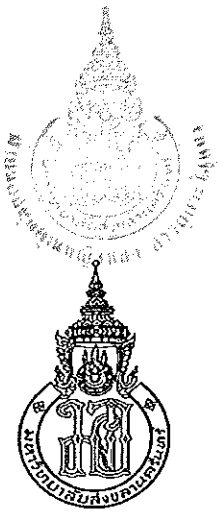


การพัฒนาผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกเพื่อประยุกต์ใช้ในกุ้งขาว

Development of Probiotic Product for Application in White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

เลขา ไสลเพชร

Lakha Salaipeth

0

QR121 ล72 ล551 ล. 2

294583

30 มิ.ย. 2551

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of

Master of Science in Biotechnology

Prince of Songkla University

2551

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การพัฒนาผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกเพื่อประยุกต์ใช้ในกุ้งขาว

ผู้เขียน นางสาวเลขา ไสลเพชร

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทิพรัตน์ หงภัทรคีรี)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.กิจการ ศุภมาตย์)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทิพรัตน์ หงภัทรคีรี)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.กิจการ ศุภมาตย์)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภคมน จิตประเสริฐ)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.เกริกชัย ทองหนู)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกเพื่อประยุกต์ใช้ในกุ้งขาว
ผู้เขียน	นางสาวเลขา ไสลเพชร
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา	2550

บทคัดย่อ

การศึกษาควบคุมการเจริญของ *Vibrio harveyi* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในกุ้งโดยใช้โปรไบโอติกผสมของ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 ในระบบ *in vitro* และ *in vivo* พบว่า *Vibrio harveyi* ในอาหารเลี้ยงเชื้อถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์โดยโปรไบโอติกผสมภายใน 18 ชั่วโมงของการเลี้ยงร่วมกันโดยสามารถลดปริมาณของ *Vibrio harveyi* ได้ 5.17 log CFU ต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ชุดควบคุมที่มีการเติม *Vibrio harveyi* เพียงชนิดเดียวกลับมีจำนวนเพิ่มขึ้นจาก 5.79 log CFU ต่อมิลลิลิตรเป็น 7.11 log CFU ต่อมิลลิลิตร เมื่อนำเชื้อ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 ชนิดเดียว หรือ โปรไบโอติกผสมทั้ง 3 ชนิด มาผสมในอาหารกุ้งโดยมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นอยู่ที่ 1.13-2.13 $x10^8$ CFU ต่อกรัมอาหาร มาใช้เลี้ยงกุ้งขาวเป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า อัตราการเจริญ, อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ และ อัตราการรอดชีวิตไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ *($p>0.05$)* ในกุ้งที่ได้รับโปรไบโอติก แต่จะแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ *($p<0.05$)* เมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งขาวที่ไม่ได้รับโปรไบโอติก โดยพบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกเพียงชนิดเดียว และอาหารผสมโปรไบโอติกทั้ง 3 ชนิด มีอัตราการรอดชีวิตที่ 98.89-100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กุ้งที่ไม่ได้รับโปรไบโอติกมีอัตราการรอดชีวิตเพียง 68.39 เปอร์เซ็นต์ เมื่อตรวจปริมาณเม็ดเลือดรวมพบว่าปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งขาวในชุดที่ไม่ได้รับโปรไบโอติกมีปริมาณน้อยกว่าปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งขาวชุดที่ได้รับอาหารผสมของโปรไบโอติกผสมทั้ง 3 ชนิด, *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 และ *Candida tropicalis* TH112 เพียงชนิดเดียว อย่างมีนัยสำคัญ *($p<0.05$)* และ พบว่าแบคทีเรียแลกติก และยีสต์ในทางเดินอาหารของกุ้งขาวที่ได้รับโปรไบโอติกผสมทั้ง 3 ชนิดมีปริมาณเพิ่มขึ้นเป็น 7.07 log CFU ต่อกรัมของทางเดินอาหาร และมีปริมาณมากกว่ากุ้งขาวที่ไม่ได้รับโปรไบโอติกอย่างมีนัยสำคัญ *($p<0.05$)* นอกจากนั้นยังพบว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกทั้ง 3 ชนิดมีจำนวน pathogenic *Vibrio* sp. ซึ่งมีโคโลนีสีเขียวบนอาหาร TCBS agar สูงกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ เมื่อทดสอบความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียก่อโรคออกจากระบบไหลเวียนของกุ้งโดยการฉีด *Vibrio harveyi* ความเข้มข้น 1.98-2.91x 10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร พบว่ากุ้งขาวที่ได้รับโปรไบโอติกมีความสามารถในการกำจัด *Vibrio harveyi* ออกจากระบบเลือดได้

ดีกว่ากุ้งขาวที่ไม่ได้รับโปรไบโอติกอย่างมีนัยสำคัญ *($p<0.05$)* เมื่อทดสอบความสามารถในการต้านทานโรคโดยการฉีด *Vibrio harveyi* เข้าสู่ระบบเลือด และ การแช่กุ้งขาวในสารแขวนลอยของ *Vibrio harveyi* ที่ความเข้มข้น 1.98-2.91x10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร พบว่าเมื่อครบ 10 วันหลังการฉีดด้วย *Vibrio harveyi* กุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกทั้ง 3 ชนิด และกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสม *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 เพียงชนิดเดียว มีอัตราการตายต่ำกว่ากุ้งขาวที่ไม่ได้รับโปรไบโอติกอย่างมีนัยสำคัญ *($p<0.05$)* ในขณะที่ไม่พบการตายของกุ้งขาวในทุกชุดการทดลองเมื่อแช่กุ้งขาวในสารแขวนลอยของ *Vibrio harveyi* และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ *Vibrio harveyi* เป็น 1.98-2.91x10^7CFU ต่อมิลลิลิตร พบว่ากุ้งขาวที่ได้รับโปรไบโอติกผสมทั้ง 3 ชนิดมีอัตราการตายต่ำกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญ *($p<0.05$)* จากนั้นเมื่อเปลี่ยนอาหารกุ้งเป็นอาหารธรรมดา พบว่าปริมาณแบคทีเรียแลกติก และ ยีสต์ในระบบทางเดินอาหารของกุ้งขาวในทุกชุดการทดลองจะมีปริมาณลดลงในวันที่ 3 ของการทดลอง แต่กุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกยังคงมีปริมาณแบคทีเรียแลกติกและยีสต์มากกว่ากุ้งขาวที่ไม่ได้รับโปรไบโอติก

เมื่อทำการผลิตเชื้อโปรไบโอติกในรูปแบบผง โดยการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง และใช้นมผงพร่องมันเนย 20 เปอร์เซ็นต์เป็นสารตัวกลางจะส่งผลให้ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 มีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุด ส่วนการเติม ซีโอไลท์ ทัลคัม และ แคลเซียมคาร์บอเนต ในอัตราส่วน 2 เปอร์เซ็นต์ผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อเป็นตัวพยุงเซลล์ในระหว่างการเพาะเลี้ยง และ การเก็บรักษาเชื้อไว้ในถุงอะลูมิเนียมฟอยล์ภายใต้การปิดผนึกแบบสุญญากาศ และ การปิดผนึกแบบธรรมดาไม่มีผลต่อการรอดชีวิตของเชื้อในระหว่างการทำแห้ง และในระหว่างการเก็บรักษาที่สภาวะต่าง ๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ อย่างไรก็ตาม การเก็บรักษาเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 28-29 องศาเซลเซียส) จะทำให้เชื้อมีอัตราการรอดชีวิตที่ต่ำกว่าการเก็บรักษาเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญ *($p<0.05$)*

Thesis Title	Development of Probiotic Product for Application in White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*)
Author	Miss Lakha Salaipeth
Major Program	Biotechnology
Academic Year	2007

ABSTRACT

Biological control of shrimp pathogen *Vibrio harveyi* using mixed probiotics of marine isolated yeasts (*Candida tropicalis* TH112 and *Pseudozyma antarctica* TH9) and *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 (isolated from shrimp gastrointestinal tract) was evaluated both *in vitro* and *in vivo* systems. Growth of *Vibrio harveyi* decreased significantly ($p<0.05$) and was completely inhibited at 18 hours of incubation in the presence of mixed probiotics (5.17 log CFU/ml decrease), whereas the control treatment (*Vibrio harveyi* alone) showed the increase of *Vibrio harveyi* from 5.82 to 7.11 log CFU/ml. Three strains of probiotics were added to shrimp feed using freshly prepared cells at the concentration of $1.13\text{-}2.13\text{x}10^8$ CFU/g feed for *Litopenaeus vannamei* (white shrimp) feeding trial. After 6 weeks, white shrimp fed with probiotic supplemented (each probiotic and mixed probiotics) and non-supplemented (control) feeds exhibited no significant difference ($p>0.05$) in growth, feed conversion ratio (FCR) and % survival between four probiotic treatments, but significant differences ($p<0.05$) were observed between probiotic and control groups. All probiotic feed shrimp showed 98.89-100 % survival, whereas the control group had only 68.39 % survival. Total haemocyte counts of shrimp fed with non-supplemented feed were significantly lower ($p<0.05$) than the shrimps fed with mixed probiotics, *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 alone and *Pseudozymz antarctica* TH112 alone. The numbers of lactic acid bacteria and yeasts in shrimp gastrointestinal tracts were enumerated at higher level (7.07 log CFU/g) in mixed probiotics supplemented group than that in non-supplemented group. The number of pathogenic *Vibrio* sp. (green colony on TCBS agar) in shrimp fed with mixed probiotics were significantly higher ($p<0.05$) than another treatments.

At the end of the feeding trial, mixed probiotic supplemented white shrimps were injected with viable cell suspension of *Vibrio harveyi* at the concentration of $1.91\text{-}2.91\text{x}10^5$ CFU/ml

exhibited the highest ability to reduce *Vibrio harveyi* from haemolymph, compared to the non-supplemented ones *($p<0.05$)*. The shrimps were challenged with *Vibrio harveyi* at the concentration of 1.91-2.91x10^5 CFU/ml by injection and immersion methods. Ten days after the infection, all treatments exhibited no mortality in immersion methods. In injection method, mixed probiotics and *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 treatments exhibited significantly lower in mortality compared to other treatments *($p<0.05$)*. However, mixed probiotic treatment showed lower mortality than others treatments after 10 days, when *Vibrio harveyi* at the level of 1.91-2.91x10^7 CFU/ml were challenged by immersion method. At the end of feeding trial, the probiotic supplemented feeds were replaced by the non-supplemented one. The number of lactic acid bacterias and yeasts in shrimp gastrointestinal tract dropped dramatically after three days of the trial. However, the numbers of lactic acid bacteria and yeasts in shrimp fed with probiotics were higher than those in non-supplemented shrimp.

Lactobacillus plantarum MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 and *Pseudozyma antarctica* TH9 prepared in dry powder by freeze drying in the presence of 20 % skim milk exhibited highest survival of lactic acid bacteria and yeast. Addition of 2 % of zeolite, talcum and calcium carbonate in MRS and YM broth for lactic acid bacteria and yeast cultivation, respectively did not improve survival of all probiotic strains during freeze-drying and storage. Storage of *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 and *Pseudozyma antarctica* TH9 at 4 °C had significantly higer survival than storage at room temperature *($p<0.05$)*. However, storage in vacuum sealed and normal sealed aluminum bags showed no difference in viable cell counts of all probiotic strains.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.ทิพรัตน์ หงภัทรคีรี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้คำแนะนำในการวิจัย การค้นคว้า และการเขียนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.กิจการ ศุภมาตย์ กรรมการที่ปรึกษาร่วมที่ให้คำแนะนำต่าง ๆ ในการทำงานวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอขอบพระคุณ รศ. วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล ประธานกรรมการ และ ผศ.ดร. ภคมน จิตประเสริฐ ที่กรุณาให้คำแนะนำต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณคณะอุตสาหกรรมเกษตร และบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่ให้ทุนสนับสนุนในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และ น้องชาย ที่ให้กำลังใจ และการสนับสนุนด้านการเงินในการศึกษามาโดยตลอด รวมทั้ง พี่ ๆ น้อง ๆ และเจ้าหน้าที่ในคณะอุตสาหกรรมเกษตร ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ และศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ และทุก ๆ ท่านที่มีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ด้วยดี

เลขา ไสลเพชร

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการภาพ	(14)
บทที่	
1. บทนำ	
บทนำต้นเรื่อง	1
บทตรวจเอกสาร	4
2. วัสดุ อุปกรณ์ และ วิธีการ	
กุ้งขาวที่ใช้ในการทดลอง	32
จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ	32
สารเคมี และอาหารเลี้ยงเชื้อ	33
อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง	34
วิธีการวิจัย	34
3. ผล และวิจารณ์ผลการทดลอง	49
4. สรุปผลการทดลอง	109
เอกสารอ้างอิง	112
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	123
ภาคผนวก ข วิธีวิเคราะห์	129
ภาคผนวก ค ผลการทดลอง	136
ประวัติผู้เขียน	158

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	โปรไบโอติกที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	13
2	คุณสมบัติและกลไกการออกฤทธิ์ของโปรไบโอติกเทียบกับสารปฏิชีวนะ	19
3	การกำหนดชุดการทดลองเพื่อใช้ศึกษาผลของสารตัวกลางที่มีผลต่อการรอดชีวิตของ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 ที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง	44
4	การกำหนดชุดการทดลองเพื่อใช้ศึกษาผลของการใช้สารพยุงในการเตรียมเซลล์ต่อการรอดชีวิตของ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 ที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง	45
5	การกำหนดชุดการทดลองเพื่อศึกษาผลของสภาวะ และ อุณหภูมิในการเก็บรักษา *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 ภายใต้การเก็บ 8 สัปดาห์	47
6	น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น, อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ และ อัตราการรอดชีวิตของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9, ชุดของเชื้อผสมทั้ง 3 ชนิด	63
7	เปรียบเทียบกับกุ้งขาวชุดควบคุมที่ได้รับอาหารที่ไม่มีการเติมโปรไบโอติก จำนวนแบคทีเรียแลกติก ยีสต์ และ *Vibrio* sp. ที่พบในทางเดินอาหารกุ้งขาว เมื่อทดสอบ การต้านทานเชื้อ *Vibrio harveyi* ด้วยการแช่ในสารแขวนลอยของเชื้อที่มีความเข้มข้น 4.8-7.61x10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร	76
8	จำนวนแบคทีเรียแลกติก ยีสต์ และ *Vibrio* sp. ที่พบในทางเดินอาหารกุ้งขาว เมื่อทดสอบการต้านทานเชื้อ *Vibrio harveyi* ด้วยการแช่ในสารแขวนลอยของเชื้อที่มีความเข้มข้น 4.8-7.61x10^7 CFU ต่อมิลลิลิตร	80
9	ปริมาณ *Vibrio harveyi* และประสิทธิภาพในการกำจัด *Vibrio harveyi* ออกจากระบบไหลเวียนของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสม *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9, ชุดโปรไบโอติก ผสมทั้ง 3 ชนิด เปรียบเทียบ กับกุ้งขาวชุดควบคุมที่ได้รับอาหารที่ไม่มีการเติมโปรไบโอติก	85

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
10	การเจริญของ *Lactobacillus plantarum* MRO 3.12 ที่ชั่วโมงต่าง ๆ	136
11	การเจริญของ *Candida tropicalis* TH112 ที่ชั่วโมงต่าง ๆ	136
12	การเจริญของ *Pseudozyma antarctica* TH9 ที่ชั่วโมงต่าง ๆ	137
13	การเจริญของ *Vibrio harveyi* ที่ชั่วโมงต่าง ๆ	137
14	ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเลี้ยงเชื้อร่วมกันของ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9 และ *Vibrio harveyi* เปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อเพียงชนิดเดียวของ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9 และ *Vibrio harveyi*	138
15	การเจริญของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9 และ *Vibrio harveyi* ที่เพาะเลี้ยงแบบเชื้อเดี่ยว และเพาะเลี้ยงร่วมกันในอาหารที่เป็นส่วนผสมของ MRS, YM และ TSB broth ในอัตราส่วน 1:1:1 และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีอากาศ	139
16	ปริมาณเชื้อ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH1112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 ในอาหารเลี้ยงกุ้งที่มีเชื้อ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 เพียงอย่างเดียว และอาหารเลี้ยงกุ้งที่ผสมโปรไบโอติกของเชื้อทั้ง 3 ชนิด เมื่อเก็บรักษาไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน	140
17	น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาวก่อนการทดลอง เปรียบเทียบกับกุ้งขาวหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ ด้วยอาหารที่ผสมและไม่ผสมโปรไบโอติก	141
18	ปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Lactobacillus plantalum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9, ชุดของเชื้อผสมทั้ง 3 ชนิด เปรียบเทียบกับกุ้งขาวชุดควบคุมที่ได้รับอาหารที่ไม่มีการเติมโปรไบโอติก	141

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
19	จำนวนแบคทีเรียแลกติก ยีสต์ *Vibrio* sp. และ แบคทีเรียทั้งหมด ในระบบทางเดินอาหารของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสม *Lactobacillus plantalum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9, โปรไบโอติกผสมทั้ง 3 ชนิด และ กุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่ไม่ผสมโปรไบโอติก	142
20	อัตราการตายของกุ้งขาวเมื่อทดสอบการต้านทานเชื้อ *Vibrio harveyi* ที่ความเข้มข้น 4.8-7.61x10^{7} CFU ต่อมิลลิลิตรด้วยการฉีด หลังจากการเลี้ยงด้วยอาหารผสม *Lactobacillus plantalum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9 และชุด โปรไบโอติกผสมทั้ง 3 ชนิด เปรียบเทียบกับกุ้งขาวชุดควบคุมที่ได้รับอาหารที่ไม่ผสมโปรไบโอติก	143
21	อัตราการตายของกุ้งขาวเมื่อทดสอบการต้านทานเชื้อ *Vibrio harveyi* ที่ความเข้มข้น 4.8-7.61x10^{5} CFU ต่อมิลลิลิตรด้วยการฉีด หลังจากการเลี้ยงด้วยอาหารผสม *Lactobacillus plantalum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9 และโปรไบโอติกผสมทั้ง 3 ชนิด เปรียบเทียบกับกุ้งขาวชุดควบคุมที่ได้รับอาหารที่ไม่ผสมโปรไบโอติก	144
22	อัตราการตายของกุ้งขาวเมื่อทดสอบการต้านทานเชื้อ *Vibrio harveyi* ที่ความเข้มข้น 4.8-7.61x10^{7} CFU ต่อมิลลิลิตร ด้วยการแช่ หลังจากการเลี้ยงด้วยอาหารผสม *Lactobacillus plantalum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9 และ โปรไบโอติกผสมทั้ง 3 ชนิดเปรียบเทียบกับกุ้งขาวชุดควบคุมที่ได้รับอาหารที่ไม่มีการเติมโปรไบโอติก	145
23	การคงอยู่ของแบคทีเรียแลกติก และ ยีสต์ ในระบบทางเดินอาหารของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสม *Lactobacillus plantalum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9, โปรไบโอติกผสมทั้ง 3 ชนิด และ กุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่ไม่ผสมโปรไบโอติกเมื่อเปลี่ยนเป็นอาหารเม็ดธรรมดาที่ไม่ผสมโปรไบโอติกเป็นเวลา 0, 1, 3 และ 7 วัน	146

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
24	ผลของการใช้สารตัวกลางต่อการรอดชีวิตของ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 จากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง	147
25	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งโดยใช้ นมผงพร่องมันเนย 20 เปอร์เซ็นต์เป็นสารตัวกลางในการป้องกันเซลล์ของ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 ที่เจริญในอาหารที่มีสารพยุงชนิดต่าง ๆ	148
26	ปริมาณ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 ที่เจริญในอาหารที่มีซีโอไลท์เป็นสารพยุง และไม่มีสารพยุง จากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งโดยมีนมผงพร่องมันเนย 20 เปอร์เซ็นต์เป็นสารตัวกลาง และ การเก็บรักษาที่สภาวะต่าง ๆ	149
27	ปริมาณเชื้อที่ลดลงของ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 ที่เจริญในอาหารที่มีซีโอไลท์เป็นสารพยุง และไม่มีสารพยุง จากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งโดยมีนมผงพร่องมันเนย 20 เปอร์เซ็นต์เป็นสารตัวกลาง และการเก็บรักษาที่สภาวะต่าง ๆ	150
28	ปริมาณความชื้นของ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 ในอาหารที่มีซีโอไลท์เป็นสารพยุง และไม่มีสารพยุง จากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งโดยมีนมผงพร่องมันเนย 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารตัวกลาง และ การเก็บรักษาที่สภาวะต่าง ๆ ที่ 8 สัปดาห์	151
29	ปริมาณ *Candida tropicalis* TH112 ที่เจริญในอาหารที่มีทัลคัมเป็นสารพยุง และไม่มีสารพยุงจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งโดยมีนมผงพร่องมันเนย 20 เปอร์เซ็นต์เป็นสารตัวกลาง และ การเก็บรักษาที่สภาวะต่าง ๆ	152
30	ปริมาณเชื้อที่ลดลงของ *Candida tropicalis* TH112 ที่เจริญในอาหารที่มีทัลคัมเป็นสารพยุง และไม่มีสารพยุง จากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งโดยมีนมผงพร่องมันเนย 20 เปอร์เซ็นต์เป็นสารตัวกลาง และ การเก็บรักษาที่สภาวะต่าง ๆ	153

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
31	ปริมาณความชื้นของ *Candida tropicalis* TH112 ในอาหารที่มีทัลคัมเป็นสารพยุง และไม่มีสารพยุง จากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งโดยมีนมผงพร่องมันเนย 20 เปอร์เซ็นต์เป็นสารตัวกลาง และ การเก็บรักษาที่สภาวะต่าง ๆ ที่ 8 สัปดาห์	154
32	ปริมาณ *Pseudozyma antarctica* TH9 ที่เจริญในอาหารที่มีซีโอไลท์เป็นสารพยุง และไม่มีสารพยุงจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งโดยมีนมผงพร่องมันเนย 20 เปอร์เซ็นต์เป็นสารตัวกลาง และการเก็บรักษาที่สภาวะต่าง ๆ	155
33	ปริมาณเชื้อที่ลดลงของ *Pseudozyma antarctica* TH9 ที่เจริญในอาหารที่มีซีโอไลท์เป็นสารพยุง และไม่มีสารพยุง จากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งโดยมีนมผงพร่องมันเนย 20 เปอร์เซ็นต์เป็นสารตัวกลาง และการเก็บรักษาที่สภาวะต่าง ๆ	156
34	ปริมาณความชื้นของ *Pseudozyma antarctica* TH112 ในอาหารที่มีซีโอไลท์เป็นสารพยุง และไม่มีสารพยุง จากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งโดยมีนมผงพร่องมันเนย 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารตัวกลาง และ การเก็บรักษาที่สภาวะต่าง ๆ ที่ 8 สัปดาห์	157

รายการภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะภายนอกของกุ้งขาว	5
2	การทำงานของระบบโปรฟีนอลออกซิเดสแอคทิเวทติงซีสเตมในกุ้ง	8
3	ลักษณะของโคโลนี *Vibrio harveyi* ที่มีการเจริญบนอาหาร NA agar ซึ่งส่องดูในที่มีแสง (A) และในที่มืด (B)	10
4	ลักษณะของยีสต์ *Canida tropicalis* TH112 (A) และ *Pseudozyma antarctica* TH9 (B) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า	23
5	แผนภูมิสถานะของน้ำบริสุทธิ์	26
6	การเจริญของ *Vibrio harveyi* (A) และ ค่าพีเอช (B) เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มี การเติม *Vibrio harveyi* เพียงชนิดเดียวในอาหารที่เป็นส่วนผสมของ MRS, YM และ TSB broth ในอัตราส่วน 1:1:1 และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีอากาศ	53
7	การเจริญของ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 (A), *Candida tropicalis* TH112 (B) และ *Pseudozyma antarctica* TH9 (C) ในชุดที่มีการเพาะเลี้ยงร่วมกันระหว่าง *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9 และ *Vibrio harveyi* เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีการเติม *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 เพียงชนิดเดียวในอาหารที่เป็นส่วนผสมของ MRS, YM และ TSB broth ในอัตราส่วน 1:1:1 และบ่มไว้ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีอากาศ	54
8	ลักษณะของ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 บนอาหาร YM agar ที่มีคลอแรมฟีนิคอล 0.001 เปอร์เซ็นต์ (A), TCBS agar (B) และ MRS agar ที่มี bromocresol purple 0.02 เปอร์เซ็นต์ (C)	55
9	ลักษณะของ *Candida tropicalis* TH112 บนอาหาร YM agar ที่มีคลอแรมฟีนิคอล 0.001 เปอร์เซ็นต์ (A), TCBS agar (B) และ MRS agar ที่มี bromocresol purple 0.02 เปอร์เซ็นต์ (C)	55

