพรไบโอติกช่วยในการปรับปรุงคุณภาพของสุขภาพเจ้าบ้านของผู้ให้อาศัย ด้วยกระบวนการยึดพื้นที่ภายในลำไส้ของสัตว์น้ำ มีการเหนี่ยวนำทำให้เพิ่มความสามารถในการต้านทานโรคหรือการแข่งขันกับเชื้อก่อโรคทั้งในด้านสารอาหารและตำแหน่งยึดเกาะภายในลำไส้กุ้งและกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรค (Gatesoupe, 1999; Rengpipat, 2000)

โพรไบโอติกที่แยกได้จากกุ้งกุลาดาสายพันธุ์ที่ไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้อาจเป็นการบ่งบอกเป็นนัยได้ว่าเชื้อนั้นเป็นแบคทีเรียที่ไม่ก่อโรค ซึ่งการนำจุลินทรีย์ที่คัดแยกไปทำเป็นโพรไบโอติกนั้นหากจุลินทรีย์ใดที่สามารถก่อโรคได้จะไม่นำไปเป็นโพรไบโอติก เนื่องจากหากใช้โพรไบโอติกในสิ่งแวดล้อมตามธรรมชาติ เช่น ในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ก็จะก่อให้เกิดการแพร่ระบาดเชื้อก่อโรคไปสู่มนุษย์หรือสัตว์ต่างๆได้ ซึ่งทำให้สัตว์ หรือมนุษย์ ป่วย หรือล้มตายได้ และอาจทำให้เกิดผลกระทบกับเศรษฐกิจในทางอ้อมด้วย โดยสามารถแพร่ระบาดได้จากน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่มีการให้โพรไบโอติกที่เป็นเชื้อก่อโรค ไปสู่แหล่งน้ำธรรมชาติอื่นๆ หรือแพร่ระบาดจากตัวกุ้งเอง คือถึงแม้จุลินทรีย์นั้นจะมีผลดีต่อกุ้งแต่ก็อาจก่อโรคกับสิ่งมีชีวิตอื่นๆได้หากสิ่งมีชีวิตนั้นกินกุ้งกุลาดำที่มีเชื้อก่อโรคไป ดังนั้นจึงไม่นำจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้มาทดสอบในขั้นต่อไปจนกว่าที่จะได้ทำการทดสอบการก่อโรคหรือการจำแนกชนิดของแบคทีเรียดังกล่าวเพื่อทำให้มั่นใจว่าแบคทีเรียชนิดนี้ไม่ก่อโรคต่อคนและสัตว์

ในการทดลองครั้งนี้แบคทีเรียแต่ละชนิดก็มีข้อดีต่างกัน ยกตัวอย่างเช่น แบคทีเรียสายพันธุ์ S2 หรือจำแนกเป็น *Micrococcus* สามารถย่อยสลายโปรตีนและไขมันที่มีประสิทธิภาพที่ดี สามารถทนต่ออุณหภูมิ ความเข้มข้นเกลือและ pHได้ดี สอดคล้องกับการศึกษาของ Balcazar et al. ที่พบว่า *Micrococcus luteus* เป็นโพรไบโอติกที่แยกได้จากระบบลำไส้ของปลา Rainbow trout (Balcazar et al., 2006) แบคทีเรียสายพันธุ์ S3 หรือจำแนกเป็น *Bacillus pasteuri* สามารถย่อยสลายได้ทั้งโปรตีน ไขมันและคาร์โบไฮเดรตได้แต่มีการทนต่อสภาวะแวดล้อมได้ปานกลาง ส่วนแบคทีเรียสายพันธุ์ T0 หรือจำแนกเป็น *Methylococcus* มีประสิทธิภาพในการทนต่อสิ่งแวดล้อมได้ดีแล้วยังเจริญได้ดีที่อุณหภูมิต่ำแต่สามารถย่อยสลายเฉพาะแต่ไขมันเท่านั้น

ส่วนการคัดแยกแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก จำนวน 6 ตัวอย่าง ได้แก่ A, B, C, D, E และ F ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ผลิตในประเทศไทยและจากต่างประเทศ จากผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียจากทั้ง 6 ตัวอย่างโดยพบว่ามีปริมาณแบคทีเรียที่ใกล้เคียงกัน คือ อยู่ในช่วง 6.13×10^2 ถึง 8.57×10^4 CFU/g ซึ่งแตกต่างจากที่ได้เขียนโฆษณาไว้ข้างขวดที่มีปริมาณสูงถึง 10^9 ถึง 10^{12} CFU/g ดังนั้นในการใช้โพรไบโอติกนั้นควรต้องทำการทดลองใช้ก่อนถ้าได้ผลดีแล้วค่อยมีการใช้อย่างมากขึ้นเพื่อป้องกันการสิ้นเปลืองต้นทุนในการเลี้ยงสัตว์น้ำโดยเฉพาะอย่างยิ่งกุ้งกุลาดำหรือกุ้งเศรษฐกิจอื่นๆ เมื่อนำแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างทั้งหมดมาจำแนกสกุล พบว่าแบคทีเรียที่พบอยู่ในทุกผลิตภัณฑ์และมีอยู่ด้วยกันหลากหลายสายพันธุ์ผสมกันอยู่คือ สกุล *Bacillus* ร่วมกับ *Staphylococcus* และ/หรือ *Micrococcus* และ/หรือ *Corynebacterium*

จากการศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายโปรตีน คาร์โบไฮเดรตและไขมันของผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก พบว่าทุกผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตได้ โดยที่แต่ละผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไม่แตกต่างกันและพบว่าทุกผลิตภัณฑ์จะมี *Bacillus* เป็นเชื้อผสมอยู่ทุกผลิตภัณฑ์ ดังนั้นอาจจะสรุปได้ว่า *Bacillus* น่าจะเป็นแบคทีเรียชนิดที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตหรือโปรตีน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Robichaud และ John (Robichaud and John, 2003) ที่พบว่าสกุล *Bacillus* เป็นแบคทีเรียที่ย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตได้ดีที่สุด

จากการศึกษาความสามารถของผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกในการย่อยสลายสารอาหารประเภทไขมันพบว่าผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกสามารถย่อยสลายไขมันได้ โดยแต่ละผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายดังนี้ คือ ผลิตภัณฑ์ A ถึง E มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายได้ใกล้เคียงกันซึ่งอยู่ในช่วง 1.62-2.22 ยกเว้นผลิตภัณฑ์ F ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสูงมาก (4.52) เมื่อนำผลิตภัณฑ์มาเปรียบเทียบความสามารถในการย่อยสลายสารอาหารแต่ละประเภท พบว่าผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกสามารถย่อยสลายได้ดีไม่แตกต่างกัน ส่วนประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันพบว่าผลิตภัณฑ์ F มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันได้ดีที่สุด ดังนั้นความสามารถและประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอาหารทั้ง 3 ชนิดนี้ไม่สอดคล้องกับปริมาณแบคทีเรียที่แยกได้ ยกตัวอย่างเช่น ผลิตภัณฑ์ F มีปริมาณแบคทีเรียน้อยกว่าผลิตภัณฑ์ C ถึง 100 เท่าแต่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนใกล้เคียงกัน แต่ผลิตภัณฑ์มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันได้ดีกว่าผลิตภัณฑ์ C ถึง 2 เท่า ดังนั้นประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอาหารนั้นซึ่งอาจจะขึ้นอยู่กับชนิดของแบคที่เรียที่ผสมกันอยู่ โดยผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก A พบ *Bacillus* และ *Lactobacillus*, ผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก B พบ *Bacillus* ผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก C พบ *Bacillus* และ *Micrococcus* ผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก D พบ *Bacillus Staphylococcus* และ *Micrococcus*ผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก E พบ *Bacillus Staphylococcus* และ *Micrococcus* และผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก F พบ *Bacillus Micrococcus* และ Coryneform

สอดคล้องกับรายงานของวารสารสัตว์น้ำ (ไม่ปรากฏชื่อผู้แต่ง, 2540) ที่กล่าวว่าโพรไบโอติกแบคทีเรียที่พบมี *Bacillus* sp., *Lactobacillus* และ *Enterococcus* เป็นต้น จากการทดลองพบว่าผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกทุกชนิดสามารถย่อยสลายโปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรตได้ แสดงให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกจะเข้าไปอยู่ในลำไส้เพื่อช่วยย่อยสลายสารอาหารที่กุ้งกินเข้าไปได้ ซึ่งอาหารกุ้งส่วนใหญ่จะประกอบด้วย โปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต (เวียง, 2542)

จากการศึกษาความสามารถของผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกในการต่อต้านเชื้อก่อโรคในกุ้งกุลาดำ โดยนำตัวอย่างผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก และส่วนใสที่นำไปปั่นเหวี่ยง 8000 rpm นาน 10 นาที แล้วนำมาผ่านหัวกรอง 0.45 ไมโครเมตร มาทดสอบการต่อต้านเชื้อก่อโรค การที่นำส่วนใสมาทดสอบเพื่อดูว่าส่วนที่สามารถต่อต้านเชื้อก่อโรคได้นั้นมาจากเซลล์แบคทีเรีย หรือส่วนผสมในผลิตภัณฑ์ พบว่าไม่มีผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกและส่วนใสของผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกชนิดใดเลยที่สามารถต่อต้านเชื้อก่อโรค *Vibrio harveyi* ให้เกิดเป็นบริเวณใสได้เลยอาจจะเนื่องมาจากการทดลองนี้เป็นการทดสอบผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกโดยตรงกับเชื้อก่อโรคจึงไม่เห็นผลการต่อต้านเชื้อก่อโรคโดยตรง แต่จากการศึกษาของ Rengpipat และคณะ (2000) พบว่าโพรไบโอติกอาจจะช่วยต่อต้านโรคโดยการที่โพรไบโอติกที่กุ้งกินเข้าไปในลำไส้จะเกิดการเพิ่มจำนวนในลำไส้กุ้ง แล้วมีผลไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันให้ตัวกุ้ง ทำให้กุ้งมีอัตราการรอดชีวิตที่สูงขึ้น นอกจากนั้นโพรไบโอติกน่าจะมีกลไกอื่นๆ ที่ยังไม่ทราบแน่ชัดว่าช่วยต่อต้านเชื้อโรคชนิดต่างๆ เช่น *Vibrio harveyi* strain D331 (Rengpipat และ Rukpratanporn, 1998), *Vibrio ordalii* (Austin และ คณะ, 1995), *Vibrio tubiashii* (Gibson และคณะ, 1998), *Vibrio harveyi, V. fluvialis, V. parahaemolyticus, V. damsela* และ *V. vulnificus* (Chythanya และคณะ, 2002), *A. salmonicida* (Gram et al., 2001) ดังนั้น ผลิตภัณฑ์ A ถึง F น่าจะเป็นผลิตภัณฑ์ที่ยังคงมีประโยชน์ในการช่วยเลี้ยงกุ้ง หรือสัตว์น้ำที่มีอาหารซึ่งมีโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมันเป็นส่วนผสมหลัก แต่การต่อต้านโรคของเชื้อในผลิตภัณฑ์ดังกล่าวคงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในด้านอื่นๆ ต่อไป

จากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างแบคทีเรียที่แยกจากลำไส้ของกุ้งกุลาดำและแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์ซึ่งเป็นการทดสอบแบคทีเรียจากลำไส้กุ้งกุลาดำซึ่งเป็นเชื้อเดี่ยวเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ซึ่งประกอบด้วยเชื้อผสม ผลการทดลองพบว่าผลิตภัณฑ์ A-E และส่วนใหญ่ของแบคทีเรียกุ้งกุลาดำนั้นมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายโปรตีน คาร์โบไฮเดรตและไขมันได้ปานกลาง มีเพียงแบคทีเรียบางสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพดีกว่าผลิตภัณฑ์ A-E ยกเว้นผลิตภัณฑ์ F นั้นมีคุณสมบัติเด่นมากคือมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตที่ดีและย่อยสลายไขมันที่ดีมากและเป็นผลิตภัณฑ์เดียวที่มีแบคทีเรียกลุ่ม Coryneform เป็นส่วนผสมร่วมกับ *Bacillus* และ *Micrococcus* ดังนั้นประสิทธิภาพที่เด่นมากกว่าผลิตภัณฑ์อื่นอาจจะเกิดจากการทำงานร่วมกันของ *Bacillus, Micrococcus* และ *Corynebacterium* นั่นเอง

เอกสารอ้างอิง

กรมประมง, http://oae.go.th/statistic/yearbook/2000-01/Section10/sec10table103.html สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร http://www.oae.go.th/statistic/export/1301TP.xls