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
10	ลักษณะของ *Pseudozyma antarctica* TH9 บนอาหาร YM agar ที่มีคลอแรมฟีนิคอล 0.001 เปอร์เซ็นต์ (A), TCBS agar (B) และ MRS agar ที่มี bromocresol purple 0.02 เปอร์เซ็นต์ (C)	56
11	ลักษณะของ *Vibrio harveyi* บนอาหาร YM agar ที่มีคลอแรมฟีนิคอล 0.001 เปอร์เซ็นต์ (A), TCBS agar (B) และ MRS agar ที่มี bromocresol purple 0.02 เปอร์เซ็นต์ (C)	56
12	ปริมาณเชื้อ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 ในอาหารเลี้ยงกุ้งที่มีเชื้อ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 เพียงอย่างเดียว และอาหารเลี้ยงกุ้งที่ผสมโปรไบโอติกของเชื้อทั้ง 3 ชนิด เมื่อเก็บรักษาไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน	59
13	น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาวก่อนการทดลอง เปรียบเทียบกับกุ้งขาวหลังการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารที่ผสม และไม่ผสมโปรไบโอติก	60
14	ปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9, ชุดของเชื้อผสมทั้ง 3 ชนิด เปรียบเทียบกับกุ้งขาวชุดควบคุมที่ได้รับอาหารที่ไม่มีการเติมโปรไบโอติก ที่ระยะเวลาการเลี้ยงที่ 6 สัปดาห์	66
15	จำนวนแบคทีเรียแลกติก, ยีสต์, *Vibrio* sp. และ แบคทีเรียทั้งหมดในระบบทางเดินอาหารของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสม *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9, โปรไบโอติกผสมทั้ง 3 ชนิด และ กุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่ไม่ผสมโปรไบโอติก เปรียบเทียบกับกุ้งขาวชุดก่อนได้รับอาหารที่มีโปรไบโอติก	67
16	อัตราการตายของกุ้งขาวเมื่อฉีด *Vibrio harveyi* ที่ความเข้มข้น 4.8-7.61x10^7 CFU ต่อมิลลิลิตรหลังจากการเลี้ยงด้วย อาหารผสม *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9 และชุดโปรไบโอติกผสมทั้ง 3 ชนิดเปรียบเทียบกับกุ้งขาว ชุดควบคุมที่ได้รับอาหารที่ไม่ผสมโปรไบโอติก	72

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
17	อัตราการตายของกุ้งขาวเมื่อฉีด *Vibrio harveyi* ที่ความเข้มข้น 4.8-7.61x10^5 CFU ต่อ มิลลิลิตร หลังจากการเลี้ยงด้วยอาหารผสม *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9 และโปรไบโอติกผสมทั้ง 3 ชนิด เปรียบเทียบกับกุ้งขาวชุดควบคุมที่ได้รับอาหารที่ไม่ผสมโปรไบโอติก	73
18	อัตราการตายของกุ้งขาวเมื่อแช่ในน้ำทะเลที่มี *Vibrio harveyi* 4.8-7.61x10^7 CFU ต่อ มิลลิลิตร หลังจากการเลี้ยงด้วย อาหารผสม *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9 และ โปรไบโอติกผสมทั้ง 3 ชนิด เปรียบเทียบกับกุ้งขาวชุดควบคุมที่ได้รับอาหารที่ไม่ผสมโปรไบโอติก	77
19	การคงอยู่ของแบคทีเรียแลกติกในระบบทางเดินอาหารของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสม *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9, โปรไบโอติกผสมทั้ง 3 ชนิด เป็นเวลา 6 สัปดาห์ และเปลี่ยนเป็นปกติที่ไม่ผสมโปรไบโอติกเป็นเวลา 0, 1, 3 และ 7 วัน	87
20	การคงอยู่ของยีสต์ในระบบทางเดินอาหารของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสม *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9, โปรไบโอติกทั้ง 3 ชนิด เป็นเวลา 6 สัปดาห์ แล้วหยุดให้ และเปลี่ยนเป็นอาหารเม็ดธรรมดาที่ไม่ผสมโปรไบโอติกเป็นเวลา 0, 1, 3 และ7 วัน	89
21	ผลของการใช้สารตัวกลางต่อการรอดชีวิตของ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 จากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง	94
22	ผลของการใช้สารตัวกลางต่อการรอดชีวิตของ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 จากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง	96

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
23	จำนวนเชื้อที่รอดชีวิต และปริมาณความชื้นก่อน และหลังการทำแห้ง และ การเก็บรักษาในถุงภายใต้สภาวะสุญญากาศ และ บรรยากาศปกติ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ อุณหภูมิห้อง ของ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 ที่เจริญในอาหารที่มีซีโอไลท์เป็นตัวพยุง (A) และไม่มีตัวพยุง (B)	99
24	จำนวนเชื้อที่รอดชีวิต และปริมาณความชื้นก่อน และหลังการทำแห้ง และ การเก็บรักษาในถุงภายใต้สภาวะสุญญากาศ และ บรรยากาศปกติ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ อุณหภูมิห้อง ของ *Candida tropicalis* TH112 ที่เจริญในอาหารที่มีทัลคัมเป็นตัวพยุง (A) และไม่มีตัวพยุง (B)	102
25	จำนวนเชื้อที่รอดชีวิต และปริมาณความชื้นก่อน และหลังการทำแห้ง และ การเก็บรักษาในถุงภายใต้สภาวะสุญญากาศ และ บรรยากาศปกติ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ อุณหภูมิห้อง ของ *Pseudozyma antarctica* TH9 ที่เจริญในอาหารที่มีซีโอไลท์เป็นตัวพยุง (A) และไม่มีตัวพยุง (B)	105
26	ลักษณะของ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 บนอาหาร MRS agar ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็น และ bromocresol purple 0.02 เปอร์เซ็นต์	130
27	ลักษณะของ *Pseudozyma antarctica* TH9 (A) และ *Candida tropicalis* TH112 (B) บนอาหาร YM agar ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ และคลอแรมฟีนิคอล 0.001 เปอร์เซ็นต์	131
28	ลักษณะของ *Vibrio harveyi* บนอาหาร TCBS agar ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์	132

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

อาหารทะเล เช่น กุ้ง ปลา ปลาหมึก และหอย เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าการส่งออกที่สำคัญของประเทศไทย โดยเฉพาะกุ้งทะเลเป็นสัตว์น้ำที่นำรายได้เข้าสู่ประเทศเป็นจำนวนมากต่อปี จากรายงานด้านเศรษฐกิจของธนาคารกรุงไทย พบว่า ในแต่ละปีมีมูลค่าการส่งออกกุ้งเพิ่มขึ้น และคิดเป็นสัดส่วนร้อยละ 2 ของปริมาณผลิตภัณฑ์รวมทั้งประเทศ (ยุพินท์ วิวัฒนชัยเศรษฐ์, 2543) และในปี พ.ศ. 2548 มีปริมาณกุ้งขาวที่เลี้ยงเพิ่มขึ้นโดยมีสัดส่วนร้อยละ 90-95 ของปริมาณที่เพาะเลี้ยงทั้งหมด จากรายงานของ ไพบูรณ์ ฟูวัฒนศิลป์ (2549) พบว่าในปี พ.ศ. 2548 มีผลผลิตของการเพาะเลี้ยงกุ้ง 360 พันตันคิดเป็นมูลค่าการส่งออก 71,460 ล้านบาท จากการที่มีความนิยมในการบริโภคมากขึ้นนี้เอง ทำให้เกษตรกรหันมาให้ความสนใจการเลี้ยงกุ้งกันมาก แต่จะเน้นในด้านปริมาณการผลิต โดยจะเพาะเลี้ยงในฟาร์มแบบหนาแน่นเพื่อให้คุ้มค่าในการผลิต จึงส่งผลให้เกิดปัญหาทางด้านคุณภาพน้ำ และเกิดโรคระบาด เกษตรกรจึงใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะในการกำจัดปัญหาดังกล่าว จึงทำให้ตลาดการค้ากุ้งประสบปัญหาสารเคมีตกค้าง จากรายงานพบว่าหลังจากการหยุดให้ยาปฏิชีวนะในกุ้งแล้ว 4-7 วันมีกุ้งกุลาดำร้อยละ 4.3 มีการตรวจพบว่ามีสารเคมีตกค้าง (รัชฎา ขาวหนูนา, 2539) และจากรายงานของกรมประมงพบว่าในปี พ.ศ. 2536 กุ้งไทยที่ส่งไปขายในต่างประเทศถูกส่งกลับเพราะตรวจพบยาปฏิชีวนะ Oxytetracycline และ Oxolinic ตกค้างอยู่ในกุ้ง โดยตรวจพบ 23 เปอร์เซ็นต์ ของตัวอย่างที่สุ่มตรวจ (ลิลา เรืองแป้น, 2545) เมื่อต้นปี พ.ศ.2544 สำนักงานส่งเสริมการค้าในต่างประเทศ ณ กรุงเวียนนาได้ประกาศเลิกวางจำหน่ายกุ้งจากประเทศไทยเนื่องจากตรวจพบยาคลอแลมฟีนิคอลปนเปื้อนอยู่ (ลิลา เรืองแป้น, 2545)

เหตุผลหลักที่เกษตรกรนำสารเคมีและยาปฏิชีวนะมาใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้งเพื่อป้องกันและรักษาการเกิดโรคระบาดในกุ้ง เช่น โรคหัวเหลือง โรคตัวแดงดวงขาว ซึ่งโรคติดเชื้อส่วนใหญ่จะเกิดจากแบคทีเรียในกลุ่มวิบริโอ โดยเฉพาะ *Vibrio harveyi* ที่ก่อให้เกิดโรคเรืองแสงทำให้กุ้งมีอัตราการตายสูง และจากการใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะทำให้เกิดการปนเปื้อนของสารเคมีต่าง ๆ ไปสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ นอกจากนั้นแล้วยาปฏิชีวนะยังส่งผลโดยตรงต่อผู้บริโภค การใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะเป็นจำนวนมากอย่างต่อเนื่องจะทำให้กุ้งเกิดการดื้อยา จำเป็นจะต้องเปลี่ยนการใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะหรือเพิ่มปริมาณการใช้ให้เข้มข้นขึ้น (ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์, 2539)

ผลิตภัณฑ์ชีวภาพที่สามารถนำมาทดแทนการใช้สารเคมีได้เช่นสารเสริมชีวภาพหรือโปรไบโอติกที่ผลิตจากแบคทีเรียแลกติกและยีสต์ ซึ่งสามารถนำมาใช้ปรับสมดุลในระบบทางเดินอาหารของกุ้งไม่ให้จุลินทรีย์ที่ก่อโรคเข้ามาเจริญเติบโต หรืออาจมีผลต่อการปรับสมดุลของคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยง โดยการเลี้ยงแบบธรรมชาติเดิมหรือเลี้ยงบางมาก จุลินทรีย์ที่มีอยู่ในน้ำและพื้นบ่อก็จะมีหน้าที่ในการย่อยสลายของเสียจากกุ้งและอินทรีย์สารอื่น ๆ แต่ถ้าหากมีการเลี้ยงแบบพัฒนาในสภาพที่เรียกว่า intensive rearing กล่าวคือ เลี้ยงแบบหนาแน่น และให้อาหารกินเต็มที่ ดังนั้นในบางสภาวะที่อากาศแปรปรวน หรือกุ้งอยู่ในสภาวะเครียดจากสาเหตุใดก็ตาม อาหารที่กุ้งกินไม่หมดก็จะเกิดการเน่าเสียจากจุลินทรีย์หลาย ๆ ชนิด ทำให้เกิดการแย่งใช้ออกซิเจนทำให้ออกซิเจนลดลง ปัญหาที่ตามมา คือ เกิดการสะสมของผลิตภัณฑ์จากกระบวนการสันดาปของจุลินทรีย์ในสภาวะไร้อากาศ ซึ่งเป็นพวกก๊าซพิษได้แก่ ก๊าซไข่เน่า(ไฮโดรเจนซัลไฟด์) ก๊าซแอมโมเนีย ก๊าซมีเธน และก๊าซอื่น ๆ อีก (เกรียงศักดิ์ พูลสุข, 2545) ซึ่งมีรายงานว่าก๊าซพิษ จากการย่อยสลายสิ่งปฏิกูลมูลสัตว์จะส่งผลกระทบอย่างรุนแรงต่อการเจริญและการอยู่รอดของกุ้ง (Jacques and Bastin, 1989) ดังนั้นการศึกษาและพัฒนาผลิตภัณฑ์ชีวภาพมาใช้แทนยาปฏิชีวนะเป็นวิธีการหนึ่งเพื่อแก้ปัญหาด้านโรคระบาดและปรับปรุงคุณภาพน้ำในระหว่างการเพาะเลี้ยงกุ้ง โดยส่วนใหญ่แล้วผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายจะมีส่วนประกอบของเอนไซม์และจุลินทรีย์ที่เป็นสารเสริมชีวภาพ หรือที่เรียกว่าผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก

แบคทีเรียที่ใช้เป็นโปรไบโอติกในสัตว์น้ำมีหลายชนิดเช่น แบคทีเรียแลกติก (Ajitha *et al.*, 2004; Chiu *et al.*, 2007), *Bacillus sp.* (Vaseeharan and Ramasamy, 2003; Ochoa-Solano and Olmos-Soto, 2006), ยีสต์ (Scholz *et al.*, 1999; Suphantharika *et al.*, 2003) และแบคทีเรียแกรมลบบางชนิด เช่น *Aeromonas hydrophila, Vibrio alginolyticus* และ *Vibrio fluvialis* (Ruiz-Ponte *et al.*,1999; Gram *et al.*, 1999) โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียแลกติกและยีสต์ซึ่งได้รับความสนใจในการนำมาศึกษาเนื่องจากแบคทีเรียแลกติกมีความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์กลุ่มอื่น ๆ เช่น แบคเทอริโอซิน ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ กรดแลกติก เป็นต้น (Balcazar *et al.*, 2006) และนอกจากนั้นแบคทีเรียแลกติกยังสามารถปรับตัวเพื่อเจริญในสภาวะแวดล้อมของทางเดินอาหารได้ดีดังนั้นจึงสามารถเจริญและครอบครองพื้นที่ในระบบทางเดินอาหารเพื่อกันไม่ให้จุลินทรีย์ก่อโรคเข้ามาเจริญเติบโต (สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์, 2538) ส่วนยีสต์จะเป็นแหล่งของโปรตีน วิตามิน และนอกจากนั้นในส่วนของกลูแคนที่ได้จากเซลล์ยีสต์ยังมีความสามารถในการกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันของกุ้งได้ (Chang *et al.*, 2003 and Sajeevan *et al.*, 2006) อย่างไรก็ตามการศึกษาใช้แบคทีเรียแลกติกร่วมกับยีสต์เพื่อช่วยส่งเสริมการเจริญของกุ้งขาวและยับยั้งการเกิดโรคในกุ้งขาวยังมีอยู่น้อย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาการใช้แบคทีเรียแลกติกที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ร่วมกับยีสต์ที่สามารถเสริมภูมิคุ้มกันโรคในกุ้ง และจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลาย

โปรตีน ไขมัน และแป้งได้ เพื่อช่วยส่งเสริมให้กุ้งขาวมีอัตรารอดที่สูงขึ้น และพัฒนารูปแบบของเชื้อผสมในรูปหัวเชื้อรูปแบบผงเพื่อความสะดวกในการเก็บรักษาและการใช้งานของเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้ง รวมถึงการศึกษาอายุการเก็บ และสภาวะการเก็บรักษาหัวเชื้อที่เหมาะสม

บทตรวจเอกสาร

1. กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*)

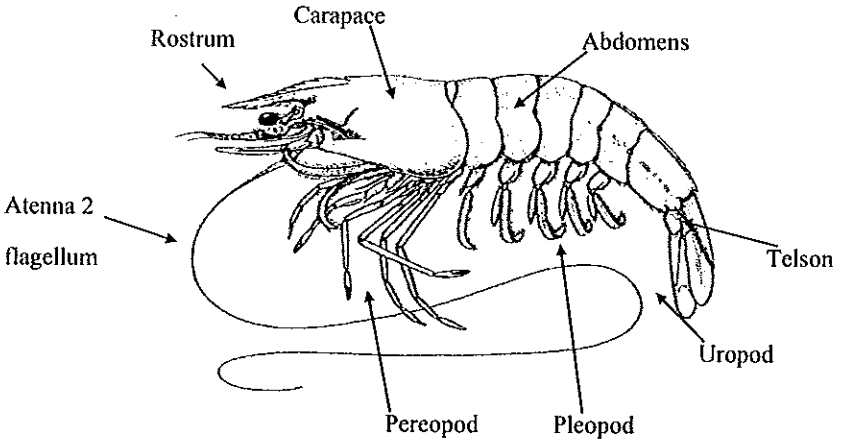
กุ้งขาวมีชื่อวิทยาศาตร์ว่า *Penaeus vannamei, Litopenaeus vannamei* และมีชื่อสามัญว่า กุ้งขาว, White leg shrimp, Pacific white shrimp, West coast white shrimp, Camaron blanco, Camaron patiblanco และ Langostino โดยกุ้งขาวเป็นกุ้งสายพันธุ์หลักของทวีปอเมริกา พบได้ตั้งแต่ชายฝั่งประเทศเม็กซิโกถึงเปรู ซึ่งเป็นเขตที่มีอุณหภูมิของน้ำทะเลประมาณ 26-28 องศาเซลเซียส และมีความเค็มประมาณ 35 พีพีที

1.1 ลักษณะทั่วไป การเจริญ และการลอกคราบ

กุ้งขาวจะมีลักษณะทั่วไปดังนี้คือ ลำตัวสีขาวมี 8 ปล้อง ส่วนหัวมี 1 ปล้อง และมีกรี (rostrum) อยู่ในระดับยาวประมาณ 0.8 เท่า ของความยาวเปลือกโดยกรีจะมีลักษณะตรงไม่งอน ไม่ยาวเลยแผงใต้ปาก หัวสันกรี (carapace) สูงลักษณะเป็นสามเหลี่ยมสีแดงอมน้ำตาล มีฟันด้านบน 5-8 ซี่ ฟันด้านล่าง 2-4 ซี่ ร่องบนกรีมองเห็นได้ชัด เปลือกหัวสีขาวอมชมพู หน้าอกใหญ่ มีหนวด (antennae) ยาวสีแดง 2 เส้น ตาสีแดงเข้ม ส่วนท้อง (abdomen) มี 6 ปล้อง เปลือกบางสีขาวอมชมพูถึงแดง ขาเดิน (pereopods) มี 5 คู่ สีขาวเป็นลักษณะที่โดดเด่น ขาว่ายน้ำ (pleopods) มี 5 คู่ สีขาวด้านในมีปลายสีแดง ส่วนหาง (telson) มี 1 ปล้อง ปลายหางสีแดงเข้ม แพนหาง (uropods) มี 4 แผ่น รูปร่างลักษณะของกุ้งขาวดังแสดงในภาพที่ 1 (กรุงไทย, 2005)

กุ้งขาวจะหากินทุกระดับความลึกของน้ำและลอกคราบเร็วทุก ๆ สัปดาห์ มีขนาดตัวเมื่อโตสมบูรณ์เต็มที่เล็กกว่ากุ้งกุลาดำ โดยทั่วไปแล้วกุ้งขาวจะมีความยาวลำตัวประมาณ 25 เซนติเมตร ซึ่งอัตราการเจริญของกุ้งขาวจะขึ้นอยู่กับปัจจัยหลัก ๆ 2 ปัจจัย คือ ความถี่ในการลอกคราบและขนาดที่เพิ่มขึ้นของกุ้ง โดยสภาพแวดล้อม สารอาหารและความเครียดจะส่งผลต่อความถี่ในการลอกคราบและการเจริญของกุ้งขาว เช่น อุณหภูมิที่สูงขึ้นจะมีผลให้ความถี่ในการลอกคราบเพิ่มขึ้น และมีผลต่อการเจริญของกุ้งขาว เพราะกุ้งขาวจะตายถ้าอยู่ในน้ำที่มีอุณหภูมิต่ำกว่า 15 องศาเซลเซียส หรือสูงกว่า 33 องศาเซลเซียส เป็นเวลานานกว่า 24 ชั่วโมง โดยช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 22-30 องศาเซลเซียส นอกจากนั้นปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำก็มีผลเช่นกัน โดย ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำที่ระดับต่ำกว่า 5-7 มิลลิกรัมต่อลิตรจะมีผลให้การลอกคราบลดลง ในขณะที่มีการลอกคราบประสิทธิภาพในการดูดซึมออกซิเจนของกุ้งจะลดต่ำลงและอาจทำให้กุ้งตายได้ง่ายเนื่องจากการขาดออกซิเจน ดังนั้นในช่วงการลอกคราบจึงเป็นช่วงที่อันตรายที่สุดของกุ้งเพราะกุ้งจะอ่อนแอและช่วยเหลือตัวเองไม่ได้ โดยในระยะนี้กุ้งจะต้องการออกซิเจนและพลังงานในปริมาณที่สูง ดังนั้น

กุ้งที่ลอกคราบมักจะหลบเข้าแนวเลน ความเค็มก็มีผลต่อการเจริญเช่นกันถึงแม้ว่ากุ้งชนิดนี้จะสามารถทนต่อการเปลี่ยนแปลงความเค็มได้ในระดับกว้างตั้งแต่ 2-40 พีพีที แต่จะโตได้เร็วในที่ระดับความเค็ม 33 พีพีทีซึ่งใกล้เคียงกับความเค็มของน้ำทะเล (ชะลอ ลิ้มสุวรรณ, 2546)



ภาพที่ 1 ลักษณะภายนอกของกุ้งขาว

Figure 1 General external anatomy of *Litopenaeus vannamei*

ที่มา : กรุงไทย (2005)

1.2 ระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียน

สัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียน หมายถึง สัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลังและมีเปลือกภายนอกแข็ง มีลักษณะที่สำคัญทางด้านการอนุกรมวิธานคือ มีขาเดิน 5 คู่หรือ 10 ขา อาศัยอยู่ในบริเวณน้ำจืดและน้ำเค็ม เช่น กุ้ง ปู และกั้ง พวกครัสเตเชียนมีระบบป้องกันตัวที่มีประสิทธิภาพ เพื่อไม่ให้สิ่งมีชีวิตที่ทำให้เกิดโรคเข้ามาบุกรุกทำลายอวัยวะต่าง ๆ ของร่างกาย ถึงแม้ว่าสัตว์ในกลุ่มนี้จะมีโครงสร้างภายนอกที่แข็งและมีคุณสมบัติพิเศษทางด้านเคมี ซึ่งเป็นตัวขวางกั้นในการเข้าทำลายของเชื้อโรค แต่ระบบภูมิคุ้มกันยังมีความจำเป็นอย่างมากในการกำจัดเชื้อโรคประเภทที่ฉวยโอกาส (opportunistic microorganisms) เข้าไปในร่างกายของสัตว์ในขณะที่เกิดบาดแผลหรือในช่วงที่มีการลอกคราบ ซึ่งระบบการป้องกันตัวของสัตว์กลุ่มนี้อาศัยเซลล์หลักในการทำงานคือ เซลล์เม็ดเลือด (hemocytes) ทำหน้าที่กำจัดเซลล์สิ่งแปลกปลอมออกจากร่างกายโดยกระบวนการกลืนทำลายหรือฟาโกไซโตซิส (phagocytosis) และกระบวนการกักล้อม (encapsulation) ส่วนกระบวนการอื่นๆ ที่มีความสำคัญในระบบป้องกันตัวคือ กระบวนการปิดบาดแผลอย่างรวดเร็วเพื่อป้องกันไม่ให้สูญเสียสารต่าง ๆ ในเม็ดเลือดและป้องกันไม่ให้จุลชีพจากภายนอกเข้าสู่บาดแผล (Ford *et al.*, 1993)

การจำแนกชนิดของเม็ดเลือดกุ้ง (hemocyte types) สามารถแบ่งออกได้ 3 ชนิดใหญ่ ๆ ดังนี้คือ อะแกรนูโลไซท์ (agranulocyte) หรือไฮอาลินเซลล์ (hyaline cell) เซมิแกรนูลาฮีโมไซท์ (semigranular hemocyte) และแกรนูโลไซท์ (granulocyte) ตามรายละเอียดดังนี้

1. อะแกรนูโลไซท์หรือไฮอาลินเซลล์ เป็นกลุ่มเม็ดเลือดที่มีแกรนูลน้อยมากหรือไม่มีแกรนูลเลยในไซโตพลาสซึม เซลล์ชนิดนี้สามารถกลืนกินทำลายสิ่งแปลกปลอมในร่างกายของกุ้งได้โดยกระบวนการฟาโกไซโตซิส (Johensson and Soderhall, 1989)

2. เซมิแกรนูลาร์ ฮีโมไซท์ เซลล์เม็ดเลือดกลุ่มนี้ประกอบด้วยแกรนูลรูปร่างหลายแบบคือ รูปร่างกลม รูปไข่ และรูปกระสวย เซลล์ชนิดนี้จะทำหน้าที่ในการจำและตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายโดยการย่อยสารที่อยู่ในแกรนูลและจับตัวกับสิ่งแปลกปลอม (Soderhall and Ceranius, 1992) โดยเข้าทำปฏิกิริยากับสารโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อโรค เช่น สารไลโปโพลีแซคคาไรด์ และเบต้า–1,3–กลูแคน โดยปล่อยสารที่อยู่ในแกรนูลและชักนำให้เกิดกระบวนการกักล้อม (encapsulation) (Johensson and Soderhall, 1989)