กัญจนา ธีระกุล จุลชีววิทยาปฏิบัติการ กรุงเทพ, เจ้าพระยาการพิมพ์ 2542

เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน. 2543 หลักการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. ภาควิชาเทคโนโลยีการประมง :คณะผลิตกรรมเกษตร: มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

ขจีนาฐ โพธิเวชกุล, สุมาลี เหลืองสกุล และสมใจ ศิริโภค 2540 การคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อใช้ผลิตเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส ภาควิชาวีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

คณิต ไชยาคำและพุทธ ส่องแสงจินดา (2535) คุณสมบัติและปริมาณน้ำทิ้งจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบพัฒนา อำเภอระโนด จังหวัดสงขลา เอกสารวิชาฉบับที่ 5/2535 สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง 26 หน้า

จำนง วิสุทธิแพทย์ จุลชีววิทยาปฏิบัติการ มหาสารคาม, ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ 2522

ธนาคารกสิกรไทย. (2535) การเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ นโยบายเศรษฐกิจ ต้องควบคู่กับการอนุรักษ์สภาพแวดล้อม. เกษตรวันนี้. 11(129):37-41

บรรจง เทียนส่งรัศมี. (2542) เทคโนโลยีการเลี้ยงกุ้งกุลาดำหลังศตวรรษที่ 20. ชลบุรี : ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ประจวบ หลำอุบล. 2525. กุ้ง. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์: กรุงเทพฯ

ไม่ปรากฏชื่อผู้แต่ง. 2541. โรคกุ้งทะเล. วารสารสัตว์น้ำ 110: 23-26.

วลัยพร ทิมบุญธรรม. 2544. การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม. วิทยานิพนธ์ ; วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

รณชัย หมอดี (2535) ผลกระทบและแนวทางจัดการอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ สัตว์น้ำ 4(39):70-74

ลิลา เรืองแป้น. (2541) แบคทีเรียเรืองแสงกับการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. วารสารสัตว์น้ำ 112: 21-24

สุวิทย์ ชื่นสินธุ์. (2531) การเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์ศูนย์หนังสือเกษตร

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย และสาลินี ผลมาตย์. 2547. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ เรื่อง การจัดการและการบำบัดน้ำเสียจากการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ เพื่อทำให้การเลี้ยงกุ้งกุลาดำมีความยั่งยืนและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยบูรพา

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. 2548. เอกสารประกอบการฝึกอบรมการถ่ายทอดเทคโนโลยีสู่ชุมชน เรื่อง การจัดการและการบำบัดน้ำเสียจากการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ เพื่อทำให้การเลี้ยงกุ้งกุลาดำมีความยั่งยืนและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยบูรพา

วรรนิภา เพี้ยนภักตร์. (2539) การใช้แบคทีเรียเป็นโพรไบโอติกเสริมในอาหารกุ้ง. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

เวียง เชื้อโพธิ์หัก โภชนศาสตร์และการให้อาหารสัตว์น้ำ กรุงเทพ, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 2542

Austin, B., Stuckey, L.F., Robertson, P.A.W., Effendi, L., Griffith, D.R.W., 1995. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. Journal Fish Diseases 18: 93-96.

Balcázar J L, de Blas I, Ruiz-Zarzuela I, Cunningham D, Vendrell D and Múzquiz J L 2006 The role of probiotics in aquaculture Veterinary Microbiology 114 (3-4): 173-186

Boyd, C.E. 1982. Water Quality Management for Pond Fish Culture. Elsevier Scientific Publishing Amsterdam Netherlands

Chythanya, R., Karunasagar, I., Karunasagar, I. 2002. Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by a marine *Pseudomonas* I-2 strain. Aquaculture 208: 1-10.

De Schrijver, and R., Ollevier, F. 2000. Protein digestion in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) and effect of dietary administration of *Vibrio proteolyticus*. Aquaculture 186: 107-116.

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

Fuller R., 1992. History and development of probiotics. In: R. Fuller, Editor, *Probiotics. The Scientific Basis*, Chapman & Hall, New York, NY (1992), pp. 1–8.

Gatesoupe, F.J. 1999. Review: The use of probiotics in aquaculture. Aquculture 180: 147-165

Gibson, L.F., Woodworth, J., George, A.M., 1998. Probiotic activity of *Aeromonas media* on the Pacific oyster, *Crassostras gigas*, when challedged with *Vibrio tubiashii*. Aquaculture 169: 111-120.

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

Gomez-Gil, B., Roque, A., Velasco-Blanco, G., 2002. Culture of *Vibrio alginolyticus* C7b, a potential probiotic bacterium, with the microalga *Chaetoceros muelleri*. Aquaculture 211: 43-48

Gram, L., Lovold, T., Nielsen, J., Melchiosen, J., Spanggaard, B. 2001. In vitro antagonism of the probiont *Pseudomonas fluorescens* strain AH2 against *Aeromonas salmonicida* does not cinfer protection of salmon against furunculosis. Aquaculture 199: 1-11.

Hasler C.M., Functional foods: benefits, concerns and challenges—a position paper from the American Council on Science and Health, *J. Nutr.* **132** (2002), pp. 3772–3781.

Krieg, N.R., Holt, J.G., 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volumn 4 America. William and Wilkins.

Lilley, D.M. and Stillwell, R. J. 1965. Probiotics: growth promoting factors produced by micro-organisms. Science 147: 747-748.

Maeda, M., I.C. Liao. 1992. Effect of bacteria population on the growth of a prawn larva, *Penaeus monodon*. Bull.Natl.Res.Inst. Aquaculture 21: 25-29

Moriarty, D. 1998. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. Aquaculture 164: 351-358

Meunpol, Oraporn, Kanyajit Lopinyosiri and Piamsak Menasveta. 2002. The effect of ozone and probiotics on the survival of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) Aquaculture :1-12

Moriarty, D. J. W. 1998. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. Aquaculture 164: 351-358.

Nimrat. S., Polmat, S. and Vuthiphandchai, V. (2003) Utilization of Biodegrading Microorganisms under Aerobic and Aerobic Denitrifying Conditions on the Waste Treatment in the Intensive Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) Pond: Laboratory and simulated ponds. Poster presentation in : Marine Biotechnology Conference, Chiba, Japan, September 21-28.

Ochoa-Solano J. L and Olmos-Soto J. 2006. The functional property of *Bacillus* for shrimp feeds Food Microbiology 23 (6): 519-525.

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

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

Rengpipat, S., Phianphak, W., Piyatiratitivorakul, S., Menasvata, P. 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus S11*). Aquaculture 191: 271-288

Robichaud, Shawn C., Zamora, John M. 2003. Isolate and Identification of amylase producing Microorganisms. http://www.mtsu.edu/~scientia/journals/vol6/Graduate/robichaud.htm.

Schroeder, G.L. 1975. Nightime material balance for oxygen in fish receiving waste. Bamidgeh 27 (3) : 64-65.

Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., Holt, J.G., 1986. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volumn 2 America. William and Wilkins.

Sonnenschein, A.L., Losick, R., Hoch, J.A., 1993. *Bacillus subtilis* and Others Gram-Positive Bacteria: Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics. American Society for Microbiology, Washington, DC, 987pp.

Verschuere, L., Rombant, G., Sorgeloos, P., and Verstraete, W. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. Microbiology and Molecular Biology 64: 655-671.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

1. Nutrient agar (NA) มีสูตรดังนี้

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	800	มิลลิลิตร
Sea water	200	มิลลิลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร และน้ำทะเล 200 มิลลิลิตร ต้มจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2. Nutrient broth (NB) มีสูตรดังนี้

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Distilled water	800	มิลลิลิตร
Sea water	200	มิลลิลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร และน้ำทะเล 200 มิลลิลิตร ต้มจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3. Plate count agar มีสูตรดังนี้

Plate count agar (อาหารสำเร็จ) มีส่วนประกอบดังนี้

Tryptone	5.0	กรัม
Glucose	1.0	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	800	มิลลิลิตร
Sea water	200	มิลลิลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร และน้ำทะเล 200 มิลลิลิตร ต้มจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

4. Motility test agar มีสูตรดังนี้

Peptone	9.0	กรัม
Agar	5.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Distilled water	800	มิลลิลิตร
Sea water	200	มิลลิลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร และน้ำทะเล 200 มิลลิลิตร ต้มจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

5. OF medium มีสูตรดังนี้

OF medium (อาหารสำเร็จ) มีส่วนประกอบดังนี้

Tryptone	2.0	กรัม
Sodium chloride	5.5	กรัม
Dipotassium phosphate	0.3	กรัม
Bromthymol blue	0.08	กรัม
Agar	2.0	กรัม
Carbohydrate	10.0	กรัม
Distilled water	800	มิลลิลิตร
Sea water	200	มิลลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร และน้ำทะเล 200 มิลลิลิตร ต้มจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 110องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

6. Starch agar มีสูตรอาหารดังนี้

Cassava starch	10.0	กรัม
Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	800	มิลลิลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมด (ยกเว้นแป้ง)ละลายน้ำกลั่น 700 ส่วนน้ำกลั่นที่เหลือ 300 มิลลิลิตร นำมาละลายแป้งมันสำปะหลัง นำทั้งสองส่วนไปให้ความร้อน ค่อยๆ เทน้ำแป้งสุก ลงไปในอาหารส่วนแรกทีละน้อย คนตลอดเวลา นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทใส่จานเพาะเชื้อ ทิ้งให้อาหารแข็งตัว

7. Skim milk agar มีสูตรอาหารดังนี้

Skim milk	2.0	กรัม
Glucose	1.0	กรัม
K_2HPO_4	0.2	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	กรัม
Agar	15.0	กรัม

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ต้มจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

8. Tributyrin agar มีสูตรอาหารดังนี้

Tributyrin agar (อาหารสูตรสำเร็จ) มีส่วนประกอบดังนี้

Peptic digest of animal tissue	5.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Tributyrin oil	10	มิลลิลิตร
Distilled water	800	มิลลิลิตร
Sea water	200	มิลลิลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดยกเว้น ละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ต้มจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นนำส่วนผสมทั้งหมดมาผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

9. 0.85% NaCl

NaCl	8.5	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

ละลาย NaCl ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

10. แลคโตบาซิลไล เอ็มอาร์เอส (Lactobacillus MRS) มีสูตรอาหารดังนี้

Proteose peptone	10	กรัม
Beef extract	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Tween 80	10	มิลลิลิตร
CH_3CooNa	5	กรัม
ไตรแอมโมเนียมซิเตรท	2	กรัม
MgSO4.7H2O	0.1	กรัม
MnSO4.4H2O	0.04	กรัม
Agar	15	กรัม

ปรับพีเอชเป็น 6.5±0.2

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ต้มจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

11. L-Arabinose มีสูตรอาหารดังนี้

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Arabinose	5	กรัม
Bromthymal blue	0.04	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมด ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

12. Nitrate broth มีสูตรอาหารดังนี้

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Potassium nitrate	1	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมด ในน้ำกลั่น 1000 มิลิลิตร ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

13. Simmon's Citrate agar (Difco)

Simmon's Citrate agar (อาหารสูตรสำเร็จ) มีส่วนประกอบดังนี้

$MnSO_4$	0.2	กรัม
$(NH_4)H_2PO_4$	1.0	กรัม
K_2HPO_4	1.0	กรัม
NaCl	*5.0*	*กรัม*
Sodium citrate	2.0	กรัม
Bacto-Bromthymol blue	0.08	กรัม
Bacto-Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ต้มจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

14. Thiosulfate citrate bile salt (TCBS)

อาหารสำเร็จรูป มีสูตรดังนี้

Yeast extract	5	กรัม
Peptone	10	กรัม
Sodium citrate	10	กรัม
Sodium thiosulfate	7	กรัม
Oxgall	5	กรัม
Sodium chloride	10	กรัม
Saccharose	20	กรัม
Sodium cholate	3	กรัม

Ferric citrate	1	กรัม
Bromthymol blue	0.04	กรัม
Thymol B blue	0.04	กรัม
Agar	15	กรัม

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ต้มจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

15. Alkaline Peptone Water

Peptone	10.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
Disilled water	1000	มิลลิลิตร

ปรับ เป็น pH 9.0 $\pm$ 0.2

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ต้มจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

ภาคผนวก ข
สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. Gram's crystal violet มีสูตรดังนี้

สารละลาย A

Crystal violet	2.0	กรัม
Ethyl alcohol	20	กรัม

สารละลาย B

Ammonium oxalate	0.8	กรัม
Distilled water	80	มิลลิลิตร

นำสารละลาย **A** และสารละลาย **B** ผสมเข้าด้วยกัน

2. Gram's iodine มีสูตรดังนี้

Iodine	1.0	กรัม
Potassium iodine	2.0	กรัม
Distilled water	300	มิลลิลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดผสมเข้าด้วยกัน โดยเติมไอโอดีนหลังจากโปแตสเซียมไอโอไดด์ละลายหมด