3. แกรนูโลไซท์ เป็นกลุ่มเม็ดเลือดที่มีแกรนูลขนาดใหญ่บางครั้งเรียกว่าลาร์จแกรนูลาร์ฮีโมไซท์ (large granularhemocyte) มีหน้าที่หลักในปฏิกิริยาโปรฟีนอลออกซิเดสแอคทิเวทติ้งซิสเต็ม (Johensson and Soderhall, 1989)

โดยธรรมชาติของกุ้งจะมีกระบวนการในการป้องกันหรือตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอม เช่น เชื้อที่ก่อให้เกิดโรคต่าง ๆ ที่เข้าสู่ตัวกุ้ง เช่นเดียวกับสิ่งมีชีวิตอื่น โดยกระบวนการดังกล่าวจะช่วยป้องกันไม่ให้สิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อโรคไปมีผลต่อการเกิดโรคในตัวของกุ้ง ซึ่งกระบวนการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ตัวกุ้งมีดังนี้

1. กระบวนการกลืนทำลายหรือฟาโกไซโตซิส (phagocytosis) เป็นกระบวนการที่สำคัญที่สุดอย่างหนึ่งของระบบภูมิคุ้มกันเพื่อป้องกันไม่ให้เชื้อโรคเข้าสู่ร่างกายได้ง่าย โดยกระบวนการกลืนทำลายมีขั้นตอนต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นดังนี้ (สุทธิพันธ์ และคณะ, 2537 อ้างโดย จิตรวี เชยชม, 2548)

1.1 Adhesion คือ การที่สิ่งแปลกปลอมหรือจุลชีพ และฟาโกไซต์เข้ามาประชิดกันเป็นขั้นตอนแรกก่อนที่สิ่งแปลกปลอมจะถูกกลืนเข้าสู่ไซโตพลาสซึมของเซลล์ฟาโกไซต์ และถูกทำลายต่อไป โดยขั้นตอนนี้อาจเกิดขึ้นได้เอง หรืออาจจะอาศัยความช่วยเหลือของออพโซนิน (opsonin) ซึ่งมีบทบาทต่อฟาโกไซโตซิส โดยจะทำหน้าที่เชื่อมโยงสิ่งแปลกปลอมหรือจุลชีพกับฟาโกไซต์ ตรงผิวของฟาโกไซต์ และทำให้เกิด adhesion และ ingestion ต่อไป

1.2 Ingestion เมื่อฟาโกไซต์สัมผัสกับสิ่งแปลกปลอม จะเกิด pseudopod ซึ่งจะยื่นออกไปเพื่อโอบล้อมสิ่งแปลกปลอม แล้วปลาย pseudopod ทั้งสองข้างที่ยื่นออกไปจะมาประสานกันเกิดเป็นถุงที่ภายในมีสิ่งแปลกปลอมอยู่ และถุงนี้จะถูกเรียกว่าฟาโกโซม (phagosome)

1.3 Degranulation เมื่อมีฟาโกโซมเกิดขึ้นในไซโตพลาสซึมแล้ว ไลโซโซม (lysosome) หรือ แกรนูล (granule) ของฟาโกไซต์จะเคลื่อนมาอยู่รอบ ๆ ฟาโกโซม แล้วมีการเชื่อมต่อระหว่างฟาโกโซม และไลโซโซมเหล่านั้นจะกลายเป็นฟาโกไลโซโซม (phagolysosome)

1.4 Intracellular killing จุลชีพหรือสิ่งแปลกปลอมภายในฟาโกโซม และฟาโกไลโซโซมจะถูกทำลายโดยกลไก 2 จำพวก คือ oxidative mechanism ซึ่งเป็นกลไกที่ใช้ออกซิเจน และ non oxidative mechanism ซึ่งเป็นกลไกที่ไม่ใช้ออกซิเจน สำหรับกลไกที่ใช้ออกซิเจนนั้น พบว่าเมื่อเยื่อหุ้มเซลล์ของฟาโกไซต์ได้สัมผัสกับสิ่งแปลกปลอมหรือจุลินทรีย์ (ในระยะ adhesion) จะมีการเปลี่ยนแปลงใน oxidative mechanism ของเซลล์เป็นอย่างมาก การเปลี่ยนแปลงนี้เรียกว่า เรสไปราโทรีเบิร์สท์ (respiratory burst) ซึ่งประกอบไปด้วย การใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้น การเพิ่มขึ้นของกลูโคสออกซิเดชั่น (glucose oxidation) การสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพิ่มขึ้น การสร้างซุปเปอร์ออกไซด์แอนอิออน

2. การเกิดกลุ่มเซลล์ที่รวมตัวกันรอบสิ่งแปลกปลอมหรือโนดูลฟอร์เมชั่น (nodule formation) กระบวนการสร้างโนดูลจะเกิดขึ้นก็ต่อเมื่อมีจุลชีพจำนวนมากเข้าสู่ร่างกาย ในขณะที่การกลืนทำลายไม่สามารถที่จะกำจัดจุลชีพนั้นได้หมด ซึ่งกระบวนการดังกล่าวเกิดขึ้น โดยเซลล์เกิดการรวมตัวกันรอบสิ่งแปลกปลอมแล้วเข้าทำลายเซลล์ของสิ่งแปลกปลอม ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังรวมถึงกลุ่มครัสเตเชียนจะพบกระบวนการดังกล่าวนี้เกิดขึ้น โดยเมื่อเกิดกระบวนการจุลชีพจะติดอยู่ที่บริเวณผิวชั้นต่าง ๆ ของเม็ดเลือด และเมื่อกระบวนการเกิดสีดำ (melanine) ของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในตัวกุ้ง ส่งผลให้จุลชีพถูกกำจัดออกไปจากระบบหมุนเวียนเลือด และจะพบว่าโนดูลฟอร์เมชั่นมักจะเกิดขึ้นบริเวณเหงือก (gill) หรือตับอ่อน (hepatopancreatic tubules) ซึ่งเป็นบริเวณหลักที่เชื้อโรคเข้าไปอาศัยอยู่ (Smith and Ratcliffe, 1980)

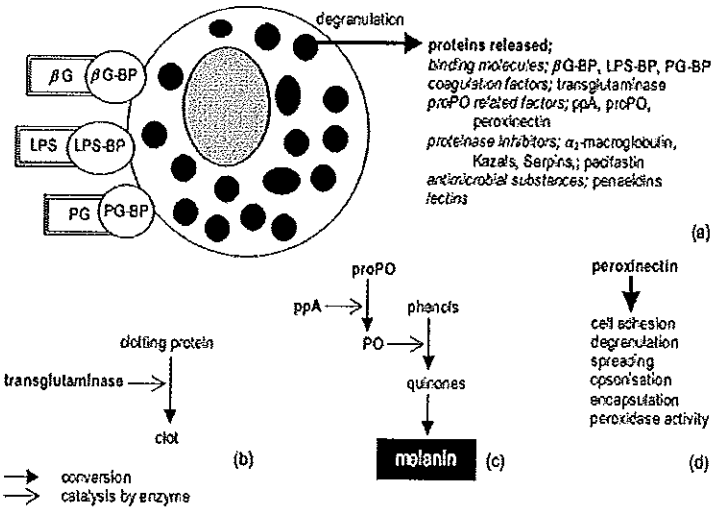
3. กระบวนการกักล้อม (encapsulation) เมื่อมีสิ่งแปลกปลอมที่มีขนาดใหญ่ เช่น ปรสิตที่บุกรุกเข้ามา ซึ่งกระบวนการฟาโกไซโตซิสไม่สามารถที่จะยับยั้งได้อย่างมีประสิทธิภาพก็จะเกิดกระบวนการกักล้อมขึ้นโดยมีฮีโมไซท์หลายชนิดเข้ามาช่วยกันในการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอม

4. ไซโตท็อกซิกซิตี้ (cytotoxicity) เป็นกลไกการกำจัดสิ่งแปลกปลอมภายในเซลล์ โดย T lymphocyte สามารถทำให้เซลล์ในร่างกายที่ติดเชื้อแตกสลายได้ โดยการเข้าไปสัมผัสกับเซลล์ที่ติดเชื้อ

5. เลคติน (lectin) เป็นสารโปรตีนหรือไกลโคโปรตีนที่มีคุณสมบัติในการจับกับคาร์โบไฮเดรตได้อย่างจำเพาะเจาะจง โดยเลกตินแต่ละชนิดจะมีการจับแบบจำเพาะเจาะจงกับน้ำตาลได้แตกต่างกันออกไป ซึ่งเลคตินจะทำหน้าที่ในการช่วยกำจัดเซลล์ที่ไม่ต้องการในระหว่างการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (metamorphosis) และทำหน้าที่ในการป้องกันการติดเชื้อต่าง ๆ โดยเลกตินจะทำ

หน้าที่ให้เกิดการจับรวมตัวกัน (agglutination) ของเซลล์เม็ดเลือดที่ต่างชนิดกัน ในกุ้งเลคตินอาจเป็นตัวสำคัญในการทำงานของระบบการรับรู้ถึงการแทรกแซงของสิ่งแปลกปลอม (recognition system) (Soderhall and Ceranius, 1992) ทั้งนี้เนื่องจากเลคตินสามารถตกตะกอนจุลินทรีย์ได้ และสามารถช่วยในกระบวนการเชื่อมต่อระหว่างเม็ดเลือดกับสิ่งแปลกปลอมได้

6. ระบบโปรฟีนอลออกซิเดสแอคทิเวทติงซีสเตม (prophenoloxidase activating system) และโคแอกลูลาเจน (coagulagen) หรือองค์ประกอบอื่น ๆ ซึ่งกระตุ้นให้เซลล์ทราบว่าเป็นสิ่งแปลกปลอม หน้าที่ของโปรฟีนอลออกซิเดส คือการสร้างออฟโซนินก่อให้เกิดแคปซูลหรือโนดูลซึ่งเกี่ยวข้องกับการแข็งตัวของเลือด ช่วยในการทำลายจุลินทรีย์และมีส่วนช่วยในการติดต่อสื่อสารกันระหว่างเซลล์เม็ดเลือด โดยโปรฟีนอลออกซิเดส (Prophenoloxidase) เป็นเอนไซม์ที่สำคัญซึ่งส่งผลให้เกิดกระบวนการเมลาไนซ์เซชั่น (melanization) ซึ่งพบได้บ่อยในปฏิกิริยาการตอบสนองของร่างกายต่อสิ่งแปลกปลอม โปรฟีนอลออกซิเดสจะถูกสร้างในเซลล์เม็ดเลือด และระบบโปรฟีนอลออกซิเดสแอคทิเวทติงซีสเตมนี้จะถูกกระตุ้นจาก β-1,3-glucan ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของผนังเซลล์ของราและแบคทีเรีย นอกจากนั้นยังสามารถถูกกระตุ้นจาก microbial polysaccharides ต่าง ๆ เช่น lipopolysaccharides และ peptidoglycan ดังนั้นระบบโปรฟีนอลออกซิเดสแอคทิเวทติงซีสเตม ทำหน้าที่เหมือนเป็นระบบความจำทั้งในการรับรู้และการป้องกันตัว (Soderhall and Ceranius, 1992) โดยการทำงานของระบบโปรฟีนอลออกซิเดสแสดงดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 การทำงานของระบบโปรฟีนอลออกซิเดสแอคทิเวทติงซีสเตมในกุ้ง

Figure 2 The prophenoloxidase activating system in crustaceans.

ที่มา : van de Braak (2002)

2. แบคทีเรียและการก่อโรคในกุ้ง

2.1 โรคติดเชื้อจุลินทรีย์ที่เกิดจากแบคทีเรียในการเลี้ยงกุ้ง

1. โรคเสี้ยนดำ จะมีการตรวจพบลักษณะอาการคล้ายเสี้ยนดำอยู่บริเวณรอยต่อของเปลือกแต่ละปล้องหรือบริเวณใต้แพนหาง สาเหตุเกิดจากแบคทีเรีย *Vibrio vulnificus* ที่มีอยู่ทั่วไปในธรรมชาติแต่จะก่อให้เกิดโรคเมื่อสภาวะในการเลี้ยงกุ้งเสื่อมโทรม และกุ้งเกิดบาดแผล (วัลลภ คงเพิ่มพูน, 2532)

2. โรคเหงือกร่อน หางเปื่อย ขาเปื่อยดำ หรือเปลือกเปื่อยดำ อาการของโรคพบว่าบริเวณที่ติดเชื้อจะมีสีน้ำตาล และสีจะเข้มขึ้นเรื่อย ๆ จนเป็นสีดำ และเปลือกกุ้งจะเปื่อยร่อนเป็นบริเวณกว้างขึ้น สาเหตุเกิดจากเชื้อในกลุ่ม *Vibrio* sp. (วัลลภ คงเพิ่มพูน, 2532)

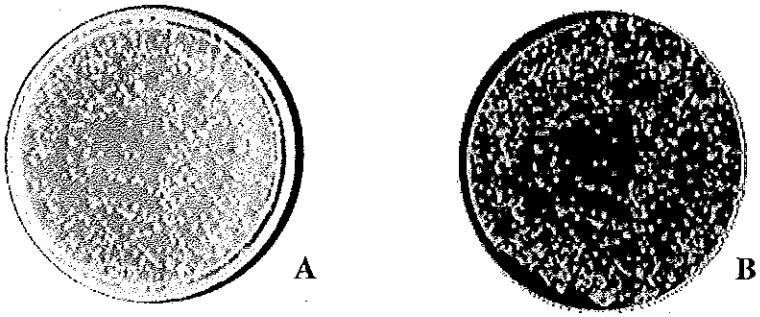
3. โรคตายเดือนเกิดขึ้นในกรณีสภาพบ่อเลี้ยงกุ้งไม่ดี มีสาหร่ายตามก้นบ่อเป็นจำนวนมากในระยะแรกของการเลี้ยงกุ้ง ต่อมาเมื่อสาหร่ายตายและย่อยสลายและหากกุ้งอยู่ในบริเวณนั้นนาน ๆ โดยเฉพาะหลังลอกคราบจะทำให้กุ้งติดเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* sp. ได้ เมื่อกุ้งติดเชื้อแบคทีเรียจะทำให้เปลือกเกิดเป็นแผล และแบคทีเรียจะผ่านเข้าไปถึงกล้ามเนื้อ ต่อมาจะเข้าไปถึงระบบเลือด ทำให้กุ้งตายได้ (พรเลิศ จันทร์รัชชกูล และ ชลอ ลิ้มสุวรรณ, 2537)

4. โรคเรืองแสง กุ้งจะอ่อนแอไม่ว่ายน้ำ ลอยขอบบ่อ ไม่กินอาหาร สีลำตัวขุ่น ซี่เหงือกมีสีดำ ตับอักเสบ ตับอ่อนสีซีด ระยะแรก ๆ กุ้งจะเปลี่ยนเป็นสีแดง แล้วจะขุ่นขาว ถ้าเป็นในระยะ Mysis ลำตัวจะหักงอ ในกรณีที่กุ้งติดเชื้อมากๆ กุ้งจะจมลงไปอยู่ที่ก้นบ่อและตายภายในระยะเวลา 1-2 วัน สาเหตุเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* (ลิลา เรืองแป้น และคณะ, 2530)

แบคทีเรีย *Vibrio harveyi* เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrionaceae* อยู่ในอาณาจักรโปรคาริโอต (Prokaryote) โดยมีลักษณะดังนี้ คือ เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อน เติบโตได้ทั้งในสภาวะที่ใช้ออกซิเจนและไม่ใช้ออกซิเจน (Baumann *et al.*, 1984) เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar (NA) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะมีลักษณะโคโลนีกลมนูน มีสีขาวนวลสะท้อนแสง เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีประมาณ 2-3 มิลลิเมตร ถ้าอยู่ในที่มืดจะเห็นโคโลนีเรืองแสงเนื่องจากปฏิกิริยาทางเคมีที่เกิดจากเอ็นไซม์ลูซิเฟอเรส (ภาพที่ 3) โดย *Vibrio harveyi* จะเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างรวดเร็วในน้ำที่มีความเค็มระหว่าง 10-40 พีพีที ที่อุณหภูมิน้ำสูงประมาณ 25-35 องศาเซลเซียส และค่าพีเอชของน้ำที่แบคทีเรียนี้เจริญเติบโตได้ดีคือ 7-9 (มณเฑียร ส่งเสริม และคณะ, 2533)

Vibrio harveyi เป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรคเรืองแสงของกุ้ง โดยลักษณะของการติดเชื้อ *Vibrio harveyi* จะทำให้กุ้งที่ติดเชื้อมีการเคลื่อนไวที่ช้าลง มีขยะ เศษอาหาร ตะกอน มาเกาะติดที่ระยางค์ ตัวขาวขุ่น บางครั้งกุ้งจะลอยติดกันเป็นกลุ่ม และกุ้งที่ป่วยจะขึ้นมาเกยตามขอบบ่อ หรือว่ายอยู่ที่ผิวน้ำและตายในที่สุด และเมื่อสังเกตสารเรืองแสงในทะเลจะมีสารเรืองแสงอยู่ตามตัวกุ้ง (Chen *et al.*, 1992) เมื่อนำกุ้งป่วยมาตรวจสอบโดยนำส่วนของตับและตับอ่อนหรือนำเลือดกุ้งมาส่องด้วย

กล้องจุลทรรศน์จะพบแบคทีเรียท่อนสั้นเคลื่อนที่ได้เป็นจำนวนมาก และเมื่อเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar จะได้โคโลนีของเชื้อแบคทีเรียเป็นชนิดสีเขียว เมื่อตรวจสอบทางเนื้อเยื่อในกุ้งป่วย พบว่าส่วนตับและตับอ่อนนั้นถูกทำลายอย่างรุนแรงทำให้การย่อยอาหาร ไม่เป็นปกติและอาหารที่สะสมไว้ในตับก็จะน้อยลง กุ้งเริ่มอ่อนแอและตายในที่สุด นอกจากจะพบว่าตับและตับอ่อนถูกทำลายแล้วยังพบว่าลำไส้เกิดเซลล์ตายและมีอาการอักเสบอย่างชัดเจนเช่นกัน กลไกการติดเชื้อนั้นพบว่าแบคทีเรียเข้าสู่ตัวกุ้งโดยผ่านทางพู่เหงือก หลังจากนั้นแบคทีเรียจะปล่อยเอนไซม์มาย่อยผนังเซลล์ ทำให้แบคทีเรียสามารถเข้าไปในเซลล์ได้ เชื้อแบคทีเรียจะกันไม่ให้มีการส่งออกซิเจนเข้าสู่เหงือกกุ้ง ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้กุ้งเกิดโรคเหงือกสีชา (Tea Brown Gill Syndrome) (Pasharawipas *et al.*, 1998) จากนั้นแบคทีเรียจะเข้าไปในเลือด และกระจายไปยังส่วนต่าง ๆ ส่วนใหญ่จะเข้าไปอยู่ในตับอ่อนเนื่องจากมีอาหารสำรองมาก และถ้ามีแบคทีเรียในเลือดมากจะทำให้กุ้งตายอย่างฉับพลัน เนื่องจากแบคทีเรียใช้เลือดเป็นแหล่งอาหาร ผลของการย่อยโปรตีนในเม็ดเลือดของเชื้อจะส่งผลให้ในเลือดมีปริมาณแอมโมเนียอิสระและสารประกอบพวกฟีโนเลทอยู่สูง และทำให้เลือดมีความเป็นด่างสูงขึ้น ทำให้ความสามารถในการจับออกซิเจนลดลง ออกซิเจนจึงมีไม่เพียงพอต่อการนำไปเลี้ยงเซลล์ต่าง ๆ ทำให้กุ้งอ่อนแอ กินอาหารน้อย และตายในที่สุด



ภาพที่ 3 ลักษณะของโคโลนี *Vibrio harveyi* ที่มีการเจริญบนอาหาร NA agar ซึ่งส่องดูในที่มีแสง (A) และในที่มืด (B)

Figure 3 Colony characteristics of *Vibrio harveyi* on NA agar under light source (A) and in the dark (B)

ที่มา : Madden (2001)

อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาที่แน่ชัดถึงกลไกของการก่อให้เกิดโรคของ *Vibrio harveyi* แต่จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการเกิดโรคเรืองแสงในกุ้งนั้นสามารถเกิดได้จากตัวเซลล์ *Vibrio harveyi* เอง และเกิดจากเอนไซม์ หรือ สารประกอบต่าง ๆ ที่ *Vibrio harveyi* ผลิตแล้วปล่อยออกมานอกเซลล์ (Extracellular products, ECPs) (Lui *et al.*, 1996) ซึ่ง ECPs ที่พบว่าสามารถก่อให้เกิดโรค

ในสัตว์น้ำได้แก่ cysteine protease ที่ผลิตโดย *Vibrio harveyi* ที่คัดแยกได้จากกุ้งที่เป็นโรค จัดเป็นสารพวก exotoxin ที่มีฤทธิ์ในการก่อโรคในกุ้ง (Lui and Lee, 1999) หรืออาจจะเกิดได้จาก hemolysin ที่เชื้อ *Vibrio* sp. ผลิต และ hemolysin นี้มีความสามารถในการละลายเม็ดเลือดทำให้เม็ดเลือดตาย และถูกกำจัดออกมานอกตัวกุ้ง (Lee *et al.*, 1995; Montero and Austin, 1999) และนอกจากนั้น ยังมีรายงานว่า phospholipase, lipopolysaccharides, Bacteriocin-like substrates, Quorum-sensing factor และไบโอฟิล์ม ที่ *Vibrio harveyi* สร้างขึ้นมีบทบาทในการก่อโรคเช่นกัน โดย Henke และ Bassler (2004) ได้รายงานว่า Quorum-sensing factors ที่ *Vibrio harveyi* ผลิตขึ้นเป็นตัวที่ใช้ควบคุมยีนที่ก่อให้เกิดโรคของ *Vibrio harveyi* และ Prasad และคณะ (2005) รายงานว่า Bacteriocin-like substrates ที่แยกได้จาก *Vibrio harveyi* VIB 517 จะทำให้ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์นี้มีสามารถแข่งขัน และได้เปรียบเชื้อสายพันธุ์อื่น และนอกจากนั้นยังส่งผลให้เชื้อ *Vibrio harveyi* เข้าไปในร่างกายกุ้งได้ง่ายขึ้น ส่วน Montgomory และ Kirchman (1993) พบว่าไบโอฟิล์มที่ *Vibrio harveyi* สร้างขึ้นจะช่วยส่งเสริมให้เชื้อ *Vibrio harveyi* สามารถเกาะติดในผนังลำไส้ และเจริญในระบบทางเดินอาหารกุ้งได้ดีขึ้นด้วย และนอกจากนั้นยังพบว่า ไบโอฟิล์มที่ *Vibrio harveyi* สร้างขึ้นมานี้มีความสามารถในการทนต่อยาปฏิชีวนะ และยาฆ่าเชื้อได้ดังนั้นจึงส่งผลให้ *Vibrio harveyi* สามารถรอดชีวิตในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง (Karunasgar *et al.*, 1994) และ จากการศึกษาของ และ Harries and Owens (1999) ได้แยกโปรตีน 2 ชนิดที่ได้มาจากการเพาะเลี้ยงเชื้อก่อโรคเรืองแสง และพบว่าโปรตีนทั้ง 2 ชนิดนี้ก่อให้เกิดการตายในกุ้งทดลอง นอกจากนั้น Montero and Austin (1999) ได้ศึกษาผลของการเกิดโรคของ *Vibrio harveyi* E2 ในกุ้งโดยการใช้สารสกัดหยาบของ ECPs ที่มี Lethal dose 50 เปอร์เซ็นต์ (LD_{50}) อยู่ที่ 4.4 ไมโครกรัมโปรตีนต่อกุ้ง โดยที่สารสกัดหยาบนั้นได้ผ่านการย่อยด้วย Proteinase K หรือ ให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และพบว่า ECPs ที่ผ่านการย่อยด้วย Proteinase K หรือผ่านการให้ความร้อน ยังคงทำให้กุ้งแสดงอาการของโรคเช่นเดียวกับสารสกัดหยาบ ECPs ตั้งต้น และจากการทำ Western blotting พบว่า ECPs เป็น lipopolysaccharides ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำที่ 23, 34, 47 และ70 กิโลดาลตัน (kDa) และทำให้ *Vibrio harveyi* สามารถก่อโรคที่มีความรุนแรงทำให้กุ้งตายได้

3. โปรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

โปรไบโอติกถูกนำมาใช้ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1907 โดย Metchinikoff และต่อมามีการนำมาใช้ในรายงานการวิจัยทางวิทยาศาสตร์ของ Lilly และ Stillwell ในปีค.ศ. 1965 ซึ่งกล่าวถึงสารที่จุลินทรีย์ชนิดหนึ่งขับออกมาช่วยกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่งซึ่งเป็นการทำงานที่แตกต่างจากการทำงานของยาปฏิชีวนะที่จะทำลายจุลินทรีย์เกือบทุกชนิด หลังจากนั้นได้มีการศึกษาและให้คำนิยามโปรไบโอติกไว้ว่า หมายถึงจุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่ใช้เสริมให้แก่คนและสัตว์ และจุลินท