3. Gram's alcohol มีสูตรดังนี้

Ethyl alcohol	98	มิลลิลิตร
Acetone	2	มิลลิลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดผสมเข้าด้วยกัน

4. Gram's safranin O มีสูตรดังนี้

Safranin O (2.5% solution in 95% ethyl alcohol)	10	มิลลิลิตร
Distilled water	100	มิลลิลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดผสมเข้าด้วยกัน

5. Oxidase test มีสูตรดังนี้

N,N,N,N-tetramethyl-*p*-phenylene diamine dihydrochloride ($C_{10}H_{18}C_{l2}N_2$)	1.0	กรัม
Distilled water	100	มิลลิลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดผสมเข้าด้วยกัน เก็บในขวดหุ้ม foil

หมายเหตุ ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้ทดสอบ

6. Malachite green มีสูตรดังนี้

Malachite green	5.0	กรัม
Distilled water	100	มิลลิลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดผสมเข้าด้วยกัน

7. 3%Hydrogen peroxide solution

H_2O_2	3.0	กรัม
H_2O	100	มิลลิลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดผสมเข้าด้วยกัน

8. Iodine solution for starch hydrolysis test

Iodine crystal	1.0	กรัม
Potassium iodide	2.0	กรัม
Ethanol	30	กรัม

ผสม iodine crystal กับ KI เข้าด้วยกัน เติมน้ำเล็กน้อยเพื่อให้ผลึกละลาย จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนครบ 300 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดีเก็บไวในขวดสีชา ถ้าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลืองไม่ควรใช้ทดสอบ

9. Kovac's solution

Para-dimethyl-amino benzaldehyde	5.0	กรัม
Amyl or butayl alcohol	75	มิลลิลิตร
HCl, concentrate	25	มิลลิลิตร

ผสม para-dimethyl amino benzaldehyde กับ alcohol ใน water bath อุณหภูมิ 30-60 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ขณะปล่อยให้เย็นริน HCl ลงไป เขย่าให้เข้ากันเก็บในขวดสีชาใส่ไว้ในตู้เย็น

ภาคผนวก ค

การทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี

1. Catalase test

หลักการ เป็นการทดสอบเพื่อจำแนกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ catalaseโดยปกติในขบวนการหายใจแบบใช้ออกซิเจน อะตอมของไฮโดรเจนจะรวมตัวกับออกซิเจน ทำให้เกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์(H_2O_2) ซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์ แต่แบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถผลิตเอนไซม์ catalase เพื่อย่อยสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์แตกออก ให้ก๊าซออกซิเจน และน้ำ ดังสมการข้างล่าง

$$2H_2O \xrightarrow{\text{Catalase}} 2H_2O+O_2$$

ดังนั้นการทดสอบว่า แบคทีเรียผลิตเอนไซม์ catalase หรือไม่ ทำได้โดยการใส่ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วสังเกตดู ถ้าให้ก๊าซแสดงว่า ให้ผลบวก การทดลองนี้ไม่ควรทำบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเลือดผสมอยู่ เพราะเม็ดเลือดแดงมีเอนไซม์ catalase ภายในเซลล์ทำการแปรผลอาจผิดพลาดได้ ดังนั้นจึงควรเคลื่อนย้ายโคโลนีที่เจริญบน blood agar อย่างระมัดระวังลงบนสไลด์และทำการทดสอบบนสไลด์แทน

การทดสอบการผลิตเอนไซม์ catalase นี้มีประโยชน์ในการจำแนกแบคทีเรียสกุล *Staphylococcus* ออกจากสกุล *Streptococcus* spp. โดยที่ *Staphylococcus* ให้เอนไซม์ catalase แต่ *Streptococcus* ไม่ให้ และแบคทีเรีย *Mycobacterium* spp. ทุกชนิด ยกเว้น *M. gastri* และ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่ดื้อยา isodiazid สามารถผลิตเอนไซม์นี้ได้

การทดสอบ ให้ใช้เข็มเขี่ยเชื้อตรงกลางโคโลนี แตะบนสไลด์ที่สะอาด แล้วหยด 3% H_2O_2 ลงบนเชื้อที่อยู่บนสไลด์ดูฟองก๊าซที่เกิดขึ้นทันที

การอ่านผล

ผลบวก : มีฟองก๊าซเกิดขึ้นทันที

ผลลบ : ไมม่มีฟองก๊าซเกิดขึ้น

2. Citrate Utilization test

หลักการ ใช้ในการจำแนกแบคทีเรียแกรมลบ โดยอาศัยความสามารถในการใช้ซิเตรต (citrate)เป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งพลังงาน โดยแบคทีเรียที่สามารถใช้ซิเตรต จะผลิตเอนไซม์ citriase ย่อยซิเตรต ให้ผลผลิตเป็นออกซาโลอะซิเตต(oxaloacetate) และอะซิเตต(acetate) และยังมีเอนไซม์อีกชนิดคือ oxaloacetate decarboxylase ซึ่งสามารถย่อยอะซิเตตไปเป็นไพรูเวต (pyruvate) และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ นี้จะรวมตัวกับโซเดียม และน้ำ ได้เ ป็น

โซเดียมคาร์บอเนต และสารประกอบที่มีฤทธิ์เป็นด่าง ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมี pH สูงขึ้น และสีของอินดิเคเตอร์บรอมไธมอลบลูในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น Citrate agar, Simmons เปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน

การทดสอบ เพาะเชื้อที่ต้องการทดสอบลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น Citrate agar, Simmons บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผล

การอ่านผล

ผลบวก : อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อเจริญ เปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน

ผลลบ : อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อเจริญไม่เปลี่ยนสี สีคงเดิม

3. Coagulase test

หลักการ เป็นการทดสอบความสามารถในการผลิต cogulase เพื่อจำแนก S. aureus ที่สามารถผลิตเอนไซม์ออกจาก Staphylococcus ชนิดอื่นๆ เอนไซม์นี้มี 2 รูปแบบ แบบแรกเป็นเอนไซม์ cogulase ที่เกาะอยู่กับผนังเซลล์ของ S. aureus หรือเรียกว่า bound coagulase ซึ่งทดสอบโดยใช้สไลด์ แต่ไม่สามารถตรวจสอบเชื้อที่อยู่ในอาหารเหลวได้ โดยเอนไซม์แบบแรกนี้มีผลทำให้ไฟบริโนเจน(fibrinogen) ในน้ำเหลืองเปลี่ยนเป็นไฟบริน(fibrin) ทำให้น้ำเหลือง หรือน้ำเลือดแข็งตัว (clot) เอนไซม์อีรูปแบบหนึ่งเป็นเอนไซม์ที่ถูกหลั่งออกจากเซลล์ ตรวจสอบได้โดยใช้หลอดทดลอง โดยมี coagulase-reaction factor (CRF) จับกับเอนไซม์ cogulase เป็นสารประกอบที่ซับซ้อน เรียกว่า coagulase- CRF ซึ่งแตกต่างจากทรอมบิน (thrombin) และสารประกอบนี้สามารถเปลี่ยนไฟบริโนเจรให้เป็นไฟบรินได้

การทดสอบ

1. ทดสอบโดยใช้สไลด์ (Slide cogulase test)

เกลี่ยแบคทีเรียจำนวนหนึ่งผสมกับน้ำเกลือ 0.85% ที่หยดลงบนสไลด์ (ถ้าเกิดแอคกลูติเนชั่นเอง ก็ไม่ต้องทำต่อไป เปลี่ยนเป็นไปทำในหลอดแทน) หยดพลาสมาของกระต่ายที่ใส่สารกันการแข็งตัวของเลือด (EDTA) ลงไป สังเกตการณ์เกิดตะกอนสีขาวเป็นเกร็ด ถ้าเกิดผลบวกช้าโดยใช้เวลา 20-60 นาที ในการตกตะกอน ควรทำในหลอดทดลองเพื่อให้แน่ใจอีครั้ง

2. การทดสอบโดยใช้หลอดทดลอง (tube coagulase test)

โดยผสมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ซึ่งอาจเป็น Trypticase soy broth (TBS) กับพลาสมา ในอัตราส่วน 1 : 1(อาจใช้พลาสมาอย่างเดียวก็ได้โยไม่ต้องผสมกับ TBS) แบ่งใส่หลอดทดลอง 3 หลอด แล้วเขี่ยเชื้อจากโคโลนีที่ต้องการทดสอบ(ต้องเป็นเชื้อที่เพิ่งทำการเพาะเลี้ยงใหม่ๆ) ลงในหลอดที่ 1 และหลอดที่ 2ใส่เชื้อที่ทราบแน่ว่าเกิด coaggulation แน่ (positive control) ส่วนหลอดที่ 3 ใส่น้ำเกลือแทน (negative control) แล้วบ่มเพาะเชื้อนาน 12-18 ชั่วโมง บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วดูผลทุกครึ่งชั่วโมงโดยค่อยๆ เอียงหลอดดูว่า มีการแข็งตัวของพลาสมา

หรือไม่ ห้ามเขย่าเด็ดขาด โดยมากการเกิดผลบวก มักเกิดภายใน 4 ชั่วโมง หากยังไม่ให้ผลบวกให้บ่มเชื้อต่อไป จนครบ 18-24 ชั่วโมง แล้วดูผลอีกครั้ง

การอ่านผล

ผลบวก : เกิดการแข็งตัวของพลาสมา โดยมีส่วนที่แข็งตัวเกิน 75 % ของปริมาตรของของเหลวทั้งหมดในหลอดทดลอง

ผลลบ : ไม่เกิดการแข็งตัว หรือมีน้อยกว่า 75% ของปริมาตรของของเหลวทั้งหมดในหลอดทดลอง

4. Indole test

หลักการ เป็นการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการผลิต indole จากทริปโตเฟน (tryptophan) โดยที่อาหารเลี้ยงเชื้อ Indole broth ประกอบด้วย tryptophan rich peptone และโซเดียม คลอไรด์ เมื่อทริปโตเฟนในเปปโตนถูกออกซิไดซ์โดยแบคทีเรีย ให้ indole, skatole และ indoleacetic acid (โดยใช้tryptophanase) ซึ่งสามารถตรวจสอบผล indole โดยใช้ alcoholic *p*-dimethylaminobenzadehyde โดย indole จะทำปฏิกิริยากับอัลดีไฮด์ (aldehyde) ให้ผลผลิตเป็นสีแดงในส่วนที่เป็นแอลกอฮอล์ (alcoholic layer)

ปัจจุบันรีเอเจนต์สองชนิดที่ใช้ในการทดสอบ indole คือ Kovac's reagent และ Ehrlich's reagent แต่ Ehrlich's reagent มีความไวมากกว่า Kovac's reagent และใช้ในการทดสอบ indole ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียกลุ่มแอนแอโรปส์ และกลุ่มที่เป็น nonfermentative gram negative bacteria สำหรับ Kovac's reagentใช้ในการจำแนกแบคทีเรียวงศ์ Enterobacteriaceae

การทดสอบ เพาะเชื้อที่ต้องการลงใน Tryptophan broth บ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง อ่านผลโดยการหยด Kovac's reagent โดยการหยด Kovac ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 หยด เขย่าเบาๆ สังเกตสีที่เกิดขึ้น ถ้าใช้ Ehrlich's reagentขั้นแรกใส่อีเทอร์ (ether) ลงไป 1 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ แล้วหยดรีเอเจนต์ลงไป 5 หยด อ่านผล

การอ่านผล

ผลบวก : สีของรีเอเจนต์เปลี่ยนไปเป็นสีแดง

ผลลบ : สีของรีเอเจนต์ไม่เปลี่ยนแปลง

4. Motility test

หลักการ เป็นการทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อ ซึ่งเนื่องมาจากการที่เชื้อมีแฟลกเจล่า (flagella) เชื้อที่สามารถเคลื่อนที่ได้จะสามารถเคลื่อนที่ออกจากบริเวณเดิมไปยังบริเวณใหม่ซึ่งจะเกิดการเจริญ และแบ่งตัวไปยังบริเวณต่อไป ดังนั้น ถ้าต้องการทดสอบเพื่อให้เห็นลักษณะการเจริญของแบคทีเรีย ในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ชัดเจน จะมีการใส่ 2,3,5-triphenyltetrazolium

chloride (ttc) ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ (5 มิลลิลิตรต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร) แบคทีเรียที่เจริญทวีจำนวน จะนำ ttc ซึ่งไม่มีสีเข้าสู่เซลล์ แล้วรีดิวส์ ttc เป็นตะกอนของเม็ดสีแดง (formazan pigment) ให้เห็นตรงบริเวณที่มีการเจริญของแบคทีเรีย