รีย์เหล่านี้จะสร้างสารที่เป็นตัวทำให้จุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารอยู่ในสมดุล (Parker, 1974) โดยสารที่จุลินทรีย์เหล่านี้สร้างออกมาจะสามารถก่อประโยชน์ต่อร่างกายของสิ่งมีชีวิตที่มันอาศัยอยู่ โดยการปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในร่างกาย (Fuller, 1989) และจุลินทรีย์ที่ใช้อาจจะเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตหนึ่งชนิดหรือมากกว่าในรูปผสมหลายสายพันธุ์ก็ได้ (Farzanfar, 2006) ดังนั้นเมื่อมองความสำคัญในเรื่องของปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตในผลิตภัณฑ์อาหารจึงได้มีการศึกษาการผลิตที่จะทำให้ผลิตภัณฑ์มีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์อยู่ในปริมาณที่มากและสามารถแสดงออกถึงคุณสมบัติของการเป็นโปรไบโอติกได้ อย่างไรก็ตามโปรไบโอติกที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมักครอบคลุมถึงจุลินทรีย์ที่มีบทบาทในการปรับปรุงคุณภาพน้ำด้วยหมายถึงการเติมจุลินทรีย์ลงสู่ถังหรือบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยจุลินทรีย์จะไปเปลี่ยนแปลงชนิดหรือแทนที่แบคทีเรียที่ก่อโรคในน้ำและในตะกอนดิน (Moriarty *et al.*, 1997 อ้างโดย กิจการ ศุภมาตย์, 2544) รวมทั้งสามารถเจริญในระบบทางเดินอาหารของสัตว์น้ำได้ (Cahill, 1990; Gastsoupe, 1999; Gram *et al.*, 1999)

3.1 คุณสมบัติที่สำคัญของโปรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

จุลินทรีย์ที่จัดเป็นโปรไบโอติกนั้นอาจเป็นแบคทีเรียหรือยีสต์ (ตารางที่ 1) ซึ่งควรจะมีบทบาท และคุณสมบัติต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์ในหลาย ๆ ด้าน เช่น ควรเป็นจุลินทรีย์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค มีจำนวนมากพอ มีความสามารถในการเจริญ และทนต่อสภาพกรดในกระเพาะ และน้ำดีในลำไส้ได้ดี เพื่อทำให้สามารถรอดชีวิตในระบบทางเดินอาหาร และผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค เช่นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ กรดอินทรีย์ และ แบคเทอริโอซิน หรือผลิตสารที่ช่วยส่งเสริมภูมิคุ้มกันให้ดีขึ้นโดยการช่วยเพิ่มปริมาณเม็ดเลือดรวมในกุ้ง ซึ่งส่งผลให้สัตว์เจ้าบ้านมีความสามารถในการต้านทานโรคมากขึ้น นอกจากนั้นจุลินทรีย์ที่จัดว่าเป็นโปรไบโอติก ควรเจริญได้ดีในสภาวะแวดล้อมที่แตกต่างกัน เช่นสามารถเจริญได้ดีในน้ำที่มีค่าความเค็ม และค่าพีเอชที่แตกต่างกัน มีความสามารถในการย่อยสลายสารอินทรีย์ได้ดี และสามารถปรับปรุงคุณภาพน้ำ เช่น ช่วยเพิ่มความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายน้ำ ลดความเข้มข้นของไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ช่วยควบคุมความเข้มข้นของแอมโมเนีย ไนไตรท์ และไฮโดรเจนซัลไฟด์ และที่สำคัญคือ ควรเป็นสายพันธุ์ที่สามารถผลิตในปริมาณมากในอุตสาหกรรมได้ และ มีความคงตัวและมีชีวิตอยู่ได้นานในสภาพการเก็บรักษาและการใช้งานจริงในฟาร์ม (เกรียงศักดิ์ พูลสุข, 2535; วรรณี เมืองเจริญ, 2353; Fuller, 1992; Ali, 2002; Verschuere *et al.*, 2000; Irianto and Austin, 2002)

ตารางที่1 โปรไบโอติกที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

Table 1 Probiotic products considered for use in aquaculture.

Microbial	Species
Gram-positive Bacteria	
Bacillus spp.	*Bacillus megaterium, Bacillus polymyxa, Bacillus lichenifoemis, Bacillus subtilis*
Carnobacterium sp.	*Carnobacterium divergens, Carnobacterium inhibens* K1
Enterococcus sp.	*Enterococcus faecium* SF68
Lactobacillus sp.	*Lactobacillus helveticus, Lactobacillus lactis, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus rhamnosus*
Micrococcus sp.	*Micrococcus luteus*
Streptococcus sp.	*Streptococcus thermophilus, Streptococcus lactis*
Weissella sp.	*Weissella helenica*
Gram-nagative bacteria	
Aeromonas sp.	*Aeromonas hydrophila, Aeromonas media*
Pseudomonas sp.	*Pseudomonas fluorescens*
Vibrio sp.	*Vibrio alginolyticus, Vibrio fluvialis*
Yeast	
Saccharomyces sp.	*Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces exiguous*
Phaffia sp.	*Phaffia rhodozoma*
Debaryomyces sp.	*Debaryomyces hansenii*

ที่มา : ดัดแปลงจาก Verschuere และคณะ (2000), Irianto และ Austin (2002).

การที่สัตว์น้ำมีสุขภาพที่ดีนั้นเกิดได้จากความสมดุลระหว่างจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่มีอยู่ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์เจ้าบ้าน กับจุลินทรีย์ก่อโรค โดยจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์จะช่วยสัตว์เจ้าบ้านย่อยสลายและดูดซึมสารอาหารต่าง ๆ และส่งผลให้ระบบทางเดินอาหารเกิดความสมดุล แต่เมื่อเกิดสภาวะเครียดในสัตว์จะทำให้จุลินทรีย์ประจำถิ่นที่มีประโยชน์ลดจำนวนลง และจุลินทรีย์ก่อโรคจะเจริญขึ้นอย่างรวดเร็ว (Gatesoupe, 1999) ดังนั้นการนำจุลินทรีย์กลุ่มโปรไบโอติกมาประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเนื่องจากจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้มีหน้าที่และบทบาทที่สำคัญต่าง ๆ เช่น

3.1.1 ความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียก่อโรค โดยการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค

จุลินทรีย์ที่เจริญอยู่ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์เจ้าบ้านโดยเฉพาะอย่างยิ่งจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียแลกติก จะสามารถผลิตสารเพื่อกำจัดหรือยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค โดยสารเหล่านั้นอาจจะอยู่ในรูปสารเดี่ยว หรือสารหลายชนิดที่มารวมกันก็ได้ เช่น แอนติไบโอติก แบคเทอริโอซินไลโซไซม์ โปรติเอส ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และกรดอินทรีย์ (Verschuere *et al.*, 2000) นอกจากนั้น Imada และคณะ (1985) (อ้างโดย Verschuere *et al.*, 2000) สามารถสกัดสารยับยั้งชนิด alkaline protease ที่เรียกว่า monastatin ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในปลา (*Aeromonas hydrophila* และ *Vibrio anguillarum*) ได้จากเชื้อ *Alteromonas* sp. strain B-10-31 ซึ่งแยกได้จากสาหร่ายทะเลของประเทศญี่ปุ่น ส่วน Chythanya และคณะ (2002) พบว่าเชื้อ *Pseudononas* I2 ซึ่งแยกได้จากบริเวณปากแม่น้ำ สามารถผลิตสารยับยั้งที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ทนต่อความร้อน ละลายในคลอโรฟอร์ม และทนต่อโปรติโอไลติกเอนไซม์ได้ และสามารถยับยั้งการเจริญของ *Vibrio harveyi* ที่ก่อโรคในกุ้ง โดยสามารถลดปริมาณของ *Vibrio harveyi* จาก $1.62x10^7$ CFU ต่อมิลลิลิตร เหลือน้อยกว่า $1.0x10^1$ CFU ต่อมิลลิลิตร ภายใน 12 ชั่วโมง และวรณัฏฐ์ อนันตศิลป์ (2545) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของ *Lactobacillus* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียชนิด *Vibrio harveyi* และ *Vibrio parahaemolyticus* ที่ก่อให้เกิดโรคในกุ้งกุลาดำโดยใช้ส่วนที่เป็น whole cell และส่วนที่เป็น filtrate จากเชื้อ *Lactobacillus* spp. มาทำการทดสอบจากการทดลองพบว่ามีเพียงส่วนที่เป็น filtrate จากเชื้อ Lactobacillus ทุกชนิด ที่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Vibrio* spp. โดยที่ *Lactobacillus* sp. มีผลในการยับยั้ง *Vibrio harveyi* ได้ดีที่สุด และ *Lactobacillus plantarum* มีผลในการยับยั้ง *Vibrio parahaemolyticus* ได้ดีที่สุด

3.1.2 ความสามารถในการสร้างสารอาหารและเอนไซม์ต่าง ๆ เพื่อส่งเสริมการเจริญของสัตว์เจ้าบ้าน

จุลินทรีย์ในกลุ่มโปรไบโอติกจะมีบทบาทสำคัญในกระบวนการย่อยสลายอาหารในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ และยังสามารถสร้างสารอาหารได้ด้วย เช่น เชื้อ *Bacteroides* sp. และ *Clostridium* sp. ในปลาสามารถสร้างกรดไขมันจำเป็นและสร้างวิตามินบางชนิดได้ (Sakata, 1990) ส่วนรายงานของ Prieur และคณะ (1990) ที่ได้พบแบคทีเรียบางสายพันธุ์ในหอยมีบทบาทในกระบวนการย่อยอาหาร โดยการผลิตเอนไซม์ เช่น เอนไซม์ไลเปส เอนไซม์โปรติเอส และยังสามารถผลิต growth factors อื่น ๆ ได้ด้วย ซึ่งสอดคล้องกับ รายงานของ Wang และคณะ (2000) พบว่าจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของกุ้งสามารถสร้างสารประกอบของเอนไซม์เพื่อใช้ในการย่อย และสังเคราะห์สารอาหารซึ่งกุ้งสามารถดูดซึมได้ นอกจากนั้นยังมีงานที่ศึกษาถึงคุณสมบัติของโปรไบโอติกที่ช่วยส่งเสริมการเจริญ เช่น มณฑกานต์ ทองสม (2547) ซึ่งคัดเลือกแบคทีเรียแลก

ติกจากทางเดินอาหารกุ้ง ที่มีคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกได้ 9 สายพันธุ์ คือ *Lactobacillus dextranicum* AM20, *Enterococcus faecalis* AM35, *Pediococcus halophilus* AM46, *Enterococcus faecalis* AM92, *Lactobacillus salivarius* AM101, *Enterococcus faecalis* AM107, *Lactobacillus salivarius* AM111, *Lactobacillus farciminis* AM115 และ *Enterococcus faecium* AM119 และพบว่าทั้ง 9 สายพันธุ์สามารถส่งเสริมการเจริญของกุ้งกุลาดำ โดยพบว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมเชื้อ *Lactobacillus salivarius* AM101 มีอัตราการเจริญต่อวันสูงสุดที่ 4.66 กรัมต่อตัว ในขณะที่ชุดควบคุมมีการเจริญต่อวันอยู่ที่ 3.14 กรัมต่อตัว ส่วน ทิพรัตน์ หงภัทรคีรี และ กิจการ ศุภมาตย์(2548) ศึกษาการใช้ยีสต์ *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9 และ *Saccharomyces cerevisiae* ผสมในอาหารสำหรับกุ้งกุลาดำในปริมาณ 2-5x10^8 CFU ต่อกรัมอาหาร และให้กุ้งกุลาดำกินเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมยีสต์มีน้ำหนักเฉลี่ยสูงกว่ากุ้งกุลาดำที่ไม่ได้รับยีสต์ โดยพบว่ากุ้งที่ได้รับ *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9, *Saccharomyces cerevisiae* และกุ้งกุลาดำที่ไม่ได้รับอาหารผสมยีสต์ มีน้ำหนักเฉลี่ยเพิ่มขึ้นอยู่ที่ 77.57, 74.76, 72.05 และ 66.35 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

3.1.3 ความสามารถในการเข้าครอบครองพื้นที่ในระบบทางเดินอาหารและการยึดเกาะที่ผนังลำไส้

โดยทั่วไปในระบบทางเดินอาหารของตัวอ่อนของสัตว์จะมีจุลินทรีย์ที่ประจำถิ่นอยู่ตั้งแต่เกิด แต่เมื่อเจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัย จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์เหล่านั้นจะค่อย ๆ ลดจำนวนลง (Fuller, 1992) จึงมีความจำเป็นต้องมีการเพิ่มปริมาณของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ให้สัตว์ และสิ่งที่ต้องคำนึงถึง คือความสามารถในการเข้ายึดครองพื้นที่ของจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่ได้เสริมลงไป โดยจุลินทรีย์ที่เติมลงไปต้องมีอัตราการเพิ่มจำนวนในทางเดินอาหารได้สูงกว่าอัตราที่ถูกปล่อยออกจากทางเดินอาหาร ขั้นตอนของการเข้าครอบครองพื้นที่และการยึดเกาะที่ผนังลำไส้ เกิดจากการที่แบคทีเรียไปยึดเกาะที่เยื่อเมือกของเยื่อบุผิวของเซลล์ในลำไส้ และการเข้ายึดครองพื้นที่และการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์โปรไบโอติกจะช่วยให้จุลินทรีย์ก่อโรคไม่สามารถเข้าไปยึดเกาะที่ผนังลำไส้ได้ นอกจากนั้นยังไปแย่งใช้สารอาหารของจุลินทรีย์ก่อโรคด้วย (Westerdahl *et al.*, 1991; Ringo and Gatesoupe, 1999) นอกจากนั้น Balcazar และคณะ (2006) ได้สรุปปัจจัยที่มีผลต่อการเข้าครอบครองพื้นที่ในระบบทางเดินอาหาร การยึดเกาะที่ผนังลำไส้ และการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์โปรไบโอติกว่าเกิดจากปัจจัยหลัก 2 ปัจจัย คือ ปัจจัยจากสัตว์เจ้าบ้าน เช่นอุณหภูมิในร่างกายของสัตว์ เอนไซม์ที่ผลิตขึ้น เช่น จุลินทรีย์ที่สัตว์กินเข้าไปอาจจะผสมอยู่ในน้ำหรืออาหารจะผ่านเข้าทางปาก และลงมาที่ระบบทางเดินอาหาร บางส่วนอาจจะรอดชีวิตและเข้าครอบครองพื้นที่ได้ แต่บางส่วนอาจจะถูกทำลายไปในกระบวนการย่อยอาหาร และถูกกำจัดออกไป หรือการเจริญของจุลินทรีย์อาจจะถูกยับยั้งโดยสารต้านจุลินทรีย์ที่สัตว์เจ้าบ้านผลิตขึ้น ส่วนอีกปัจจัย คือปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับเชื้อจุลินทรีย์

โปรไบโอติก เช่นความสามารถในการผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ตัวอื่น ๆ ที่เข้ามาแข่งขัน สารยับยั้งเหล่านี้ได้แก่ เอนไซม์โปรติเอส ไลโซไซม์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แบคเทอริโอซิน ไดอะซิทิว กรดอินทรีย์ต่าง ๆ และ กรดอะมิโนที่จำเป็นบางชนิด

นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียแลกติกสามารถครอบครองพื้นที่และจัดเป็น normal flora ที่สำคัญในระบบทางเดินอาหาร โดยแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *Streptococcus* sp., *Leuconostoc* sp., *Lactobacillus* sp. และ *Carnobacterium* sp. เป็นแบคทีเรียที่พบทั่วไปในระบบทางเดินอาหารของปลา และปริมาณที่พบจะขึ้นอยู่กับอาหารและสิ่งแวดล้อมที่ปลาอาศัยอยู่ มีรายงานการพบแบคทีเรียแลกติกในอวัยวะภายในของปลา เช่น ไต ตับ หัวใจ และ ม้าม ซึ่งแบคทีเรียแลกติกเหล่านั้นสามารถนำมาใช้เป็นโปรไบโอติก และสามารถเข้าครอบครองพื้นที่ในระบบทางเดินอาหารและยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในปลาได้ (Ringo and Gatesoupe, 1998) นอกจากนั้นยังมีรายงานว่า แบคทีเรีย *Vibrio* P26, *Vibrio* P63 และ *Bacillus* P64 ที่คัดแยกได้จากตับอ่อนของกุ้งขาวที่มีสุขภาพดี มีความสามารถในการเข้าครอบครองพื้นที่บริเวณตับอ่อนของกุ้งอยู่ที่ 83.00, 60.00 และ 58.00 เปอร์เซ็นต์

3.1.4 ความสามารถในการส่งเสริมและกระตุ้นภาวะภูมิคุ้มกันในสัตว์

สารที่ช่วยกระตุ้นภาวะภูมิคุ้มกันเป็นสารประกอบเคมีที่ช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์เจ้าบ้านและช่วยส่งเสริมให้สัตว์มีความสามารถในการต้านทานต่อสิ่งบุกรุกเช่น เชื้อโรค เชื้อไวรัส และ เชื้อรา โดยในตัวอ่อนของสัตว์จะมีระบบภูมิคุ้มกันที่อ่อนแอกว่าในตัวเต็มวัย สำหรับในกุ้งนั้นจะมีระบบการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมแบบไม่จำเพาะเจาะจง เนื่องจากกุ้งไม่มีความสามารถในการจดจำสิ่งแปลกปลอมที่เคยเข้ามาในร่างกายได้ จึงไม่สามารถตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมได้รวดเร็วเท่ากับการสร้างแอนติบอดีในสัตว์ชั้นสูง (Verschuere *et al.*, 2000) จากรายงานของ Balcazar และคณะ (2006) ที่พบว่าการให้เชื้อผสมของแบคทีเรีย 2 ชนิด คือ *Bacillus* sp. และ *Vibrio* sp. จะช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของกุ้งขาว และให้ผลในการป้องกันการติดเชื้อ *Vibrio harveyi* และไวรัส เมื่อวิเคราะห์แล้วพบว่าการป้องกันนี้เกิดจากการถูกกระตุ้นของระบบภูมิคุ้มกัน โดยวัดจากความสามารถในการเพิ่มประสิทธิภาพความว่องไวของฟาโกไซโตซิสของเม็ดเลือด และกิจกรรมของสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Sajeevan และคณะ (2006) ที่พบว่าการเติม *Candida sake* ในอาหารกุ้งอัตราส่วน 10 เปอร์เซ็นต์จะทำให้กุ้งขาวมีปริมาณเม็ดเลือดรวมและมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสที่สูงกว่ากุ้งขาวที่ไม่ได้รับ *Candida sake* ส่วน Chiu และคณะ (2007) พบว่า *Lactobacillus plantarum* มีความสามารถในการช่วยส่งเสริมภูมิคุ้มกันในกุ้งขาวได้เนื่องจากพบว่ากุ้งขาวที่ได้รับ *Lactobacillus plantarum* มีกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส เอนไซม์โปรฟีนอลออกซิเดส และมีกิจกรรมในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในกุ้งขาวได้ดีกว่ากุ้งขาวที่ไม่ได้รับ *Lactobacillus plantarum*

3.2 บทบาทและรูปแบบการใช้โปรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงกุ้งสามารถแบ่งได้เป็น 3 ลักษณะ ดังต่อไปนี้

ก. การใช้โปรไบโอติกเพื่อควบคุมคุณภาพของน้ำ

การใช้จุลินทรีย์เพื่อกำจัดของเสียที่มีอยู่ในบ่อเลี้ยงกุ้ง โดยของเสียส่วนใหญ่เป็นอินทรีย์วัตถุต่าง ๆ ที่มาจากอาหารที่กุ้งกินเหลือ ของเสียจากกุ้ง ตลอดจนซากแพลงตอนที่ตายแล้ว ซึ่งประกอบด้วยโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และสารอินทรีย์อื่น ๆ ซึ่งถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ เชื้อรา และโปรโตซัว เกิดเป็นสารประกอบ ที่เป็นอันตรายต่อกุ้งทั้งโดยทางตรงและทางอ้อม เช่นก๊าซแอมโมเนีย ไนไตรท์ กรด ด่าง เป็นต้น การดำรงชีวิตของแบคทีเรียในบ่อกุ้งมีทั้งที่เป็นออโตโทป (autotroph) และเฮตเทอโรโทรป (heterotroph) ซึ่งเฮตเทอโรโทรปมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายสารอินทรีย์ได้ดีที่สุด เช่น แบคทีเรียในกลุ่ม *Aerobacter* sp., *Bacillus* sp. เป็นต้น (Shariff *et al.*, 2001) โดย เฉพาะแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* sp. ที่พบว่ามีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายสารอินทรีย์ต่าง ๆ โดยการผลิตน้ำย่อยออกมาภายนอกเซลล์ ได้แก่ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ P1, *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ P3, *Bacillus lentus* สายพันธุ์ S22, *Bacillus marinus* สายพันธุ์ S25 ซึ่งแยกมาจากตะกอนและน้ำจากบ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง จากจังหวัด สงขลา นครศรีธรรมราช และฉะเชิงเทรา สามารถนำมาใช้เป็นตัวควบคุมเชิงชีวภาพในการบำบัดน้ำเสียในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งได้ เนื่องจากสามารถย่อยสลายโปรตีน แป้ง และ ไขมันในบ่อเลี้ยงกุ้งได้ (เปรมสุดา สมาน, 2539) นอกจากนั้นยังมีการรายงานการใช้ *Bacillus* spp. ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกในการปรับปรุงคุณภาพน้ำในการเพาะเลี้ยงกุ้งโดยจะไปช่วยลดปริมาณจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดปัญหาด้านคุณภาพน้ำและ จุลินทรีย์ที่ก่อโรค (Irianto and Austin, 2002) และการใช้โปรไบโอติกที่อยู่ในรูปของสารละลายที่ประกอบด้วยเชื้อ *Bacillus* spp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Nitrosomonas* sp. และ *Nitrobacter* sp. ลงไปในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งที่มีการเพาะเลี้ยงแบบหนาแน่น ซึ่งพบว่าทำให้คุณภาพของน้ำที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงปลา และ กุ้งมีคุณภาพที่ดีขึ้น โดยโปรไบโอติกที่เติมลงไปจะผลิตเอนไซม์ที่ไปช่วยในการย่อยสลายสารประกอบอินทรีย์ และนอกจากนั้นยังพบว่าการเติมโปรไบโอติกลงไปยังไปลดปริมาณของ *Vibrio* sp. ในน้ำได้ด้วย (Douillet, 1998) แต่อย่างไรก็ตามยังพบปัญหาว่าเชื้อโปรไบโอติกที่เติมลงไปไม่สามารถดำรงสภาพและเพิ่มจำนวนได้ถ้าอยู่ในบ่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน ๆ โดยจะมีการลดจำนวนลง ในขณะที่เชื้อที่ย่อยสลายสารอินทรีย์ไม่เก่งซึ่งมีอยู่ตามธรรมชาติจะมีจำนวนเพิ่มขึ้นแทน ดังนั้นจึงต้องมีการเติมเชื้อโปรไบโอติกลงไปในบ่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะ ๆ

ข. การใช้โปรไบโอติกเพื่อเป็นสารอาหาร และส่งเสริมการเจริญของกุ้ง

การใช้โปรไบโอติกบางชนิดมุ่งเน้นในการเสริมสร้าง ซ่อมแซม และฟื้นฟูในส่วนที่บกพร่องต่าง ๆ ของกุ้งให้กลับมาอยู่ในสภาพปกติ ให้กุ้งสามารถป้องกันและควบคุมจุลินทรีย์ต่าง ๆ ที่บุกรุกเข้ามาในร่างกายได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยจุลินทรีย์ที่เป็นโปรไบโอติกจะมีมีกลไกในการเสริมการเจริญหลายด้าน เช่นการสร้างวิตามินและสารที่ไม่ทราบชนิด (unidentified substance) ซึ่งมีความจำเป็นต่อระบบการย่อยอาหาร และช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโต และยังผลิตกรดอะมิโนที่จำเป็น เช่น ไลซีน เมไทโอนีน เพื่อเป็นต้นกำเนิดในการสร้างโปรตีน (Sakata, 1990) นอกจากนั้นยังพบว่า จุลินทรีย์บางชนิดสามารถสร้างเอนไซม์เฉพาะที่จะย่อยสารประกอบเชิงซ้อนให้เป็นองค์ประกอบเดี่ยว ๆ ซึ่งสัตว์สามารถนำไปใช้ต่อได้ โดยจุลินทรีย์จะสร้างเอนไซม์หลายชนิดเช่น เซลลูเลส (cellulase) ไซลาเนส (xylanase) ไลเปส (lipase) โปรตีเอส (protease) อะไมเลส (amylase) และ เบต้า-กลูคาเนส (beta-glucanase) (Prieur *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 2000)