การทดสอบ เพาะเชื้อที่ต้องการทดสอบลงใน motility test medium โดย stab ตรงๆ เพียงครั้งเดียว ประมาร 2/3 ของส่วนสูงอาหาร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง อ่านผล ถ้ายังให้ผลลบ ให้ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องต่อไปอีก 1-2 สัปดาห์ สังเกตการณ์เปลี่ยนปลงเป็นระยะ

การอ่านผล

ผลบวก : เห็นการเจริญของเชื้อออกมานอกรอย stab หรือไม่มีรอยการเจริญที่ชัดบริเวณรอย stab แต่อาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหลอดขุ่นกว่าเดิม

ผลลบ : เห็นการเจริญของเชื้ออย่างชัดเจน ที่บริเวณรอย stab โดยเห็นขอบเขตของเชื้อที่เจริญอย่างชัดเจน แม้จะบ่มเชื้อต่อไปอีก 1-2 สัปดาห์ก็ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

5. Nitrate test

หลักการ เป็นการทดสอบความสามารถของเชื้อในการที่จะรีดิวส์ไนเทรตให้เป็นไนไทรต์ หรือ ก๊าซไนโตรเจน แบคทีเรียที่สามารถหายใจแบบไม่ใช้ออกซิเจน และใช้สารอินทรีย์ เช่น ไนเทรตเป็นตัวรับอิเลคตรอนแทนออกซิเจนแบคทีเรียบางชนิดสามารถรีดิวส์ไนเทรตเป็นไนไทรต์ และสามารถรีดิวส์จากไนไทรต์ไปเป็นแอมโมเนียก็มี เช่น Pseudomonas aeruginosa ซึ่งเป็นแอโรปส์ ที่สามารถหายใจแบบไม่ใช้ออกซิเจนได้สมการ

$$\underset{\text{Nitrate ion}}{NO^{3-} + 2H^{+} + 2e^{-}} \longrightarrow \underset{\text{Nitrate ion}}{NO^{-}_{2} + H_2O} \longrightarrow \underset{\text{Nitrous oxide}}{N_2O} \longrightarrow \underset{\text{Nitrogen gas}}{N_2}$$

การทดสอบ การรีดิวส์ของไนเทรตแบ่งเป็น 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกเป็นการตรวจสอบการรีดิวส์ไนเทรตเป็นไนไทรต์ หลังจากที่เพาะเชื้อที่ต้องการทดสอบลงใน Nitrate broth หรือ Nitrate agar แล้วทดสอบการมีไนเทรตโดยการเติม Sulfanilic acid และ ∝-naphthylamine ลงไป รีเอเจนต์ทั้งสองจะทำปฏิกิริยากับไนไทรต์เกิดสารประกอบสีแดง เรียก red azo dye ถ้าในขั้นตอนแรกนี้ให้ผลบวกแสดงว่า ไนเทรตถูกรีดิวส์ให้ไนไทรต์ แต่ถ้าการทดสอบขั้นแรกไม่เกิดสีแดงดังกล่าว อธิบาย ได้ 2 ทางคือ ไนเทรตไม่ได้ถูกรีดิวส์ หรือไนเทรตถูกรีดิวส์ให้เป็นไนไทรต์แล้ว ไนไทรต์ถูกรีดิวส์ต่อไปเป็นแอมโมเนีย หรือ ก๊าซไนโตรเจน จึงทำให้ตรวจหาไนไทรต์ไม่พบ ดังนั้นต้องตรวจสอบต่อว่าเป็นกรณีไหน โดยเติมผงสังกะสี (zinc dust) ลงไปใน broth หรือ agar ซึ่งเป็น การทดสอบขั้นตอนที่สอง ผงสังกะสีสามารถรีดิวส์ไนไตรตไปเป็นไนเตรต์ ดังนั้นถ้าไนเทรตไม่ถูกรีดิวส์ในขั้นตอนที่ 1 และเกิดสีแดงในขั้นตอนที่ 2 แสดงว่าเป็นผลลบ คือ แบคทีเรียดังกล่าวไม่

สามารถรีดิวส์ไนเทรต และคงยังมีไนเทรตอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เกิดสีแดงจากการทดสอบขั้นตอนแรก และไม่เกิดสีแดงในการทดสอบขั้นตอนที่ 2 แสดงว่าแบคทีเรียชนิดนี้สามารถรีดิวส์ไนไทรต์เป็นแอมโมเนีย หรือก๊าซไนโตรเจน แสดงว่า ให้ผลบวก

การทดสอบ เพาะเชื้อที่ต้องการลงบน nutrient broth หรือ nutrient agar slant บ่มเชื้อไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง นำมาเติม 0.5% alpha-naphthylamine และ 0.85% Sulfanilic acid solution อย่างละ 5 หยด อ่านผลการเปลี่ยนสีของอาหาร

การอ่านผล

ผลบวก : มีสีแดงเกิดขึ้น หรือไม่มีสีแดงเกิดขึ้นในการทดสอบตอนแรก และเมื่อเติมผงสังกะสีลงไปก็ยังไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง

ผลลบ : ไม่มีสีแดงเกิดขึ้นในตอนแรก และจะมีสีแดงเกิดขึ้น เมื่อเติมผงสังกะสีลงไป

6. Oxidase test

การทดสอบ การผลิตเอนไซม์ Cytochrome oxidase ของแบคทีเรียบางชนิด

หลักการ แบคทีเรียกลุ่มแอโรปส์มีขบวนการ oxidative phosphorylation สำหรับขบวนการหายใจและสร้างพลังงาน ในระหว่างที่ขบวนการดังกล่าวเกิดขึ้น จะมีการถ่ายเทอิเลคตรอนได้แก่ ออกซิเจนโดยผ่านลูกโซ่การขนส่งอิเลคตรอน โดยอาศัยหลักการทำงานของไซโตรโครมต่าง ๆ (Cytochrom) ก็คือ ลูกโซ่ของเอนไซม์นั้นเอง ผลที่ได้ทำให้เกิดน้ำ ไซโตรโครมสุดท้ายที่จับออกวิเจนในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม หรือยีสต์เป็น cytochrom C oxidase อย่างไรก็ตาม ในแบคทีเรียมีไซโตโครมมากมายที่ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ oxidase ตัวสุดท้ายในการถ่ายเทอิเลคตรอนให้ออกซิเจน