จากงานวิจัยของ Rengpipat และคณะ (1998) ที่พบว่าหลังจากการเลี้ยงกุ้งกุลาดำด้วยอาหารผสม *Bacillus* sp. สายพันธุ์ S11 จะให้มีน้ำหนักกุ้งที่สูงกว่าชุดที่ไม่ได้รับโปรไบโอติก โดยพบว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับ อาหารผสม *Bacillus* sp. สายพันธุ์ S11 และ ไม่ได้รับโปรไบโอติกมีน้ำหนักเฉลี่ยอยู่ที่ 7.06 และ 3.99 กรัมต่อตัว ส่วน ยีสต์ *Phaffia rhodozyma* ที่ผสมในอาหารกุ้งในอัตราส่วน 10.87 เปอร์เซ็นต์จะทำให้กุ้งที่ได้รับอาหารผสมยีสต์นี้มีอัตราการเจริญต่อวันที่ 1.56 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กุ้งที่ได้รับอาหารธรรมดามีอัตราการเจริญต่อวันที่ 1.35 เปอร์เซ็นต์ (Nakano *et al.*, 1999) ส่วนรายงานของ ทิพรัตน์ หงภัทรดีรี และ กิจการ ศุภมาตย์ (2548) ที่ได้ศึกษาการใช้ยีสต์ *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9 และ *Saccharomyces cerevisiae* ผสมในอาหารสำหรับกุ้งกุลาดำในปริมาณ 2-5x10^8 CFU ต่อกรัมอาหาร และให้กุ้งกุลาดำกินเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า กุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมยีสต์จะมีอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อดีกว่ากุ้งกุลาดำที่ไม่ได้รับอาหารผสมยีสต์ โดยพบว่ากุ้งที่ได้รับ *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9, *Saccharomyces cerevisiae* และกุ้งกุลาดำที่ไม่ได้รับอาหารผสมยีสต์ มีอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้ออยู่ที่ 2.16, 2.24, 2.32 และ 2.52 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ค. การใช้โปรไบโอติกเพื่อควบคุมโรคในกุ้ง

ปัญหาในการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวที่จะทำให้เกษตรกรประสบความสำเร็จหรือล้มเหลวในการเพาะเลี้ยงคือการป้องกันและการควบคุมโรคที่ทำให้เกิดปัญหา เช่น โรคที่เกิดจากเชื้อในกลุ่ม *Vibrionaceae* ซึ่งถ้าแก้ไขปัญหาโดยการใช้ยาปฏิชีวนะจะทำให้เชื้อเกิดการดื้อยา ทำให้การรักษาโรคทำได้ยากมากขึ้นจำเป็นต้องมีการเพิ่มปริมาณการใช้ยาให้มากขึ้นกว่าที่ใช้ในระยะแรกของการเพาะเลี้ยง สาเหตุที่การใช้ยาไม่สามารถรักษาอาการป่วยที่เกิดจากการติดเชื้อได้ เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียก่อโรคสามารถปรับตัวให้ทนต่อยาปฏิชีวนะหรือสารเคมีได้มากขึ้นจากการใช้ยาปฏิชีวนะ

หรือสารเคมีที่ไม่ถูกต้องในการรักษา หรือ ป้องกันในระยะที่กุ้งไม่ได้ป่วย นอกจากนั้นการใช้ยาปฏิชีวนะมากเกินไปจะส่งผลต่อตับ และ ตับอ่อนของกุ้ง โดยจะทำให้ตับ และ ตับอ่อนฝ่อ ดังนั้นการทำหน้าที่ต่าง ๆ ของตับ เช่น การสร้างน้ำย่อย และ การสะสมสารอาหารจะน้อยลงไปด้วยเช่นกัน ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาการใช้โปรไบโอติกแทนการใช้ยาปฏิชีวนะโดยความแตกต่างของคุณสมบัติและกลไกในการออกฤทธิ์ของโปรไบโอติกและสารปฏิชีวนะได้สรุปไว้ในตารางที่ 2

จุลินทรีย์โปรไบโอติกหลายชนิดสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในกุ้ง บางชนิดสามารถเสริมภูมิคุ้มกันในกุ้ง จุลินทรีย์ที่มีการนำมาศึกษาคุณสมบัติด้านนี้มีทั้งแบคทีเรีย และ ยีสต์ โดยพบว่า *Bacillus mycoides* S11 ที่มีคุณสมบัติสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคในกุ้ง ซึ่งคัดแยกได้จากทางเดินอาหารกุ้งกุลาดำ เมื่อนำมาผสมในอาหารกุ้งและเพาะเลี้ยงในระบบน้ำหมุนเวียนแบบปิดเป็นเวลา 100 วัน พบว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสม *Bacillus mycoides* S11 มีสามารถต้านทานการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคจาก *Vibrio harveyi* ได้ โดยกลุ่มที่ได้รับ *Bacillus mycoides* S11 มีอัตราการรอดชีวิตร้อยละ 100 และกลุ่มที่ไม่ได้รับอาหารผสม *Bacillus mycoides* S11 มีอัตราการรอดชีวิตร้อยละ 26 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *(P<0.05)* (วรรณิภา เพี้ยนภักตร์, 2539) ส่วนการทดลองของ Chiu และคณะ (2007) พบว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสม *Lactobacillus plantarum* จะมีอัตราการตายจากการถูกชักนำให้เกิดโรคจากเชื้อ *Vibrio alginolyticus* ลดลงจาก 43.30 เป็น 33.30 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 2 คุณสมบัติและกลไกการออกฤทธิ์ของโปรไบโอติกเทียบกับสารปฏิชีวนะ

Table 2 Properties and mechanisms between probiotics and antibiotics.

Probiotic	**Antibiotics**
คุณสมบัติ	**คุณสมบัติ**
1. เป็นสิ่งมีชีวิต	1. เป็นสารเคมีบริสุทธิ์
2. ไม่ดูดซึมในทางเดินอาหาร	2. ดูดซึมได้ในทางเดินอาหาร
3. เพิ่มการเจริญและประสิทธิภาพการใช้อาหาร	3. เพิ่มการเจริญและประสิทธิภาพการใช้อาหาร
4. ไม่มีการตกค้างในเนื้อเยื่อ	4. เหลือตกค้างในเนื้อเยื่อ
5. ไม่ก่อให้เกิดเชื้อกลายพันธุ์หรือดื้อยา	5. อาจทำให้เชื้อเกิดการกลายพันธุ์และดื้อยา
กลไกการออกฤทธิ์	**กลไกการออกฤทธิ์**
1. ให้ฤทธิ์ในการต้านเชื้อเฉพาะที่	1. ให้ฤทธิ์ในการต้านเชื้อได้ทั่วร่างกายและออกฤทธิ์ต้านเชื้อต่าง ๆ ได้มากชนิด
2. เจริญได้ในทางเดินอาหารและเจริญแข่งกับเชื้อโรคได้	2. ไม่มีการเพิ่มปริมาณและสูญเสียสภาพได้ง่าย

ที่มา : จิตรวี เชยชม (2548)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. ชนิดของแบคทีเรียที่ใช้เป็นโปรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

4.1 แบคทีเรียแลกติก

แบคทีเรียแลกติกมีลักษณะโดยทั่วไปคือ ย้อมติดสีแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่ต้องการอากาศหรือต้องการเพียงเล็กน้อยบางชนิดเป็นพวกไม่ต้องการอากาศอย่างยิ่ง ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส บางตัวเป็นซูโดคะตะเลส จะพบเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลน้อย ไม่เคลื่อนที่ มีทั้งกลุ่มที่มีรูปร่างกลม เช่น แบคทีเรียในสกุล *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* และรูปร่างแท่ง เช่น แบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus*, *Carnobacterium* และ *Bifidobacterium* โดยการจัดเรียงตัวของเซลล์จะเป็นไปในทิศทางเดียวกันยกเว้น *Pediococcus* ที่ต่อกันเป็นคู่มี 2 ระนาบ (tetrads) สามารถหมักคาร์โบไฮเดรตให้กรดแลกติก และบางครั้งจะให้กรดที่ระเหยได้อื่น ๆ และคาร์บอนไดออกไซด์ การจัดกลุ่มแบคทีเรียแลกติกในสกุลต่าง ๆ ขึ้นอยู่กับรูปร่างลักษณะ รูปแบบการหมักน้ำตาลกลูโคส ความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ การใช้อะซิเตท การใช้อาร์จินิน การเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ การผลิตกรดแลกติก การเจริญในที่มีเกลือความเข้มข้นสูง และการทนกรดหรือด่าง (Axelsson, 1993) อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ในช่วง 30-40 องศาเซลเซียส ช่วงพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ในช่วง 5.58-6.20 แต่โดยทั่วไปเจริญได้ที่ พีเอช $\leq$ 5.0 อัตราการเจริญเติบโตลดลงเมื่ออยู่ในสภาพที่เป็นกลางหรือด่าง (Salminen and Wright, 1993) เนื่องจากแบคทีเรียแลกติกแต่ละสายพันธุ์สามารถปรับตัวเพื่อเจริญเติบโตภายใต้สภาวะแวดล้อมได้แตกต่างกัน จึงทำให้พบเชื้อกลุ่มนี้กระจายทั่วไปทั้งในคนและสัตว์

แบคทีเรียแลกติกสามารถแบ่งตามการใช้สารอาหารและการสร้างสารได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ (Axelsson, 1993) คือ

1. โฮโมเฟอร์เมนเตทีฟแบคทีเรีย เป็นแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตกรดแลกติกได้ประมาณร้อยละ 85 หรือมากกว่าจากการหมักคาร์โบไฮเดรต ไม่ต้องการไธอามีนในการเจริญเติบโต เจริญได้ที่45 องศาเซลเซียส หรือ 15 องศาเซลเซียส สร้างเอนไซม์อัลโดเลส แต่ไม่สร้างเอนไซม์ฟอสโฟคีโตเลส ได้แก่ *Lactobacillus sake, Lactobacillus acidilactici, Lactobacillus casei, Pediococcus pentosaceus* และ *Streptococcus lactis* เป็นต้น

2. เฮทเทอร์โรเฟอร์เมนเตทีฟ เป็นแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตกรดแลกติก กรดอะซิติก แอลกอฮอล์จากการหมักคาร์โบไฮเดรต ต้องการใช้ไธอามีนในการเจริญเติบโต และสร้างเอนไซม์ฟอสโฟคีโตเลส แต่ไม่สร้างเอนไซม์อัลโดเลส ได้แก่ *Lactobacillus plantarum, Lactobacillus fermentum, Lactobacillus brevis* และ *Leucunostoc mesenteroides*

สารยับยั้งแบคทีเรียที่ได้จากแบคทีเรียแลกติก

แบคทีเรียแลกติกสามารถผลิตสารประกอบที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียหรือจุลินทรีย์กลุ่มอื่น ๆ ได้ สารที่แบคทีเรียแลกติกสร้างขึ้นที่สำคัญมีดังนี้

1. Hydrogenperoxide (H_2O_2) เป็นสารที่ได้จากกระบวนการเมตาบอลิซึมในระหว่างการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแลกติกทุกสายพันธุ์ (Helander *et al.*, 1997) และจะสะสมเพิ่มขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากแบคทีเรียแลกติกไม่มีเอนไซม์คะตะเลสจึงสามารถสร้าง ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สามารถทำปฏิกิริยากับสารอื่นๆ ได้เพื่อสร้างสารยับยั้ง โดยแบคทีเรียแลกติกสามารถทำปฏิกิริยากับ Endogenous thiocyanate ซึ่งเร่งปฏิกิริยาโดย Lactoperoxidase เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ Intermediary oxidation เช่น hypothiocynate ซึ่งสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ กระบวนการดังกล่าวเรียกว่า Lactoperoxidase antibacterial system สามารถนำไปใช้ในการยืดอายุการเก็บรักษานมได้โดยไม่ต้องแช่ตู้เย็น (Dasechel and Klaenhammer, 1989)

2. Diacetyl (2,3-butanedione) เป็นผลจากการย่อยสารอาหารจากแบคทีเรียแลกติกบางสายพันธุ์ เป็นสารให้กลิ่น butter aroma ในผลิตภัณฑ์นมหมักและยังมีคุณสมบัติยับยั้งจุลินทรีย์แต่ต้องใช้ปริมาณมาก และทำให้มีกลิ่นรบกวน (Dasechel and Klaenhammer, 1989)

3. Reuterin เป็นสารโมเลกุลต่ำที่ไม่ใช่โปรตีนสามารถละลายได้ดีที่พีเอชเป็นกลาง สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ยีสต์ รา รวมทั้งโปรโตซัว จึงสามารถนำไปใช้ในการถนอมอาหารเพื่อลดจำนวนจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคและที่ทำให้อาหารเน่าเสีย (Dasechel and Klaenhammer, 1989)

4. Microgard สามารถต่อต้านแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์ และรา แต่ไม่ต่อต้านแบคทีเรียแกรมบวก ประกอบด้วย กรดโพรพิโอนิก ไดอะซิติล กรดอะซิติก และกรดแลกติก (Dasechel and Klaenhammer, 1989)

5. Bacteriocins ถูกใช้เรียกสารประกอบประเภทโปรตีนที่ผลิตโดยแบคทีเรียและมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นโดย Jacob และคณะในปี ค.ศ. 1953 พบว่าจุลินทรีย์ดังกล่าวมักเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับแบคทีเรียที่ผลิตแบคเทอริโอซิน เช่น มีสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ผลิตแบคเทอริโอซิน หรือมีถิ่นที่อยู่ในบริเวณเดียวกันกับแบคทีเรียที่ผลิตแบคเทอริโอซิน

การใช้แบคทีเรียแลกติกเป็นโปรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำก็ได้มีการศึกษาการแยกแบคทีเรียแลกติกมาประยุกต์ใช้กันมาก เนื่องจากแบคทีเรียแลกติกมีความสามารถในการช่วยส่งเสริมการเจริญ และสามารถผลิตสารที่

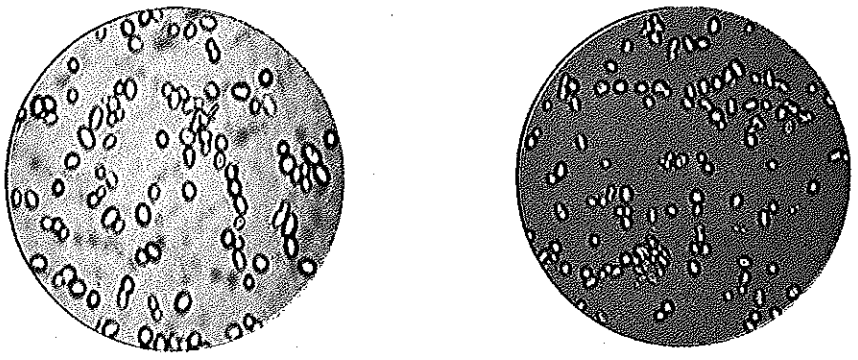
สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคต่าง ๆ ได้ เช่นจากรายงานของ Gatesoupe (1991) ที่พบว่า เทอร์บอต (*Scophthalmus maximus*) ที่เลี้ยงโดยใช้ *Lactobacillus plantarum* และ *Lactobacillus helveticus* ผสมในอาหารจะมีการเพิ่มของน้ำหนักที่มากกว่าชุดการทดลองที่ไม่มีการผสม *Lactobacillus plantarum* และ *Lactobacillus helveticus* ในขณะที่ Gildberg และคณะ (1997) พบว่าการใช้ *Carnobacterium divergens* มาผสมในอาหารให้ลูกปลาคอดเป็นเวลา 16 วัน จะทำให้ลูกปลาคอดมีอัตราการเจริญเพิ่มขึ้นจาก 2.35 เปอร์เซ็นต์ เป็น 2.68 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับลูกปลาคอดที่ได้รับอาหารปกติ และนอกจากนั้นยังพบว่าอัตราการตายของลูกปลาคอดยังลดลงด้วยโดยลดลงจาก 10 เปอร์เซ็นต์ เป็น 2.6 เปอร์เซ็นต์และจากรายงานของ Harzevili และ คณะ (1998) พบว่าการใช้ *Lactobacillus lactis* AR21 จะช่วยส่งเสริมการเจริญของโรติเฟอร์ และช่วยในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Vibrio angulillarum* อีกด้วยส่วน Nikoskelainen และคณะ (2001) พบว่าในการเลี้ยงปลา rainbow trout ที่มีการใช้ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC53101 ที่ความเข้มข้น 10^9 CFU ต่อกรัมอาหาร เป็นเวลา 51 วัน จะส่งผลให้ปลา rainbow trout มีอัตราการตายลดลงจาก 52.6 เปอร์เซ็นต์ เหลือเพียง 18.9 เปอร์เซ็นต์ หลังจาก ปลา rainbow trout ถูกชักนำให้เกิดโรคโดย *Aeromonas salmonicida* และนอกจากนั้นจากรายงานของ Chiu และคณะ (2007) ที่ใช้ *Lactobacillus plantarum* ทดลองเลี้ยงกุ้งขาวและพบว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่ผสมเชื้อ *Lactobacillus plantarum* จะมีอัตราการรอดชีวิตที่สูงกว่ากุ้งขาวที่ไม่ได้รับอาหารผสมเชื้อ *Lactobacillus plantarum* หลังการถูกชักนำให้เกิดโรคโดย *Vibrio alginolyticus*

4.2 ยีสต์ (Yeast)

ยีสต์มีอยู่ทั่วไปในธรรมชาติและแพร่กระจายโดยอาศัยแมลงพาไปและกระแสลม มักพบอยู่ในส่วนต่าง ๆ ของพืช น้ำทิ้ง น้ำจืด และน้ำทะเล (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2544) ยีสต์จัดเป็นราเซลล์เดี่ยวอยู่ในคลาสแอสโคมัยสิต และคลาสฟังอิมเพอร์เฟ็คไท (พวงพร โชติกไกร, 2536) ยีสต์มีเซลล์เดี่ยวไม่มีคลอโรฟิลล์และออร์กาแนลที่ใช้ในการเคลื่อนที่ มีการเพิ่มจำนวนส่วนมากโดยการแตกหน่อ (budding) และส่วนน้อยที่เกิดโดยการแบ่งแยกเซลล์ (fission) มีลักษณะใสไม่มีสีแต่เมื่อเลี้ยงบนอาหารจะมีสีขาว ยีสต์บางชนิดมีเม็ดสีภายในเซลล์ทำให้สีของโคโลนีแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับเม็ดสีที่มีอยู่ เช่น เหลือง ชมพู และส้ม เป็นต้น ยีสต์มักมีรูปร่างเป็นรูปไข่แต่บางชนิดอาจมีรูปร่างคล้ายผลส้ม คล้ายลูกแพร์ คล้ายขวดทรงกระบอก ทรงกลม (ภาพที่ 4) เซลล์มีขนาดใหญ่กว่าแบคทีเรีย คือมีความกว้างประมาณ 1–5 ไมครอน และยาวประมาณ 5-30 ไมครอน ปกติอยู่เป็นเซลล์เดี่ยว ๆ หรือต่อกันเป็นสายยาวซึ่งลักษณะดังกล่าวใช้ในการประกอบการจัดจำแนกชนิดของยีสต์ (พวงพร โชติกไกร, 2536)โครงสร้างภายในของเซลล์ยีสต์

ค่อนข้างซับซ้อนประกอบด้วย ผนังเซลล์ ไซโตพลาสซึม นิวเคลียส เยื่อไซโตพลาสซึม ไมโตคอนเดรีย และไกลโคเจน

จากการตรวจสอบผนังเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าในขณะที่ยีสต์มีอายุน้อย ผนังเซลล์จะบางแต่เมื่ออายุมากขึ้นผนังเซลล์จะหนาขึ้นตามอายุ ผนังเซลล์นี้อาจจะหนาถึงหนึ่งในเจ็ดของเส้นผ่านศูนย์กลางของตัวยีสต์ เมื่อพิจารณาถึงส่วนประกอบทางเคมีจะเห็นว่าผนังเซลล์ส่วนใหญ่ประกอบด้วยโพลีแซคคาไรด์ 2 ชนิดคือ กลูแคน (glucan) และแมนแนน (mannan) ซึ่งรวมแล้วมีประมาณ 2 ใน 3 ของสารในผนังเซลล์ทั้งหมด ส่วนที่เหลือประกอบด้วย โปรตีน กลูโคซามีน ไขมัน และเอนไซม์ ส่วนเยื่อไซโตพลาสซึมมีความหนาประมาณ 80 อังสตรอม มีลักษณะเป็น 2 ชั้น ชั้นในเชื่อกันว่าเป็นลิปิดและชั้นนอกเป็นโปรตีน โครงสร้างนี้ทำหน้าที่เป็นเกราะแรงดันออสโมติก ยีสต์ทั่วไปจะมีไซโตพลาสซึมในรูปของสารกึ่งเหลวและภายในไซโตพลาสซึมประกอบด้วยนิวเคลียสมีเยื่อหุ้มซึ่งจะเห็นได้ชัดเจนเวลาสืบพันธุ์ แวคคิวโอลขนาดใหญ่อาจมีเพียงหนึ่งหรือมากกว่า ไมโตคอนเดรียมีลักษณะคล้ายเป็นเส้นพันๆ กันอยู่ประกอบด้วยโปรตีนเป็นส่วนใหญ่และอาร์เอ็นเอเล็กน้อย ทำหน้าที่ในการหายใจและมีบทบาทในการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมบางอย่าง เช่น คุณสมบัติทางชีวเคมีที่นอกเหนือจากลักษณะทางพันธุกรรมในนิวเคลียส ยีสต์ที่มีอายุมากๆ จะสะสมอาหารในรูปไกลโคเจนซึ่งเป็นโพลีแซคคาไรด์ โปรตีน และไขมัน (พวงพร โชติกไกร, 2536) นอกจากนั้นยีสต์ยังสามารถเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 0-47 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเจริญเติบโตของยีสต์คือ 20-30 องศาเซลเซียส (จิตรวดี เชยชม, 2548)



A. B.

ภาพที่ 4 ลักษณะของยีสต์ *Canida tropicalis* TH112 (A) และ *Pseudozyma antarctica* TH9 (B) ภายใต้กล้องจุลทรรศ์ที่กำลังขยาย 400 เท่า

Figure 4 Characterization of yeast *Canida tropicalis* TH112 (A) and *Pseudozyma antarctica* TH9 (B) under microscropic observation at 400x magnification.

การใช้ยีสต์เป็นโปรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

นอกจากแบคทีเรียแลกติกจะได้รับความสนใจในการศึกษาเพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแล้ว ยีสต์ก็ได้รับความสนใจมากเช่นกัน เนื่องจากกลูแคนซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์ยีสต์มีความสามารถในการกระตุ้นกลไกการสร้างภูมิคุ้มกันโดยไม่มีความจำเพาะต่อชนิดของสัตว์ เช่นจากการทดลองของ Scholz และคณะ (1999) ที่พบว่าการเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่มีการใช้ *Phaffia rhodozyma* ในปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร เป็นเวลา 7 สัปดาห์ จะทำให้กุ้งกุลาดำมีการเพิ่มของน้ำหนักที่สูงกว่าชุดที่ได้รับอาหารปกติ และนอกจากนั้นยังพบว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมเชื้อ *Phaffia rhodozyma* มีอัตราการอดชีวิตเพิ่มขึ้นจาก 56.25 เปอร์เซ็นต์ เป็น 77.5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับชุดที่ได้รับอาหารปกติ และ จากการทดลองของ Suphantharika และคณะ (2003) ที่พบว่า การใช้เบต้ากลูแคนที่แยกได้จากโรงงานผลิตเบียร์จะช่วยส่งเสริมภาวะภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ โดยพบว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับเบต้ากลูแคนมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส สูงขึ้นจาก 720 U ต่อมิลลิลิตรของเม็ดเลือด เป็น 1,098 U ต่อมิลลิลิตรของเม็ดเลือด ในขณะที่ Burgents และคณะ (2004) พบว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมยีสต์ทางการค้าในปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ต่อกรัมอาหารเป็นเวลา 4 สัปดาห์จะมีอัตราการรอดชีวิตหลังการชักนำให้เกิดโรคโดย *Vibrio* sp. 90-69 B3 ที่สูงที่สุดที่ 63.4 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ชุดที่ได้รับอาหารปกติมีอัตราการรอดชีวิตเพียง 30 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการทดลองของ Sajeevan และคณะ (2006) ที่ใช้ *Candida sake* ในการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวอินเดีย โดยใช้ปริมาณ *Candida sake* ที่ต่างกัน คือ 1, 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์ และทำการทดลอง 28 วัน และทำการทดสอบการต้านเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวและพบว่าการใช้ *Candida sake* ที่ 10 เปอร์เซ็นต์ สามารถส่งเสริมภาวะภูมิคุ้มกันได้สูงที่สุด

5. ผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกในรูปผงแห้ง

ผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกในรูปผงแห้งมีข้อดีคือ มีอายุการเก็บรักษานาน การขนส่งสะดวกซึ่งการทำแห้งจะทำให้กระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์หยุดลง การที่จุลินทรีย์จะมีความสามารถในการทนต่อความแห้งได้นั้นจะแตกต่างกันตามชนิดของจุลินทรีย์ และวัสดุตัวกลางที่ใช้ โดยถ้าสามารถเลือกวิธีการทำแห้งที่ถูกวิธีจะทำให้สามารถทำให้ผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกมีอัตราการรอดชีวิตที่สูง และมีอายุการเก็บรักษาที่นานขึ้นได้

การทำแห้งหมายถึง กระบวนการที่ความร้อนถูกถ่ายเทด้วยวิธีใดวิธีหนึ่งไปยังวัตถุที่มีความชื้น เพื่อไล่ความชื้นในวัตถุนั้น ๆ ให้ออกไป โดยในขณะที่อากาศอบแห้งไหลผ่านวัตถุ การถ่ายเทความร้อนและมวลของน้ำจะเกิดขึ้นพร้อม ๆ กัน ความร้อนจะเกิดการถ่ายเทจากอากาศที่อบแห้งไปยังผิวของวัตถุที่เย็นกว่าทำให้น้ำที่ผิวของวัตถุระเหยและถ่ายเทไปยังอากาศที่ไหลผ่านทำให้ผลิตภัณฑ์มีความชื้นลดลง (วาสนา กิตติกนกรัตน์, 2546) วิธีการทำแห้งมีหลายวิธีดังนี้

ก. การอบแห้งแบบแช่แข็ง (freeze drying) ทำโดยการแช่แข็งเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการอบแห้งก่อน แล้วจึงนำไปอบแห้งด้วยการระเหิดที่อุณหภูมิและความดันต่ำ (สุญญากาศ) เพื่อทำให้น้ำในวัตถุระเหิดออกไป วิธีการนี้เหมาะสมกับผลิตภัณฑ์ที่ไม่สามารถทำให้แห้งได้ด้วยความร้อน หรือเสื่อมเสียได้ง่าย แต่จะมีข้อเสีย คือ ต้นทุนของการผลิตจะสูงและใช้เวลาในการอบแห้งนานจึงไม่นิยมใช้ในระดับอุตสาหกรรม (Gardiner *et al.*, 2002)

ข. การอบแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบด (fluidized-bed drying) เป็นการทำแห้งโดยให้อากาศร้อนป้อนเข้าทางตอนล่างของตะแกรง ทำให้ของแข็งที่ต้องการอบแขวนลอยอยู่ในอากาศร้อน

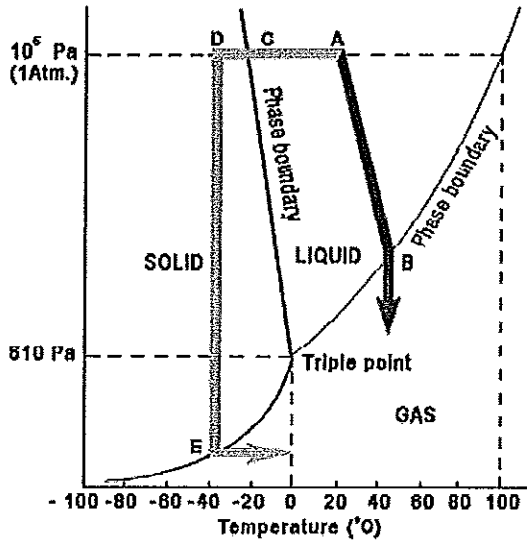
ค. การอบแห้งแบบถาดอยู่กับที่ (fixed–tray drying) โดยวัตถุที่ต้องการอบแห้งจะบรรจุอยู่ในถาดซึ่งวางซ้อนกันและมีช่องว่างของอากาศระหว่างถาด โดยปริมาณความชื้นเริ่มต้นไม่สูงมากนัก (ควรต่ำกว่า 24 เปอร์เซ็นต์) การทำแห้งแบบถาดอยู่กับที่อาจจะเกิดปัญหาการกระจายความร้อนไม่ทั่วถึง ทำให้วัตถุที่จุดต่าง ๆ แห้งไม่เท่ากัน ดังนั้นการนำวัสดุเข้าอบควรคำนึงถึงความเหมาะสมด้วย

ง. การอบแห้งแบบพ่นฝอย (spray drying) ทำโดยการพ่นของเหลวที่มีความเข้มข้น 10-20 เปอร์เซ็นต์ (wet basis) ผ่านหัวฉีด (atomizer)ให้กระจายเป็นอนุภาคที่ละเอียดเข้าไปในอากาศร้อน โดยวิธีนี้จะเป็นวิธีที่ได้รับการนิยมในระดับอุตสาหกรรม แต่เนื่องจากการทำแห้งแบบพ่นฝอยใช้อุณหภูมิที่สูงประมาณ 90-120 องศาเซลเซียสจึงทำให้อัตราการรอดชีวิตของเชื้อหลังการทำแห้งค่อนข้างต่ำ (Silva *et al.*, 2002)

การเลือกวิธีการทำแห้งขึ้นอยู่กับความต้องการผลิตภัณฑ์ในรูปแบบทางกายภาพ คุณสมบัติที่เหมาะสมกับราคา และการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป ได้มีการศึกษาเปรียบเทียบการทำแห้งเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียแลกติก ระหว่างวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง และ การทำแห้งแบบพ่นฝอย เช่นจากการศึกษาของ Wang และคณะ (2004) พบว่าเชื้อ *Streptococcus thermophilus* มีอัตราการรอดชีวิตหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง และ การทำแห้งแบบพ่นฝอยที่ 74.7-75.1 เปอร์เซ็นต์ และ5.0-16.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วน *Lactobacillus acidophilus* มีอัตราการรอดชีวิตหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง และ การทำแห้งแบบพ่นฝอย ที่ 46.2-49.8 เปอร์เซ็นต์ และ1.5-4.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Larena และคณะ (2003) ที่ได้ศึกษาการทำแห้งเชื้อ *Penicillum oxalicum* ด้วยการทำแห้ง 3 วิธีคือ การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง การทำแห้งแบบพ่นฝอย และการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์เบด และพบว่า การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ให้อัตราการรอดชีวิตของเชื้อ *Penicillum oxalicum* สูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การทำแห้งแบบพ่นฝอยให้อัตราการรอดชีวิตเพียง 20 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ดังนั้นการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งจึงเป็นวิธีที่น่าสนใจที่จะนำมาศึกษาในการเก็บรักษาเชื้อ เนื่องจากการใช้อุณหภูมิที่ไม่สูงมากนักซึ่งส่งผลให้เชื้อที่ทำแห้งมีอัตราการรอดชีวิตที่สูงกว่าการทำแห้งแบบอื่น ๆ

5.1 หลักพื้นฐานของกระบวนการทำแห้ง

หลักการพื้นฐานของกระบวนการทำแห้งชนิดต่าง ๆ สามารถอธิบายได้จากแผนภูมิสถานะ (Phase diagram) ของน้ำบริสุทธิ์ ดังแสดงดังภาพที่ 5 โดยจุด A เป็นจุดของอุณหภูมิและความดันบรรยากาศปกติ (30 องศาเซลเซียส และ 10^5 Pa) น้ำจะอยู่ในสภาวะของเหลว การทำแห้งโดยทั่วไป (Conventional Drying) จะให้พลังงานความร้อนกับผลิตภัณฑ์จนถึงระดับความร้อนแฝงของการระเหยน้ำ (Latent Heat of Evaporation) น้ำภายในผลิตภัณฑ์จะระเหยเปลี่ยนสถานะเป็นไอที่จุด B แต่การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งจะค่อย ๆ ลดอุณหภูมิของผลิตภัณฑ์จนถึงจุดเยือกแข็ง C หรือจุด D ซึ่งต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง เพื่อให้น้ำภายในผลิตภัณฑ์สร้างผลึกเปลี่ยนสถานะเป็นของแข็งได้อย่างสมบูรณ์ จากนั้นลดความดันสุญญากาศลงจนต่ำกว่าจุด E (เส้นขอบเขตของการเปลี่ยนสถานะ) เพื่อให้ผลึกน้ำแข็งภายในผลิตภัณฑ์เกิดการระเหิดเปลี่ยนสถานะเป็นไอ และในขั้นตอนสุดท้ายจึงค่อย ๆ ให้พลังงานความร้อนแฝงของการระเหิด (Latent Heat of Sublimation) ยกระดับอุณหภูมิให้สูงขึ้นเพื่อให้น้ำแข็งระเหิดเป็นไออย่างสมบูรณ์ แต่ในความเป็นจริง ปริมาณความชื้นหรือน้ำที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์ไม่ได้อยู่ในรูปของน้ำบริสุทธิ์มักจะอยู่ผสมกับสารอื่น ๆ ในรูปของตัวทำละลาย และตัวถูกละลาย ซึ่งมีผลต่อการเปลี่ยนสถานะของสาร ดังนั้นในการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งกับผลิตภัณฑ์แต่ละชนิด จึงมีข้อแตกต่าง ข้อจำกัดและมีลักษณะเฉพาะของแต่ละผลิตภัณฑ์ไม่เหมือนกัน ขึ้นอยู่กับโครงสร้างและองค์ประกอบทางเคมีของผลิตภัณฑ์นั้น ๆ (ปัณณธร ภัทรสถาพรกุล, 2547)



ภาพที่ 5 แผนภูมิสถานะของน้ำบริสุทธิ์

Figure 5 Phase diagram of water.

ที่มา : ปัณณธร ภัทรสถาพรกุล (2547)

การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งมีขั้นตอนดังนี้

1. การแช่เยือกแข็ง (Freezing) ในขั้นตอนนี้เป็นการลดอุณหภูมิของผลิตภัณฑ์จนถึงจุดเยือกแข็งหรือต่ำกว่าจุดเยือกแข็งให้น้ำหรือสารละลายเปลี่ยนสถานะเป็นของแข็งได้อย่างสมบูรณ์ สิ่งสำคัญของขั้นตอนนี้คือ ระดับความเร็วของการแช่เยือกแข็งควรเป็นการการแช่แข็งแบบเร็ว เนื่องจากผลึกที่เกิดขึ้นจะมีขนาดเล็ก และไม่ทำให้โครงสร้างของผลิตภัณฑ์เสียหาย โดยวิธีที่นิยมใช้ เช่น การจุ่มในไนโตรเจนเหลว (อุณหภูมิต่ำกว่า -80 องศาเซลเซียส) (ปัณณธร ภัทรสถาพรกุล, 2547)

2. การทำแห้งระยะที่ 1 (Primary drying) ขั้นตอนนี้เป็นการลดความดันลง เพื่อให้น้ำแข็งที่มีอยู่ภายในเกิดการระเหิดเป็นไอออกไปจากผิวหน้าของผลิตภัณฑ์ โดยเวลาของการระเหิดขึ้นอยู่กับโครงสร้างของผลิตภัณฑ์แต่ละชนิดว่ามีความโปร่งหรือแน่นเพียงใด (ปัณณธร ภัทรสถาพรกุล, 2547)

3. การทำแห้งระยะที่ 2 (Sacondary drying) ในขั้นตอนนี้เป็นการกำจัดน้ำที่อยู่ในรูปของพันธะกับสารอื่นในผลิตภัณฑ์ซึ่งไม่ตกผลึกและแข็งตัวไปกับน้ำอิสระช่วงการทำแห้งนี้เรียกว่า Desorption ขั้นตอนนี้จะเกิดขึ้นเมื่อการระเหิดของน้ำอิสระในการทำแห้งในระยะที่ 1 หมดไป โดยในการทำแห้งในระยะที่ 2 อุณหภูมิของผลิตภัณฑ์จะเพิ่มสูงขึ้นเนื่องจากการถ่ายเทความร้อนแฝงในชั้นน้ำหมดไป พลังงานจากแหล่งความร้อนจึงถ่ายเทลงสู่ผลิตภัณฑ์โดยตรง (ปัณณธร ภัทรสถาพรกุล, 2547)

5.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการรอดชีวิตของจุลินทรีย์กลุ่มโปรไบโอติกที่ทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

เนื่องจากจุลินทรีย์ในกลุ่มโปรไบโอติกจัดได้ว่าเป็นแบคทีเรียที่มีประโยชน์จึงได้มีการพัฒนาการใช้ประโยชน์ของโปรไบโอติกกันในหลาย ๆ รูปแบบ เช่น นำมาเป็นเชื้อตั้งต้นในการหมักอาหาร ใช้ผสมในอาหารสัตว์ หรือ ใช้ผลิตยาในรูปแบบต่าง ๆ แต่สิ่งที่ต้องคำนึงถึงในการผลิตคือปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่เหลือรอดในผลิตภัณฑ์ต้องมีมากพอที่จะแสดงคุณสมบัติของการเป็นโปรไบโอติก ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาเชื้อในกลุ่มโปรไบโอติกแบบผงที่ผ่านการทำแห้งเพื่อความสะดวกสบายในการใช้งาน โดยการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งเป็นการทำแห้งเชื้อที่ได้รับความสนใจ แต่การทำแห้งเชื้อในกลุ่มโปรไบโอติกด้วยวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งอาจจะมีผลต่อการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ได้ระหว่างการผลิตดังนั้นในการผลิตจึงควรคำนึงถึงปัจจัยต่าง ๆดังนี้

5.2.1 สายพันธุ์ของเชื้อที่ใช้ในการทำแห้ง

เชื้อแต่ละสายพันธุ์จะมีความสามารถในการทนต่อสภาวะการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งไม่เท่ากัน เช่นจากการทดลองของ To และ Etzel (1997) ได้ศึกษาการทำแห้งเชื้อ 3 ชนิด คือ *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* D11, *Lactobacillus casei* ssp. *pseudo-plantarum* UL137 และ

Streptococcus thermophilus CH3TH โดยใช้ Maltodextrin 30 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารป้องกันเซลล์ และพบว่า *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* D11, *Lactobacillus casei* ssp. *pseudo-plantarum* UL137 และ *Streptococcus thermophilus* CH3TH มีอัตราการรอดชีวิตของเชื้ออยู่ที่ 63, 71 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนการทดลองของ Zhao และ Zhang (2005) ที่ได้ทำแห้งเชื้อ *Lactobacillus brevis* และ *Oenococcus oeni* H-2 โดยใช้10 เปอร์เซ็นต์ซูโครสเป็นสารตัวกลาง และพบว่า *Lactobacillus brevis* และ *Oenococcus oeni* H-2 มีอัตราการรอดชีวิตที่ 45.1 และ 38.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากการทดลองทั้ง 2 การทดลองพบว่าเชื้อแต่ละสายพันธุ์จะมีผลต่อการรอดชีวิตของเชื้อ เนื่องจากเชื้อแต่ละชนิดจะมีโครงสร้างของผนังเซลล์ที่ไม่เหมือนกัน โดยผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกจะประกอบไปด้วย peptidoglycan หรือ mucopeptide คิดเป็นร้อยละ 15-20 ของน้ำหนักแห้งของผนังเซลล์ ซึ่งปริมาณของ peptidoglycan จะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ และสภาวะแวดล้อมในการเลี้ยง ดังนั้นเชื้อแต่ละสายพันธ์จะมีความสามารถในการทนต่อสภาวะในการทำแห้งได้แตกต่างกัน

5.2.2 ระยะการเจริญของเชื้อ

เชื้อที่เจริญในช่วงการเจริญแตกต่างกันมีความสามารถทนต่อสภาวะในการทำแห้งที่แตกต่างกัน โดยแบคทีเรียที่อยู่ระยะการเจริญช่วง stationary phase มักจะทนต่อสภาวะในการทำแห้งได้ดีกว่าเชื้อที่เจริญในช่วง Early log phase และ lag phase ตามลำดับ เนื่องจากเชื้อที่มีการเจริญอยู่ในช่วง stationary phase จะเป็นการเจริญในช่วงที่เชื้อมีอัตราการเจริญคงที่ และเป็นช่วงที่เชื้อผ่านสภาวะต่าง ๆ มามากกว่าช่วง Early log phase และ lag phase เช่น สภาวะในการแบ่งเซลล์ หรือสภาวะที่มีอาหารไม่เพียงพอจึงทำให้เชื้อมีความสามารถในการทนต่อสภาวะต่าง ๆ ได้ดีกว่า (Morgan *et al.*, 2006)

5.2.3 สารตัวกลางที่ใช้ในการทำแห้ง

สารตัวกลางมีความจำเป็นในการทำแห้ง เพื่อช่วยในการป้องกันเซลล์ในระหว่างการทำแห้ง โดยสารตัวกลางที่ใช้สามารถเติมลงไปในระหว่างการเจริญหรือในช่วงการทำแห้งก็ได้ โดยส่วนใหญ่สารตัวกลางที่ใช้ในการป้องกันเซลล์มักจะเป็นวัตถุเจือปนอาหาร หรือ ส่วนประกอบของอาหาร เพื่อช่วยนำพาสารที่ต้องการทำแห้งและช่วยให้เกิดการกระจายตัวอย่างทั่วถึง โดยสารที่นำมาเป็นสารตัวกลางมีมากมายหลายชนิดเช่น นมผงพร่องมันเนย กลูโคส และซูโครส ซึ่งการเลือกใช้สารตัวกลางจะขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของสารตัวกลาง โดยสารตัวกลางจะต้องไม่เป็นสารที่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค ชนิดของสารตัวกลางยังมีความสำคัญเป็นอย่างมากในการทำแห้งแบคทีเรียด้วยวิธีนี้ เช่นจากการทดลองของ Zhao และ Zhang (2005) ที่ได้ทำแห้งเชื้อ *Lactobacillus brevis* โดยใช้สารตัวกลางที่เป็นน้ำตาลชนิดต่าง ๆ คือ trehalose, lactose, maltose, sucrose, glucose และ fructose ในปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ และพบว่า *Lactobacillus brevis* มีอัตราการรอดชีวิตที่ 56.80, 47.80, 41.20, 45.10, 18.60 และ14.20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สอดคล้องกับการทดลองของ Costa และ คณะ

(2000) ที่พบว่า *Pantoea agglomerans* CPA-2 ที่ทำแห้งด้วยสารตัวกลางชนิดต่าง ๆ จะมีอัตราการรอดชีวิตที่แตกต่างกัน เช่น ถ้าใช้น้ำตาลในกลุ่มไดแซคคาไรด์ เชื้อจะมีอัตราการรอดชีวิตที่มากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ และถ้าใช้สารตัวกลางพวกโมโนแซคคาไรด์จะมีอัตราการรอดชีวิตในช่วง 30-50 เปอร์เซ็นต์

นอกจากชนิดของสารตัวกลางแล้ว ความเข้มข้นของสารตัวกลางก็มีความสำคัญเช่นกัน เช่น จากการทดลองของ Martos และคณะ (2007) ที่ทดลองทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ssp.*bulgaricus* โดยใช้โซเดียมกลูตาเมทที่ความเข้มข้น 0, 1.25, 2.5, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารตัวกลางในการป้องกันเซลล์ และพบว่า ที่ความเข้มข้นของโซเดียมกลูตาเมท 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์มีอัตราการรอดชีวิตของเชื้อสูงกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ คือมีการรอดชีวิตจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งถึง 90-95 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ความเข้มข้นของโซเดียมกลูตาเมทต่ำ ๆ มีอัตราการรอดชีวิตที่ 50-80 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น

จากข้างต้นสรุปได้ว่าสารตัวกลางที่ใช้ในการทำแห้งจะมีส่วนช่วยให้เชื้อที่ต้องการทำแห้งมีอัตราการรอดชีวิตที่สูงขึ้น โดยสารตัวกลางที่นิยมใช้ในการทดลองคือนมผงพร่องมันเนย และได้มีการศึกษาการใช้สารตัวกลางอื่น ๆ มาผสมกับนมผงพร่องมันเนยเพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการรอดชีวิตของเชื้อให้เพิ่มมากขึ้น แต่ในการเลือกใช้สารตัวกลางควรเลือกใช้ให้เหมาะกับกาที่จะนำเชื้อผงแห้งนั้น ๆ ไปประยุกต์ใช้ คือหากเชื้อที่ทำแห้งนั้นใช้ในอาหารควรมั่นใจว่าสารตัวกลางที่เลือกใช้จะไม่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค โดยสารตัวกลางอื่น ๆที่ได้นำมาศึกษาในการทำแห้งผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกที่ใช้เป็นอาหารสัตว์ได้แก่

5.2.3.1 ซีโอไลท์ (Zeolite)

เป็นสารอินทรีย์ในธรรมชาติ เป็นซิลิเกตของอะลูมิเนียม และ โซเดียม ได้ชื่อว่าเป็น molecular sieve เนื่องจากโมเลกุลมีช่องว่างที่สม่ำเสมอมาก นิยมนำมาผสมในอาหารสัตว์หลายชนิด ทำให้อาหารไม่รวมตัวเป็นก้อน

5.2.3.2 ทัลคัม (Talcum)

ทัลคัม (hydrated magnesium silicate) ($Mg_3Si_4O_{10}.(OH)_2$) ผลิตได้จากการเอาแร่ทัลค์ ซึ่งเป็นแร่จำพวกหนึ่งของแป้งมาผ่านขั้นตอนการบดละเอียด โดยส่วนประกอบของทัลค์จะขึ้นกับแหล่งที่ผลิต และ ผิวหน้าเรียบเป็นแผ่นอยู่รวมกันด้วยแรง Van Der Waals ที่อ่อนมาก สามารถทำให้แยกออกจากกันด้วยแรงเฉือนเพียงเล็กน้อย คุณสมบัติของทัลคัมคือ มีความอ่อนนุ่ม ดูดซับน้ำมันได้ดี มีความชื้นต่ำ ทนต่อพีเอช และ มีจุดหลอมเหลวสูง โดยในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์มีการเติมทัลคัมลงไปเพื่อเป็นแหล่งแร่ธาตุเนื่องจากทัลคัมประกอบด้วยแร่ธาตุต่าง ๆเช่น แมกนีเซียมร้อยละ 25 ซิลิคอนไดออกไซด์ 50 เปอร์เซ็นต์ เหล็ก 0.3 เปอร์เซ็นต์ และคลอไรด์ 0.5 เปอร์เซ็นต์

5.2.3.3 แคลเซียมคาร์บอเนต (Calcium carbonate)

แคลเซียมคาร์บอเนต หรือ หินปูนมีลักษณะเป็นผงสีขาวหรืออาจมีสีอื่น ๆ ด้วย โดยทั่วไปจะมีขนาด 2.5 ไมครอน มีน้ำหนักโมเลกุล 100.09 และมีความชื้นประมาณ 0.2 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าได้มีการนำแคลเซียมคาร์บอเนตมาใช้ในอาหารเพื่อจุดประสงค์ต่าง ๆ เช่น ปรับค่าพีเอช ทำให้อาหารมีสีขาวนวล มีความคงรูป และ มีการนำมาเสริมในอาหารสัตว์เพื่อเป็นแหล่งแคลเซียม

ได้มีรายงานว่า Manosroi (1998) นำซีโอไลท์มาใช้เป็น carrier ในการทำแห้งเชื้อจุลินทรีย์ เช่น *B.subtilis* ซึ่งสอดคล้องกับ วาสนา กิตติกนกรัตน์ (2546) ที่พบว่าการเก็บรักษาเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR001 โดยใช้ซีโอไลท์ในอัตราส่วนน้ำหมัก:ซีโอไลท์ที่ 1:5 เป็นสารตัวกลาง และทำแห้งแบบถาดอยู่กับที่ (fixed-tray drying) ที่อุณหภูมิ 120 และ150 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อมีอัตราการรอดชีวิตสูง และผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้มีอายุการเก็บรักษา 14 เดือน

นอกจากปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการทำแห้ง ผลิตภัณฑ์ที่ได้ควรเก็บรักษาไว้ในภาชนะบรรจุและอุณหภูมิในการเก็บรักษาที่เหมาะ ภายหลังจากการทำแห้งแล้วการเลือกภาชนะที่ใช้บรรจุก็เป็นปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการรอดชีวิตของเชื้อแบคทีเรียโดยภาชนะบรรจุที่เลือกใช้ควรป้องกันการซึมผ่านของอากาศ ความชื้นแสง และ การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการได้ เช่น การทดลอง ของ Wang และ คณะ(2004) ได้ทำแห้งเชื้อ *Streptococcus thermophilus* และมาแบ่งเก็บในภาชนะต่าง ๆ คือ ถุงเคลือบ (laminated pouch) ขวดแก้ว (glass bottles) และ ขวดพลาสติก (PET bottles) และทำการเก็บรักษาไว้ที่ 4 และ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 เดือน และพบว่า การเก็บรักษาเชื้อ *Streptococcus thermophilus* ไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสใน ถุงเคลือบ ขวดแก้ว และ ขวดพลาสติก ให้อัตราการรอดชีวิตที่ 51.1, 44.6 และ 32.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนการเก็บรักษาที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่ามีอัตราการรอดชีวิตที่ 38.3, 33.1 และ 23.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากการทดลองนี้จะพบว่า ถุงเคลือบจะให้อัตราการรอชีวิตของเชื้อได้สูงที่สุดทั้งในการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 และ 25 องศาเซลเซียส เนื่องจากการซึมผ่านของอากาศเข้าไปยังภายในภาชนะบรรจุในระหว่างการเก็บรักษาจะมีผลต่อการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ (Ishibashi and Shimamura, 1993) โดยพบว่าขวดพลาสติก (PET bottles) มีอัตราการซึมผ่านของอากาศได้สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับถุงเคลือบ (laminated pouch) หรือ ขวดแก้ว (glass bottles) ดังนั้นจึงทำให้เชื้อแบคทีเรียที่เก็บในขวดพลาสติก (PET bottles) มีอัตราการรอดชีวิตของเชื้อที่ต่ำที่สุดและ การเก็บรักษาเชื้อไว้ที่อุณหภูมิที่ต่ำกว่าจะให้อัตราการรอดชีวิตของเชื้อที่สูงกว่าการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิสูง ๆ