การตรวจสอบการมีเอนไซม์ Cytochrome oxidase ใช้รีเอเจนต์ปกติที่ไม่มีสี ซึ่งจะมีสีเมื่อถูกออกซิไดส์ รีเอเจนต์ที่ใช้มี 2 ชนิดคือ tetramethyl-*p*-phenylenediamine dihydrochloride หรือ dimethyl-*p*-phenylenediamine dihydrochloride รีเอเจนต์ทั้ง 2ชนิดนี้ปกติไม่มีสี แต่จะมีสีม่วงหรือสีน้ำเงินเข้มเมื่อถูกออกซิไดส์ ดังนั้น แบคทีเรียที่มีเอนไซม์ oxidase จะสามารถออกซิไดส์รีเอเจนต์เหล่านี้ ทำให้เห็นเป็นสีน้ำเงินเข้ม

การทดสอบ เตรียมสารละลายรีเอเจนต์ 1% tetramethyl-*p*-phenylenediamine dihydrochloride ในน้ำเกลือปราศจากเชื้อ แล้วหยดลงบนกระดาษกรองปราศจากเชื้อใช้เข็มขีดเชื้อมาขีดบนกระดาษกรองนั้น สีของแบคทีเรียที่ขีดบนกระดาษกรองเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเข้มหรือม่วงภายใน 10 วินาที แสดงถึงผลบวก(อย่าใช้ไม้เขี่ยเชื้อที่ทำด้วยเหล็ก หรือนิโครม อาจให้ผลบวกได้) การทดสอบอาจทำโดยหยดรีเอเจนต์โดยตรงบนโคโลนีที่เจริญ บน Blood หรือ Chocolate agar แล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงเป็นสีน้ำเงินเข้ม หรือสีม่วงให้เห็น

การอ่านผล

ผลบวก : เกิดสีม่วงหรือน้ำเงินเข้มบนกระดาษกรอง หรือสีน้ำเงินเข้มที่อยู่บนโคโลนีที่อยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Blood หรือ Chocolate agarเมื่อหยดรีเอเจนต์ลงไป

ผลลบ : ไม่เกิดการเปลี่ยนสีเกิดขึ้นให้เห็น

7. **Oxidation-Fermentation test**

หลักการ การทดสอบการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ ในสภาพที่มีหรือไม่มีออกซิเจน เป็นการทดสอบเพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรีย การใช้น้ำตาลเหล่านี้จะได้กรด หรือกรดและก๊าซ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อประกอบด้วย โปรตีนเล็กน้อย โซเดียมคลอไรด์ บัฟเฟอร์ อินดิเคเตอร์ วุ้น และคาร์โบไฮเดรต การที่ใส่โปรตีนเพียงเล็กน้อยเพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดด่างที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีนจากขบวนการ deamination

การทดสอบ โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อลงในอาหารแต่ละหลอด (2 หลอด) หลอดหนึ่งคลุมอาหารที่เพาะเชื้อแล้วนั้นด้วย mineral oil หรือ พาราฟิน แต่อีกหลอดหนึ่งไม่คลุม สำหรับแบคทีเรียที่ใช้น้ำตาลในสภาวะที่มีออกซิเจน หรือ เกิด oxidization ซึ่งต้องการออกซิเจนร่วมปฏิกิริยาด้วย แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถให้กรดในหลอดทีเปิดอยู่ แต่จะไม่สามารถให้กรดในหลอดที่มรพาราฟินคลุมอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับแบคทีเรียที่สามารถใช้น้ำตาลในสภาพไม่มีออกซิเจน หรือสามารถหมักย่อยน้ำตาลได้ จะให้กรดทั้ง 2 หลอด แบคทีเรียเหล่านี้ถูกเรียกว่า asacchrolytic การเกิดกรดทำให้ pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำลง สามารถเปลี่ยนสีอินอิเคเตอร์ได้ ถ้าอินดิเคเตอร์เป็น Phenol red ซึ่งมีสีเหลืองในสภาพที่เป็นกรด และให้สีแดงในสภาพที่เป็นด่าง แบคทีเรียบางชนิดขณะเกิดการหมักย่อย ยังให้กรดอินทรีย์ เช่น กรดแลคติด ก๊าซไฮโดรเจน และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งตรวจสอบโดยใส่ Duram tube ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย

การอ่านผล

ผลบวก : อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลือง

ผลลบ : อาหารเลี้ยงเชื้อเดิมไม่เปลี่ยนแปลง

ภาคผนวก ง

ตารางแสดงผลการทดลอง

1. การนับจำนวนจุลินทรีย์และการคำนวณค่า CFU/g ของผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก A ถึง F

ชื่อผลิตภัณฑ์	dilution	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
A	10^{-1}	TNTC	TNTC	TNTC
	10^{-2}	194	225	203
	10^{-3}	TNTC	TNTC	25
	10^{-4}	19	3	83
	10^{-5}	3	3	13
B	10^{-1}	39	101	101
	10^{-2}	4	3	3
	10^{-3}	3	33	33
	10^{-4}	5	1	1
	10^{-5}	-	-	-
A	10^{-1}	TNTC	TNTC	TNTC
	10^{-2}	TNTC	TNTC	TNTC
	10^{-3}	82	89	89
	10^{-4}	15	17	17
	10^{-5}	3	2	2
B	10^{-1}	TNTC	TNTC	TNTC
	10^{-2}	118	132	132
	10^{-3}	18	22	22
	10^{-4}	-	3	3
	10^{-5}	4	6	6
B	10^{-1}	TNTC	TNTC	TNTC
	10^{-2}	40	132	68
	10^{-3}	3	22	1
	10^{-4}	-	3	2
	10^{-5}	-	6	2
A	10^{-1}	-	106	106
	10^{-2}	80	88	88
	10^{-3}	10	3	3
	10^{-4}	19	3	3
	10^{-5}	4	1	1

การคำนวณค่า CFU/g

1. A ที่ 10^{-2} (194+225+203)/3 = $207.33 \times 10^{2} \times 10$
   = 20.73×10^{4}
2. B ที่ 10^{-1} (39+101+44)/3 = $61.33 \times 10^{1} \times 10$
   = 0.61×10^{4}
3. C ที่ 10^{-3} (82+89+86)/3 = $85.67 \times 10^{3} \times 10$
   = 85.67×10^{4}
4. D ที่ 10^{-2} (118+132+129)/3 = $126.33 \times 10^{2} \times 10$
   = 12.63×10^{4}
5. E ที่ 10^{-2} (40+25+68)/3 = $44.33 \times 10^{2} \times 10$
   = 4.43×10^{4}
6. F ที่ 10^{-2} (80+88+79)/3 = $82.33 \times 10^{1} \times 10$
   = 0.82×10^{4}