การทำละลายเชื้อที่ผ่านการทำแห้งถือเป็นขั้นตอนที่สำคัญเนื่องจากเชื้อที่ผ่านการทำแห้งและเก็บรักษาไว้อาจจะไม่แข็งแรงมากเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ผ่านการทำแห้งดังนั้นหากนำมาทำละลายด้วยวิธีที่ไม่เหมาะสมก็อาจจะทำให้เซลล์ตายได้ เช่น Zhao and Zhang (2005) ที่ได้ทำแห้ง *Lactobacillus brevis* และใช้ตัวทำละลายต่าง ๆ กันเช่น สารละลายกลูโคส 10 เปอร์เซ็นต์,

สารละลายแลกโตส 10 เปอร์เซ็นต์, สารละลายมอลโตส 10 เปอร์เซ็นต์, สารละลายโซเดียมกลูตาเมท 5 กรัมต่อลิตร, สารละลายแมงกานีสคลอไรด์ 2 กรัมต่อลิตร, สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 2 กรัมต่อลิตร, อาหารเลี้ยงเชื้อ MGY, ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และน้ำกลั่น พบว่าเชื้อมีอัตราการรอดชีวิตที่ 57.7, 51.8, 52.0, 48.3, 44.1, 51.6, 44.9, 46.1 และ 37.4 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ โดยพบว่าสารประกอบพวกน้ำตาลจะให้อัตราการรอดชีวิตที่สูงที่สุดในการทดลองนี้ นอกจากชนิดของตัวทำละลายแล้วอุณหภูมิของตัวทำละลายก็มีผลต่อการรอดชีวิตของเชื้อเช่นกัน จากการทดลองของ Wang และ คณะ (2004) ได้ทำแห้งเชื้อ *Streptococcus thermophilus* หลังจากนั้นได้นำผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการทำแห้ง มาทดสอบผลจากอุณหภูมิของสารละลายที่มีต่อการรอดชีวิตของเชื้อที่ผ่านการทำแห้ง โดยจะนำตัวอย่างที่ผ่านการทำแห้งมาละลายในสารละลายเปปโตนที่มีอุณหภูมิ 5, 15, 20, 35 และ 50 องศาเซลเซียส พบว่าปริมาณเชื้อ *S. thermophilus* ที่อุณหภูมิการละลายที่ 5, 15, 20, 35 และ 50 มีค่า 7.87, 7.98, 8.08, 7.89 และ 7.80 Log CFU/ml ตามลำดับ โดยที่อุณหภูมิต่ำ ๆ จะส่งผลให้ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิตลดลง เนื่องจาก การใช้สารละลายที่อุณหภูมิต่ำจะทำให้ผนังเซลล์แตกได้ง่าย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของการใช้เชื้อผสมของแบคทีเรียแลกติก, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 ต่อการเจริญ และอัตราการรอดชีวิตของกุ้งขาว
2. เพื่อพัฒนาหัวเชื้อผสมในรูปแบบผงโดยใช้ตัวกลางชนิดต่าง ๆ และศึกษาอัตราการรอดชีวิตของเชื้อผสมในผลิตภัณฑ์และอายุการเก็บรักษา
3. เพื่อศึกษาการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกที่เป็นเชื้อผสมของแบคทีเรียแลกติก, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9

บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัสดุ อุปกรณ์

1. กุ้งขาวที่ใช้ในการทดลอง

กุ้งขาว (*Litopenaues vannamei*) ที่ใช้ในการทดลองเป็นกุ้งขาวอายุ 30 วัน ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากฟาร์มคุณอุดร ไสลเพชร อำเภอสิเกา จังหวัดตรัง โดยเลือกใช้กุ้งขาวที่ปราศจากโรคตัวแดงดวงขาว และโรคเรืองแสง (วิเคราะห์โดยศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์)

2. จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ

จุลินทรีย์	แหล่งที่แยก
Lactobacillus plantarum MRO3.12	ทางเดินอาหารของกุ้ง (ขนิษฐา คงนุ่ม, 2550)
Candida tropicalis TH112	ฟองน้ำบริเวณเกาะเต่า (ทิพรัตน์ หงภัทรคีรีและ กิจการ ศุภมาตย์, 2548)
Pseudozyma antarctica TH9	ทางเดินอาหารปลาทู (ทิพรัตน์ หงภัทรคีรีและ กิจการ ศุภมาตย์, 2548)
Vibrio harveyi	กุ้งกุลาดำที่เป็นโรคเรืองแสง ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ คณะทรัพยากรธรรมชาต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
แบคทีเรียแลกติก 186 สายพันธุ์	ทางเดินอาหารของสัตว์ทะเล (ศิริพร ทวีโรจนการ, 2550; ขนิษฐา คงนุ่ม, 2550)

3. สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

Chemical and Media	Grade / Company
1. Man Rogosa and Sharpe (MRS)	Analytical/Himedia, India
2. Thiosulfate citrate bile salt (TCBS)	Analytical/Himedia, India
3. Sodium Chloride	Analytical Labscan, Thailand
4. Yeast extract	Analytical/Labscan, Thailand
5. Malt extract	Analytical/Himedia, India
6. Soytone	Analytical/Himedia, India
7. Tryptone	Analytical/Labscan, Thailand
8. D-Glucose	Analytical/Ajex Finechem, Australia
9. Proteose peptone	Analytical/Merck, Germany
10. Peptone water	Analytical/Himedia, India
11. Beef extract	Analytical/Himedia, India
12. Tween 80	Analytical/Ajex Finechem, Australia
13. Ammonium citrate	Analytical/Ajex Finechem, Australia
14. Sodium acetate	Analytical/Ajex Finechem, Australia
15. Magnesium sulphate	Analytical/Ajex Finechem, Australia
16. Manganese sulphate	Analytical/Ajex Finechem, Australia
17. Dipotassium phosphate	Analytical/Ajex Finechem, Australia
18. Talcum	Commercial/China
19. Zeolite	Commercial/Thailand
20. Calcium carbonate	Commercial/Thailand
21. Skim milk powder	Analytical/Fluka, Switzerland
22. Bromocresol purple	Analytical/Ajex Finechem, Australia
23. Chloramphenicol	Analytical/ Sigma, Germany
24. Tributyrin	Analytical/Fluka, Switzerland
25. Starch soluble	Analytical/Ajex Finechem, Australia
26. Calcium hypochlorite 65%	Commercial/Thailand

4. อุปกรณ์

อุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต, ประเทศ
1. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ยี่ห้อ Memmert รุ่น BE500	Schwabach, Germany
2. ตู้ถ่ายเชื้อ (Larminar air flow cabinet) ยี่ห้อ Hotpack	Scientific promotion, USA
3. ไมโครปิเปต (ขนาด 10-100 ไมโครลิตร)	Labmate, USA
4. ไมโครปิเปต (ขนาด 1000 ไมโครลิตร)	Gilson, France
5. Stirring hot plate ยี่ห้อ Harmony รุ่น HTS-1003	
6. ตู้อบแรงดันไอน้ำ (Autoclave) รุ่น SS-325	Tomy Seiko, Japan
7. Centrifuge ยี่ห้อ eppendrof รุ่น 5403	Germany
8. Centrifuge SCR-20B	Hitachi, Japan
9. Electronic balance (ทศนิยม 2 ตำแหน่ง) รุ่น BP2100S	Mettier Toledo, USA
10. Electronic balance (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) รุ่น BP221S	Satorious, USA
11. Vortex Mixer	Labnet, USA
12. พีเอชมิเตอร์ (pH meter) รุ่น Metter Toledo 320	Mettier Toledo, USA
13. อ่างควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ Memmert รุ่น WB 14	Schwabach, Germany
14. เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง Dura Dry	FTS systems, USA
15. เครื่องปิดผนึกภาชนะยืดหยุ่นแบบสุญญากาศ	Henko, Japan
16. เครื่องปิดผนึกปากถุง	Yamadako Brand, Japan
17. ถุงอะลูมิเนียมฟอยล์ เคลือบ 3 ชั้น	

5. วิธีการวิจัย

5.1 การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีความสามารถในการย่อยเคซีน แป้ง และ ไขมัน (มณฑกานต์ ทองสม, 2547)

5.1.1 ความสามารถในการย่อยเคซีน

ปิเปตสารแขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่เตรียมตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 1.1 (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 5 ไมโครลิตรหยดลงบนอาหาร MRS agar ที่มีนมผงพร่องมันเนย 2 เปอร์เซ็นต์แทนการใช้กลูโคส หลังจากนั้นบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วตรวจดูความสามารถของเชื้อในการย่อยเคซีนซึ่งจะเกิดวงใสรอบ ๆ โคโลนีที่หยดเชื้อลงไป

5.1.2 ความสามารถในการย่อยแป้ง

ปิเปตสารแขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่เตรียมตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 1.1 (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 5 ไมโครลิตรหยดลงบนอาหาร MRS agar ที่มี soluble starch 2 เปอร์เซ็นต์ แทนการใช้กลูโคส หลังจากนั้นบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบโดยการนำเกล็ดไอโอดีนมาวางบนผา plate และคว่ำไว้ให้ไอของไอโอดีนไปทำปฏิกิริยากับแป้งในอาหารเลี้ยงเชื้อ ตรวจเชื้อที่สามารถย่อยแป้งซึ่งจะเกิดวงใสรอบ ๆ โคโลนีที่หยดเชื้อลงไป

5.1.3 ความสามารถในการย่อยไขมัน

ปิเปตสารแขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่เตรียมตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 1.1 (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 5 ไมโครลิตรหยดลงบนอาหาร MRS agar ที่มี tributyrin 1 เปอร์เซ็นต์ แทนการใช้กลูโคส หลังจากนั้นบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วตรวจดูการเจริญโดยเชื้อที่สามารถย่อยไขมันซึ่งจะเกิดวงใสรอบ ๆ โคโลนีที่หยดเชื้อลงไป

ทำการจดบันทึกความสามารถในการย่อยเคซีน แป้ง และ ไขมัน โดยแบ่งเป็น

- คือ ไม่มีวงใสรอบ ๆ โคโลนี
+ คือ มีวงใสรอบ ๆ โคโลนี ขนาด 1-2 มิลลิเมตร
++ คือ มีวงใสรอบ ๆ โคโลนี ขนาด 3 มิลลิเมตรขึ้นไป

5.2 ผลของการใช้เชื้อโปรไบโอติกผสมของ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 ต่อการควบคุมการเจริญของ *Vibrio harveyi*

การทดสอบความสามารถในการควบคุมการเจริญของ *Vibrio harveyi* โดยการใช้เชื้อโปรไบโอติกผสมของ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 ทำได้โดยเตรียมหัวเชื้อโปรไบโอติกแต่ละชนิด และ *Vibrio harveyi* ตามวิธีวิเคราะห์ในข้อ 1 (ภาคผนวก ข) จากนั้นนำมาปรับความเข้มข้นของเชื้อด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ที่ปลอดเชื้อ เพื่อให้ได้ปริมาณเชื้อเป็น 1.79-2.15x10^7, 4.2-5.1x10^7, 1.2-1.72x10^7 และ 1.32-1.82x10^7 CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และนำหัวเชื้อแต่ละชนิดที่ผ่านการปรับความเข้มข้นแล้วนี้ปริมาณเชื้อละ 0.1 มิลลิลิตร เติมลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ YM broth, MRS broth และ TSB broth ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ในสัดส่วน 1:1:1 ปริมาตร 9.6 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้จำนวนเชื้อเริ่มต้นเป็น 1.79-2.15x10^5, 4.2-5.1x10^5, 4.2-5.1x10^5 และ 1.32-1.82x10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะเดียวกันเตรียมชุดควบคุมที่มีเฉพาะเชื้อเพียงชนิดเดียวของ เชื้อแต่ละชนิด ที่ผ่านการปรับความเข้มข้นเป็น 1.88-2.16x10^7, 4.8-5.6x10^7, 1.44-1.67x10^7 และ 2.7-3.4x10^7 CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในปริมาตรเชื้อละ 0.1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ YM broth, MRS broth และ TSB broth ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ใน

สัดส่วน 1:1:1 ปริมาตร 9.9 มิลลิลิตร ทำให้ได้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเป็น 1.88-2.16x10^5, 4.8-5.6x10^5, 1.44-1.67x10^5 และ 2.7-3.4x10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยแต่ละชุดการทดลองทำ 2 ซ้ำ หลังจากนั้นบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 6, 12, 18, 24 และ 48 ชั่วโมง และนับจำนวนของ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 และ *Vibrio harveyi* ตามวิธีวิเคราะห์ในข้อ 2.1, 2.2 และ 2.3 (ภาคผนวก ข) ตามลำดับ

เพื่อเป็นการยืนยันว่าบนอาหาร MRS agar จะมีเพียง *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 เจริญ ส่วนอาหาร YM agar จะมีเพียง *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 เจริญได้เท่านั้น ส่วนบนอาหาร TCBS agar จะมีเพียง *Vibrio harveyi* เท่านั้นที่เจริญได้ ดังนั้นจึงได้มีการทดสอบการเจริญของเชื้อ *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9 และ *Vibrio harveyi* บนอาหาร MRS agar, ทดสอบการเจริญของ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 และ *Vibrio harveyi* บนอาหาร YM agar และ ทดสอบการเจริญของ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 บนอาหาร TCBS agar โดยการทำการทดลองตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 3, 4 และ 5 (ภาคผนวก ข)

5.3 ผลของการใช้ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 ร่วมกับ ยีสต์ *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 ต่อการเจริญ อัตราการรอดชีวิต และ ภาวะภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว

5.3.1 การเตรียมและผสมเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารกุ้ง

ถ่าย *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 ที่ได้จากการเตรียมหัวเชื้อตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 1.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตรใส่ลงไปในอาหารเหลว MRS ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และล้างด้วย โซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ที่ปลอดเชื้อ จำนวน 1 ครั้งและนำมาปรับให้ได้ปริมาณเชื้อ 1.23-1.87x10^{10} CFUต่อมิลลิลิตร ด้วย โซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ที่ปลอดเชื้อ ปริมาตร 6 มิลลิลิตร ผสมในอาหารกุ้งจำนวน 150 กรัม

ถ่ายยีสต์ *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 ที่เตรียมตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 1.2 ปริมาตร 50 มิลลิลิตรใส่ลงไปในอาหาร YM ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 450 มิลลิลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง (เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที) หลังจากนั้นนำมาเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และล้างด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ที่ปลอดเชื้อจำนวน 1 ครั้งและนำมาปรับให้ได้ปริมาณเชื้อ 1.20-1.67 x10^{10} CFUต่อ

มิลลิลิตร และ 1.13-2.13 x10^{10} CFUต่อมิลลิลิตร ของ *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 ตามลำดับ ด้วย โซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ที่ปลอดเชื้อ ปริมาตร 6 มิลลิลิตร ผสมในอาหารกุ้งจำนวน 150 กรัม โดยทดลองเปรียบเทียบกับชุดควบคุม คืออาหารกุ้งที่ไม่มีการเติม *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 แต่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ที่ปลอดเชื้อ ปริมาตร 6 มิลลิลิตร ผสมในอาหารกุ้งจำนวน 150 กรัม หลังจากนั้นนำเซลล์แขวนลอยของ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 และโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ มาผสมกับอาหารเม็ดที่ใช้ในการเลี้ยงกุ้ง (ออลสตาร์ ฟีด 304 บริษัทเอเชี่ยน ฟีด จำกัด) ปริมาณ 150 กรัมด้วยวิธีการสเปรย์ด้วยกระบอกฉีด และคลุกผสมให้เข้ากัน (ใช้อัตราส่วนของเซลล์แขวนลอยและอาหารกุ้งในอัตราส่วน 1 มิลลิลิตรต่ออาหารกุ้ง 25 กรัม) (ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์, 2539) จากนั้นเคลือบทับอาหารกุ้งด้วยน้ำมันปลาทูน่าปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร (อัตราส่วนน้ำมันปลาทูน่า 10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม) เพื่อให้เชื้อเกาะติดบนอาหารเม็ด และทำการเก็บอาหารเม็ดใส่ในขวดพลาสติกฝาเกลียวที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยแบ่งเก็บตามชุดการทดลองต่าง ๆ

หลังจากการผสมเชื้อกับอาหารแล้วให้เก็บตัวอย่างอาหารในแต่ละชุดการทดลองจำนวน 25 กรัม ตรวจนับเชื้อในแต่ละชุดการทดลอง โดยนำตัวอย่างอาหารกุ้ง 25 กรัม ใส่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เจือจางตัวอย่างด้วย โซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ที่ปลอดเชื้อจนได้ความเข้มข้นที่ 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} จากนั้น spread plate บนอาหาร MRS agar ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ และ bromocresol purple 0.02 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อนับจำนวน *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 และ spread plate บนอาหาร YM agar ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ และคลอแรมฟีนิคอล 0.01 เปอร์เซ็นต์บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อตรวจนับ *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9

เตรียมอาหารทุก ๆ 3 วันโดยเตรียมอาหารครั้งละ150 กรัมต่อชุดการทดลอง

5.3.2 การเตรียมน้ำทะเล และการเตรียมตู้เลี้ยงกุ้ง

เตรียมน้ำทะเลโดยใช้น้ำทะเลที่มีความเค็ม 33 พีพีที เจือจางให้ได้ความเค็ม 26-28 พีพีที ด้วยน้ำประปาที่พักไว้ในบ่อพักน้ำเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เติมแคลเซียมไฮเปอร์คลอไรด์ผงลงไป 25 กรัมต่อน้ำทะเล 1 ตันจะได้ความเข้มข้นของคลอรีนเท่ากับ 16.25 พีพีเอ็ม หลังจากนั้นพักน้ำทิ้งไว้ 2 วัน เพื่อให้คลอรีนที่ตกค้างสลายตัว ตรวจสอบโดยการหยดสารละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ลงไปในตัวอย่างน้ำทะเลที่เตรียมไว้ ถ้าตัวอย่างน้ำทะเลเปลี่ยนสีเป็นสีเหลืองแสดงว่ายังมีคลอรีนตกค้างเหลืออยู่ หลังจากการทดสอบนำน้ำทะเลที่เจือจางแล้วในตู้สำหรับเลี้ยงกุ้งขาวขนาด 60 x 120 x 60 เซนติเมตร ประมาณ 3 ใน 4 ส่วนของตู้ ทำการตรวจสอบคุณสมบัติของน้ำได้แก่ความเค็ม และ

อุณหภูมิในระหว่างการทดลอง และใส่หัวทรายเพื่อให้อากาศในตู้สำหรับเพาะเลี้ยงกุ้งทุกตู้ ตู้ละ 2 หัว เพื่อเพิ่มอากาศตลอดเวลารวมถึงใส่ตาข่ายไนลอนลงในตู้สำหรับเลี้ยงกุ้งเพื่อให้กุ้งขาวเกาะในระหว่างการเลี้ยง

5.3.3 การเตรียมกุ้งขาวเพื่อการทดลอง

กุ้งขาวที่ใช้ในการทดลองเป็นกุ้งขาวที่มีอายุประมาณ 30 วัน คัดเลือกกุ้งขาวที่มีน้ำหนักเฉลี่ยอยู่ที่ 4.92–5.90 กรัมต่อตัว โดยก่อนการทดลองจะนำกุ้งขาวมาส่งวิเคราะห์ที่ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ คณะทรัพยากรธรรมชาติ เพื่อตรวจโรคตัวแดงดวงขาว และโรคเรืองแสง หลังจากการตรวจวิเคราะห์ว่าปราศจากเชื้อแล้ว ทำการขนส่งกุ้งขาวจำนวน 700 ตัว โดยใช้ถังขนาด 200 ลิตร ใส่น้ำจากบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งขาวประมาณ 100 ลิตร และแบ่งกุ้งขาวใส่ถังประมาณถังละ 150-200 ตัว และทำการให้ออกซิเจนโดยการต่อหัวทรายทุกถัง นอกจากนั้นให้ใส่ใบไม้ที่ไม่มียาง เช่น ใบหูกวาง เพื่อให้กุ้งขาวยึดเกาะในระหว่างการขนส่ง หลังจากการขนส่งให้คัดเลือกกุ้งขาวที่ตายออก และนำกุ้งขาวที่รอดชีวิตมาอนุบาลต่อในบ่อซีเมนต์ที่ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำคณะทรัพยากรธรรมชาติ เป็นเวลา 7 วัน เพื่อให้กุ้งสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาวะแวดล้อม ก่อนเริ่มการทดลองให้คัดเลือกกุ้งขาวที่มีขนาดและน้ำหนักใกล้เคียงกัน โดยการสุ่มกุ้งขาวขึ้นมา 30 ตัว จากนั้นซับน้ำที่ตัวกุ้งขาวให้แห้ง แล้วนำกุ้งขาวไปชั่งน้ำหนักด้วยวิธีแทนที่น้ำ คำนวณหาน้ำหนักของกุ้งขาว หลังจากนั้นนำกุ้งขาวไปใส่ในตู้ที่เตรียมไว้จำนวน 25 ตู้ ตู้ละ 30 ตัว พักกุ้งขาวไว้ประมาณ 4 ชั่วโมง แล้วจึงให้กุ้งกินอาหารเม็ดธรรมดา (ออลสตาร์ฟีด 304 เอส บริษัทเอเชี่ยน ฟีด จำกัด) ที่ไม่มีการผสม *Lactobacillus plantarum* MRO31.2, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 เพื่อให้กุ้งขาวได้ปรับตัวให้เข้ากับสภาวะแวดล้อมในตู้ทดลองก่อนเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง แล้วจึงเริ่มให้อาหารที่ผสมโปรไบโอติกเพื่อศึกษาต่อไป

5.3.4 ผลของการใช้โปรไบโอติกต่อการเจริญ อัตราการรอดชีวิต และ ภาวะภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว

ศึกษาการใช้ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 ร่วมกับ ยีสต์ *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 เพื่อดูผลของโปรไบโอติกที่มีต่อการเจริญ การรอดชีวิต และภาวะภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว โดยให้กุ้งขาวกินอาหารที่ผสมโปรไบโอติกในกลุ่มต่าง ๆ เปรียบเทียบกับกุ้งขาวที่ได้รับอาหารธรรมดาไม่ผสมโปรไบโอติก โดยจะแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 5 ชุดการทดลอง (ทุกชุดการทดลองทำ 5 ซ้ำ) ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 กุ้งขาวที่ได้รับอาหารเม็ดที่ผสม *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 ในปริมาณ 1.23-1.87 x10^8 CFU ต่อกรัมอาหาร

ชุดการทดลองที่ 2 กุ้งขาวที่ได้รับอาหารเม็ดที่ผสม *Candida tropicalis* TH112 ในปริมาณ 1.20-1.67 x10^8 CFU ต่อกรัมอาหาร

ชุดการทดลองที่ 3 กุ้งขาวที่ได้รับอาหารเม็ดที่ผสม *Pseudozyma antarctica* TH9 ในปริมาณ 1.13-2.13 x10^8 CFU ต่อกรัมอาหาร

ชุดการทดลองที่ 4 กุ้งขาวที่ได้รับอาหารเม็ดที่ผสม *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 ในปริมาณ 1.23-1.87 x10^8, 1.20-1.67 x10^8 และ1.13-2.13 x10^8 CFU ต่อกรัมอาหาร ตามลำดับ

ชุดการทดลองที่ 5 กุ้งขาวที่ได้รับอาหารเม็ดที่ผสม 1.5 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์ที่ปราศจากเชื้อ

โดยให้อาหารแก่กุ้งขาวประมาณ 4-6 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว และให้กุ้งขาวกินอาหารวันละ 4 มื้อ คือที่เวลา 6:00 น. 12:00 น. 18:00 น. และ 24:00 น. เป็นเวลา 6 สัปดาห์ และเปลี่ยนถ่ายน้ำทะเล ล้างตาข่าย ดูดเศษอาหารและขี้กุ้งทิ้งทุก ๆ 2 วัน ตรวจสอบและบันทึกคุณสมบัติของน้ำทะเล ได้แก่ ความเค็ม ค่าพีเอช และอุณหภูมิ ในระหว่างการเพาะเลี้ยง เมื่อเลี้ยงกุ้งขาวครบ 6 สัปดาห์จะชั่งน้ำหนักรวมของกุ้งขาวอีกครั้งด้วยวิธีแทนที่น้ำ คำนวณน้ำหนักกุ้งที่เพิ่มขึ้น, อัตราการรอดชีวิต, วิเคราะห์ปริมาณเม็ดเลือดรวม, นับจำนวนเชื้อ และทดสอบภาวะภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว โดยการทดสอบความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียก่อโรคออกจากระบบไหลเวียน และ ความสามารถในการต้านทานเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ดังต่อไปนี้

ก. การวัดค่าการเจริญเติบโต และอัตราการรอดชีวิตของกุ้งขาว

วัดการเจริญ และอัตราการรอดชีวิตของกุ้งขาวโดยการชั่งน้ำหนักรวมและนับจำนวนของกุ้งที่รอดชีวิต เมื่อเริ่มต้นการทดลอง และเมื่อเลี้ยงกุ้งขาวครบ 6 สัปดาห์ รวมถึงชั่งน้ำหนักของอาหารกุ้งที่กุ้งขาวในแต่ละชุดการทดลองกินในแต่ละตู้ทุกวัน และนำค่ามาวิเคราะห์หาน้ำหนักเฉลี่ย น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการรอดชีวิต และ อัตราการแลกเนื้อของกุ้งขาว ตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 6 (ภาคผนวก ข)

ข. วิเคราะห์ปริมาณเม็ดเลือดรวมในเลือดกุ้ง

เก็บตัวอย่างเลือดกุ้ง (ใช้กุ้งขาวจำนวน 15 ตัว ชุดการทดลองละ 3 ตัวอย่าง) โดยใช้เข็มฉีดยาขนาด 1 ซีซี และหัวเข็มขนาด 25 G ความยาว 12 มิลลิเมตร เจาะเลือดจากโคนขาเดินคู่ที่ 3 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร นำเลือดกุ้งมาเจือจางในอัตราส่วน 1:10 ด้วยสารละลายไตรแพนบลู 1 เปอร์เซ็นต์ ที่เตรียมในสารละลายเกลือแกง 1.5 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์ นำมานับจำนวนเม็ดเลือดโดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ คำนวณปริมาณเม็ดเลือดที่นับได้เป็นจำนวนเซลล์ ต่อลบ.ซม. (Supamattaya *et al.*, 2000) ตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 7 (ภาคผนวก ข)

ค. การนับจำนวนแบคทีเรียแลกติก, ยีสต์, *Vibrio* sp. และจุลินทรีย์ทั้งหมดในระบบทางเดินอาหารของกุ้งขาว

การติดตามจำนวนแบคทีเรียแลกติก, ยีสต์, *Vibrio* sp. และจุลินทรีย์ทั้งหมด เมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 6 สัปดาห์ โดยการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียแลกติกทั้งหมด ยีสต์ทั้งหมด *Vibrio* sp. และจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในทางเดินอาหารของกุ้งขาว โดยนำกุ้งขาวจากข้อ 2.5.3 ในทุกชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 3 ตัว มาฆ่าเชื้อที่ผิวนอกโดยการเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วล้างด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ที่ปลอดเชื้อหลังจากนั้นใช้มีดผ่าตัดที่ปราศจากเชื้อผ่ากลางลำตัวกุ้งขาว และเลาะเอาส่วนตับและทางเดินอาหารออกมาใส่ในหลอดทดลองแล้วผสมกับ โซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ที่ปลอดเชื้อ และใช้ช้อนสแตนเลสที่ผ่านการฆ่าเชื้อบดตัวอย่างตับ และทางเดินอาหารให้ละเอียดจากนั้นเจือจางที่ระดับ 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} และ 10^{-6} แล้วนำมาตรวจนับจำนวนแบคทีเรียแลกติก, จำนวนยีสต์, จำนวน *Vibrio* sp. และ จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด ตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 2 (ภาคผนวก ข)

ง. การทดสอบความต้านทานเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* (Challenge test)

เมื่อครบระยะเวลา 6 สัปดาห์นำกุ้งจากข้อ 5.3.4 จากทุกชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 70 ตัว มาทดสอบความต้านทานเชื้อ *Vibrio harveyi* โดยแบ่งกุ้งในแต่ละชุดการทดลองออกเป็น 2 กลุ่มกลุ่มละ 35 ตัว ทำให้กุ้งติดเชื้อ *Vibrio harveyi* วิธีดังต่อไปนี้ด้วย

1. การฉีด *Vibrio harveyi* เข้าระบบเลือดกุ้งโดยตรง เตรียมสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียสำหรับฉีดเข้ากุ้งทดลองโดยใช้ *Vibrio harveyi* บริสุทธิ์ที่เลี้ยงในอาหาร TSB ที่เตรียมจากน้ำทะเล บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เจือจางเชื้อด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ที่ปลอดเชื้อให้ได้จำนวนเชื้อเริ่มต้น 1.98-2.91x 10^5CFU ต่อมิลลิลิตร นำไปฉีดเข้าตัวกุ้งที่บริเวณกล้ามเนื้อท้องปล้องสุดท้ายโดยฉีดตัวละ 0.1 มิลลิลิตร และฉีดโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ที่ปลอดเชื้อ ในชุดควบคุมปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร แทนการฉีดเชื้อ *Vibrio harveyi* โดยใช้จำนวนกุ้งถังละ 10 ตัวสังเกตและบันทึกอัตราการตายหลังฉีดเชื้อทุก 24 ชั่วโมงเป็นระยะเวลา 10 วัน (มณฑกานต์ ทองสม, 2547)

2. การใส่ *Vibrio harveyi* ในถังทดลอง โดยนำสารแขวนลอย *Vibrio harveyi* ที่เลี้ยงในอาหาร TSB บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปริมาตร 5.5 มิลลิลิตรใส่ในถังที่มีน้ำทะเลความเค็ม 26 พีพีที ปริมาตร 5 ลิตร จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของ *Vibrio harveyi* เท่ากับ 1.98-2.91x 10^5CFU ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำกุ้งขาวทุกชุดการทดลอง การทดลองละ 30 ตัวใส่ในถังที่เตรียมไว้ ถังละ 10 ตัว เลี้ยงกุ้งเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วจึงเปลี่ยนน้ำทะเลเป็นน้ำทะเลที่ไม่เติมเชื้อ *Vibrio harveyi* สังเกตและบันทึกอัตราการตายหลังจากใส่ *Vibrio harveyi* ทุก ๆ 24 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 10 วัน (ดัดแปลงจาก มณเฑียร ส่งเสริม และคณะ, 2533)

จ. ศึกษาผลของการใช้ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 ร่วมกับยีสต์ *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 ต่อความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียก่อโรคออกจากระบบไหลเวียน(Clearance test)

โดยนำตัวอย่างกุ้งที่เลี้ยงครบกำหนด 6 สัปดาห์ จากการทดลองในข้อ 5.3.4 จำนวนถังละ 3 ตัว มาฉีดด้วยสารแขวนลอยของ *Vibrio harveyi* ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 1.98-2.91x 10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ตรงบริเวณกล้ามเนื้อท้องปล้องสุดท้าย และในชุดควบคุมแบ่งเป็น 2 ชุดการทดลอง คือฉีดโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ที่ปลอดเชื้อ และฉีดด้วย *Vibrio harveyi* ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ต่อตัว เมื่อครบ 3 ชั่วโมง ทำการดูดเลือดจากกุ้งตัวละประมาณ 0.2 มิลลิลิตร นำมาเจือจางด้วย โซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ จนได้ความเข้มข้นที่ 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} แล้วทำการ spread plate ลงบนอาหาร TCBS เพื่อตรวจนับเชื้อ *Vibrio harveyi* ตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 2.3 (ภาคผนวก ข) (Scholz *et al.*, 1999)

หลังจากนั้นคำนวณหาประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อก่อโรคออกจากระบบเลือดของกุ้ง (Chiu *et al.*, 2007) โดยสามารถคำนวณได้จากสมการข้างล่าง

$$\text{ประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อก่อโรคออกจากระบบเลือดของกุ้ง} = 100 - \left(\frac{(A)}{(B)}\right) \times 100$$

โดย A = ปริมาณเชื้อก่อโรคที่นับได้ในชุดทดลอง

B = ปริมาณเชื้อก่อโรคที่นับได้ในชุดควบคุม

ฉ. ศึกษาการคงอยู่ของ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, ยีสต์ *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 ภายในระบบทางเดินอาหาร

หลังจากเลี้ยงกุ้งครบ 6 สัปดาห์ด้วยอาหารในแต่ละชุดการทดลอง จะทำการเปลี่ยนชนิดของอาหาร โดยเลี้ยงด้วยอาหารเม็ดธรรมดาเป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างกุ้งชุดการทดลองละ 3 ตัว มาฆ่าเชื้อที่ผิวนอกโดยเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วล้างด้วยโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ที่ปลอดเชื้อหลังจากนั้นใช้มีดผ่าตัดที่ปราศจากเชื้อผ่ากลางลำตัวกุ้งขาว และเลาะเอาส่วนตับและทางเดินอาหารออกมาทำการเจือจางตัวอย่างด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ที่ปลอดเชื้อ จนได้ความเข้มข้นที่ 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} แล้วทำการ spread plate เพื่อตรวจนับเชื้อ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 ตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 2.1 และ2.2 ตามลำดับ (ภาคผนวก ข) ที่ระยะเวลา 0, 1, 3 และ 7 วัน

5.4 การผลิตผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกสูตรผงโดยการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง และ ศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อหลังการทำแห้งที่อุณหภูมิห้องและที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5.4.1 ศึกษาผลของสารตัวกลางที่ใช้ในการป้องกันเซลล์ต่ออัตราการรอดชีวิตของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 ที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dry)

เนื่องจากสารตัวกลางที่ใช้ในการป้องกันเซลล์ในระหว่างการทำแห้งเป็นปัจจัยสำคัญที่ช่วยส่งเสริมอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ ดังนั้นการศึกษาถึงสารตัวกลางที่เหมาะสมสำหรับเชื้อแต่ละชนิดจึงเป็นเรื่องจำเป็น โดยสารตัวกลางที่นิยมนำมาใช้ในการทำแห้งมีหลายชนิดเช่น นมผงพร่องมันเนย น้ำตาลชนิดต่าง ๆ แต่นมผงพร่องมันเนยมีราคาค่อนข้างสูง ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาใช้สารอื่น ๆ มาผสมกับนมผงพร่องมันเนยเพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการรอดชีวิตของเชื้อให้เพิ่มมากขึ้น แต่ในการเลือกใช้สารตัวกลางควรเลือกใช้ให้เหมาะกับเชื้อที่จะทำแห้งด้วย ดังนั้นในการศึกษานี้จึงได้ทำการเลือกสารตัวกลางที่ช่วยส่งเสริมอัตราการรอดชีวิตของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12,ยีสต์ *Candida tropicalis* TH112 และยีสต์ *Pseudozyma antarctica* TH9 ที่สูงที่สุด โดยได้มีขั้นตอนดังนี้

1. การเตรียม *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 เริ่มต้น

โดยทำการเลี้ยง *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 ในอาหาร MRS broth ที่เติม 1.5 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และบ่มไว้ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงถ่ายเชื้อเริ่มต้น 1 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหาร MRS broth ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บตัวอย่าง 1.0 มิลลิลิตรใส่ในหลอดไมโครเซ็นติฟิวก์ขนาด 2 มิลลิลิตร และปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และล้างเซลล์ด้วย โซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ที่ปลอดเชื้อ 2 ครั้ง หลังจากนั้นเติมสารตัวกลางที่ใช้ในการทดลองแต่ละชุดการทดลองลงไป 1.0 มิลลิลิตร ซึ่งจะทำให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 อยู่ที่ 1.25-9.90x10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร

2. การเตรียมยีสต์ *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 เริ่มต้น

โดยทำการเลี้ยง *Candida tropicalis* TH112 และ*Pseudozyma antarctica* TH9 ในอาหาร YM broth ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และบ่มไว้ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที แล้วจึงถ่ายเชื้อเริ่มต้น 1 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหาร YM broth ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ และบ่มไว้

ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที หลังจากนั้นเก็บตัวอย่าง 1.0 มิลลิลิตรใส่ในหลอดไมโครเซ็นติฟิวก์ขนาด 2 มิลลิลิตร และปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และล้างเซลล์ด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ที่ปลอดเชื้อ 2 ครั้ง หลังจากนั้นเติมสารตัวกลางที่ใช้ในการทดลองแต่ละชุดการทดลองลงไป 1.0 มิลลิลิตร ซึ่งจะทำให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของ *Candida tropicalis* TH112 และ*Pseudozyma antarctica* TH9 อยู่ที่ 1.06-9.35x10^{8} และ 1.64-9.20x10^{8} CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

แบ่งชุดการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3 ซึ่งแต่ละชุดการทดลองจะทำ 3 ซ้ำ และสารละลายของสารตัวกลางที่ใช้ในการทำแห้งทุกชุดการทดลองต้องนำมาผ่านการให้ความร้อนที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และ ปรับให้อุณหภูมิของสารตัวกลางลดลงที่อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส) แล้วจึงนำไปเติมลงในเซลล์ที่ผ่านการปั่นแยกผสมตัวอย่างให้เข้ากัน และก่อนการแช่เยือกแข็งจะทำการตรวจนับปริมาณเชื้อเริ่มต้นในแต่ละชุดการทดลองโดยการนำตัวอย่างมาเจือจางที่ระดับ 10^{-5}, 10^{-6} และ 10^{-7} ด้วย โซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ที่ปลอดเชื้อ เพื่อทำการตรวจนับ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 ตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 2.1 และ 2.2 (ภาคผนวก ข) ตามลำดับ และหลังจากนั้นทำการเก็บตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตรใส่ในหลอดไมโครเซ็นติฟิวก์ ขนาด 2 มิลลิลิตร และตัวอย่างในแต่ละชุดจะต้องแช่ในไนโตรเจนเหลวก่อนนำมาทำการระเหิดภายใต้สภาวะสุญญากาศเป็นเวลา 8-10 ชั่วโมง และหลังจากการทำแห้งแล้วตัวอย่างจะถูกเก็บรักษาไว้ในหลอดไมโครเซ็นติฟิวก์เดิม และใส่ในถุงพลาสติก และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นจะนำมาตรวจนับปริมาณ โปรไบโอติกแต่ละชนิดที่รอดชีวิตหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง โดยการทำละลายเชื้อที่ผ่านการทำแห้งด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ที่ปลอดเชื้อ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร Vortex ให้เข้ากันประมาณ 1 นาที และเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม เพื่อทำการตรวจนับเชื้อโปรไบโอติกแต่ละชนิดตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 2.1 และ 2.2 (ภาคผนวก ข) ตามลำดับ และทำการคำนวณหาอัตราการรอดชีวิตของเชื้อแต่ละชนิดในทุกชุดการทดลองตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 8 (ภาคผนวก ข) ทำการคัดเลือกสารตัวกลางที่ให้อัตราการรอดชีวิตของเชื้อที่สูงที่สุดเพื่อนำไปใช้ในการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 3 การกำหนดชุดการทดลองเพื่อใช้ศึกษาผลของสารตัวกลางที่มีผลต่อการรอดชีวิตของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 ที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

Table 3 Assignation of treatments for study the effect of protective agents on survival of *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 and *Pseudozyma antarctica* TH9 after freeze dry.

Strains	**Initial cell concentration (CFU/ml)**	**Protective agents**
Lactobacillus plantarum MRO3.12	$1.25\text{-}9.90\times10^{8}$	20% Skim milk powder
		20% Talcum
		20% Zeolite
		20% Calcium carbonate ($CaCO_3$)
		10% Skim milk powder mixed with 10% Talcum
		10% Skim milk powder mixed with 10% Zeolite
		10% Skim milk powder mixed with 10% $CaCO_3$
Candida tropicalis TH112	$1.06\text{-}9.35\times10^{8}$	20% Skim milk powder
		20% Talcum
		20% Zeolite
		20% Calcium carbonate ($CaCO_3$)
		10% Skim milk powder mixed with 10% Talcum
		10% Skim milk powder mixed with 10% Zeolite
		10% Skim milk powder mixed with 10% $CaCO_3$
Pseudozyma antarctica TH9	$1.64\text{-}9.20\times10^{8}$	20% Skim milk powder
		20% Talcum
		20% Zeolite
		20% Calcium carbonate ($CaCO_3$)
		10% Skim milk powder mixed with 10% Talcum
		10% Skim milk powder mixed with 10% Zeolite
		10% Skim milk powder mixed with 10% $CaCO_3$

5.4.2 ผลของการใช้สารพยุงในการเตรียมเซลล์ต่อการรอดชีวิตของ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 ที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

เนื่องจากสารตัวกลางที่ใช้ในการทดลองมีโครงสร้างที่มีรูพรุน และมีขนาดโมเลกุลค่อนข้างสม่ำเสมอ ดังนั้นจึงได้มีการทดลองเติมสารตัวกลางลงไปในระหว่างการเลี้ยงเซลล์เพื่อให้ทำหน้าที่ในการพยุงเซลล์ ในระหว่างการเพาะเลี้ยง การทำแห้ง และ การเก็บรักษา โดยในขั้นตอนการเตรียม *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 นั้นจะทำเช่นเดียวกับ วิธีวิจัยข้อ 5.4.1 แต่จะมีการเติมตสารพยุงลงไปในอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยสำหรับชุดการทดลองจะแสดงในตารางที่ 4 แต่ละชุดการทดลองจะทำการทดลอง 3 ซ้ำ

ตารางที่ 4 การกำหนดชุดการทดลองเพื่อใช้ศึกษาผลของการใช้สารพยุงในการเตรียมเซลล์ต่อการรอดชีวิตของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 ที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

Table 4 Assignation of treatments for study the used of supporter agents during preparation of cells on survival of *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 and *Pseudozyma antarctica* TH9 after freeze dry.

Strains	**Initial cell concentration (CFU/ml)**	**Medium containing**
Lactobacillus plantarum MRO3.12	$3.38x10^{8}$-$1.18x10^{9}$	No added as control
		2 % Talcum
		2 % Zeolite
		2% Calcium carbonate
Candida tropicalis TH112	1.92-$3.97x10^{8}$	No added as control
		2 % Talcum
		2 % Zeolite
		2% Calcium carbonate
Pseudozyma antarctica TH9	$2.53x10^{7}$-$1.29x10^{8}$	No added as control
		2 % Talcum
		2 % Zeolite
		2% Calcium carbonate

หลังจากนั้นนำ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 ในแต่ละชุดการทดลองไปผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งตามวิธีวิจัยข้อ 5.4.1 และเลือกสารพยุงเซลล์ที่ให้อัตราการรอดชีวิตที่สูงมาใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกแบบผง

5.4.3 ศึกษาผลของการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกสูตรผงที่ผลิตโดยใช้สารตัวกลางตัวและสารพยุงเซลล์ที่คัดเลือกได้จากวิธีวิจัยข้อ 5.4.1 และ 5.4.2 ภายใต้สภาวะ และ อุณหภูมิต่าง ๆ

หลังจากการศึกษาเพื่อหาสารป้องกันเซลล์ที่ส่งเสริมการรอดชีวิตของเซลล์ที่ดีที่สุด และศึกษาผลของการใช้สารพยุงในระหว่างการเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมสำหรับแต่ละเชื้อแล้ว จะทำการผลิตผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกผงโดยการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง โดย

ก. *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 จะทำการเตรียมเช่นเดียวกับ วิธีวิจัยข้อ 5.4.1 และจะทำการเติมสารพยุงที่คัดเลือกได้ลงไปในระหว่างการเพาะเลี้ยง และใช้ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 ที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่มีการเติมสารพยุงเป็นชุดควบคุม

ข. *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 จะทำการเตรียมเช่นเดียวกับ วิธีวิจัยข้อ 5.4.1 และจะทำการเติมสารพยุงที่คัดเลือกได้ลงไปในระหว่างการเพาะเลี้ยง และใช้ *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 ที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่มีการเติมสารพยุงเป็นชุดควบคุม

หลังจากนั้นนำ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 ในแต่ละชุดการทดลองไปผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งตามวิธีวิจัยข้อ 5.4.1 หลังจากการแช่เยือกแข็งนำผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกมาศึกษาอายุการเก็บรักษาที่สภาวะและอุณหภูมิต่างๆ โดยทำการเก็บเชื้อแต่ละชนิดที่ผ่านการทำแห้งไว้ในถุงอลูมิเนียมฟอยด์ โดยบรรจุถุงละ 6 หลอด (ชุดการทดลองที่มีการผสมสารพยุงที่คัดเลือกได้ 3 หลอด และ ชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมสารพยุง 3 หลอด) ทำการแบ่งสภาวะการเก็บ และอุณหภูมิ ออกเป็นชุดการทดลองต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 5

หลังจากนั้นตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 ตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 2.1 และ 2.2 (ภาคผนวก ข) ตามลำดับ และทำการคำนวณหาอัตราการรอดชีวิตของเชื้อแต่ละชนิดในทุกชุดการทดลองโดยใช้วิธีวิเคราะห์ข้อ 8 (ภาคผนวก ข)และวิเคราะห์หาปริมาณความชื้นในตัวอย่างในแต่ละชุดการทดลอง (AOAC, 1990) ตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 9 (ภาคผนวก ข)โดยจะทำการวิเคราะห์ทุก ๆ 2 สัปดาห์ เป็นเวลาติดต่อกัน 2 เดือน

ตารางที่ 5 การกำหนดชุดการทดลองเพื่อศึกษาผลของสภาวะ และ อุณหภูมิในการเก็บรักษาเชื้อ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 ภายใต้การเก็บ 8 สัปดาห์

Table 5 Assignation of treatments for study the effect of storage condition and temperature on survival of *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 and *Pseudozyma antarctica* TH9 during 8 week storage.

Strains	Storage condition	Storage temperature
Lactobacillus plantarum MRO3.12	No vacuum	Room temp.
		4 degree celsius
	Vacuum	Room temp.
		4 degree celsius
Candida tropicalis TH112	No vacuum	Room temp.
		4 degree celsius
	Vacuum	Room temp.
		4 degree celsius
Pseudozyma antarctica TH9	No vacuum	Room temp.
		4 degree celsius
	Vacuum	Room temp.
		4 degree celsius

6. การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ผลการทดลองข้อ 5.2, 5.3, 5.4.1 และ 5.4.2 ใช้การประมวลผลโดยโปรแกรมทางสถิติ คือ โปรแกรม SPSS (Statistical Packages for the Social Science release) โดยวิเคราะห์ด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (Analysis of variance; One-way ANOVA)

ส่วนการทดลองข้อ 5.4.3 ออกแบบการทดลองแบบ 2x4x4 factorial โดยมี 3 ปัจจัย คือ A, B และ C

A คือ สภาวะในการเลี้ยงเซลล์ที่มีการเติมตัวพยุงและไม่เติมตัวพยุง

B คือ ระยะเวลาในการเก็บรักษาที่ 2, 4, 6 และ 8 สัปดาห์

C คือ สภาวะในการเก็บรักษาในการบรรจุแบบสุญญากาศ และบรรยากาศปกติ ภายใต้อุณหภูมิห้อง และ 4 องศาเซลเซียส

ใช้ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการวิเคราะห์ปัจจัยเรื่องเวลา และ สภาวะการเก็บรักษา

ปัจจัยที่เกี่ยวกับสภาวะในการเลี้ยงเซลล์ที่มีการเติมตัวพยุงและไม่เติมตัวพยุงใช้ two-tailed *t*-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

เลี้ยง *Vibrio harveyi* ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5.82 log CFU ต่อมิลลิลิตร เพียงชนิดเดียว พบว่า *Vibrio harveyi* ถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์ภายในชั่วโมงที่ 18 ของการบ่มในชุดการทดลองที่มีการเพาะเลี้ยงร่วมกันของเชื้อทั้ง 4 ชนิด โดยตรวจพบว่าปริมาณเชื้อ *Vibrio harveyi* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งลดจาก 5.17 log CFU ต่อมิลลิลิตรในช่วงเริ่มต้นการทดลอง เป็นตรวจไม่พบเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีสีเขียว และมีขนาด 2-3 มิลลิเมตรของ *Vibrio harveyi* บนอาหาร TCBS agar ในขณะที่ชุดควบคุมที่มีการเติมเชื้อ *Vibrio harveyi* เพียงอย่างเดียวมีจำนวนเชื้อเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์จาก 5.79 log CFUต่อมิลลิลิตร เป็น 7.11 log CFU ต่อมิลลิลิตร ภายใน 18 ชั่วโมงของการบ่ม และลดลงเหลือ 1.81 log CFU ต่อมิลลิลิตร ใน 48 ชั่วโมงของการบ่ม (ภาพที่ 6 (A) และ ตารางภาคผนวก ค ที่ 15)

การเจริญของ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 จะเพิ่มขึ้นเป็น 9.40, 7.68 และ 6.18 log CFU ต่อมิลลิลิตร ภายใน 48 ชั่วโมง จากเชื้อเริ่มต้น 5.25, 5.79 และ 5.14 log CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 7 และ ตารางภาคผนวก ค ที่ 15) จากผลการทดลองแสดงว่าเชื้อ *Vibrio harveyi* ไม่สามารถเจริญแข่งขันกับ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 ได้ โดย *Vibrio harveyi* จะถูกทำลายหมดตั้งแต่ 18 ชั่วโมงแรกของการบ่ม ในขณะที่จุลินทรีย์โปรไบโอติกทั้งสามชนิดสามารถเจริญแข่งขันกันได้โดยไม่มีชนิดใดเลยที่ถูกยับยั้ง โดยเมื่อพิจารณาจากการเจริญของ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 ในชุดการทดลองที่เป็นเชื้อเดี่ยวเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่มีเชื้อผสมทั้ง 3 ชนิด ของ พบว่าปริมาณ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 ในชุดการทดลองที่มีการใช้เชื้อผสมทั้ง 3 ชนิด มีอัตราการเจริญที่ใกล้เคียงกับชุดการทดลองที่มีเพียง *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 ชนิดเดียว (ภาพที่ 7 และตารางภาคผนวก ค ที่ 15)

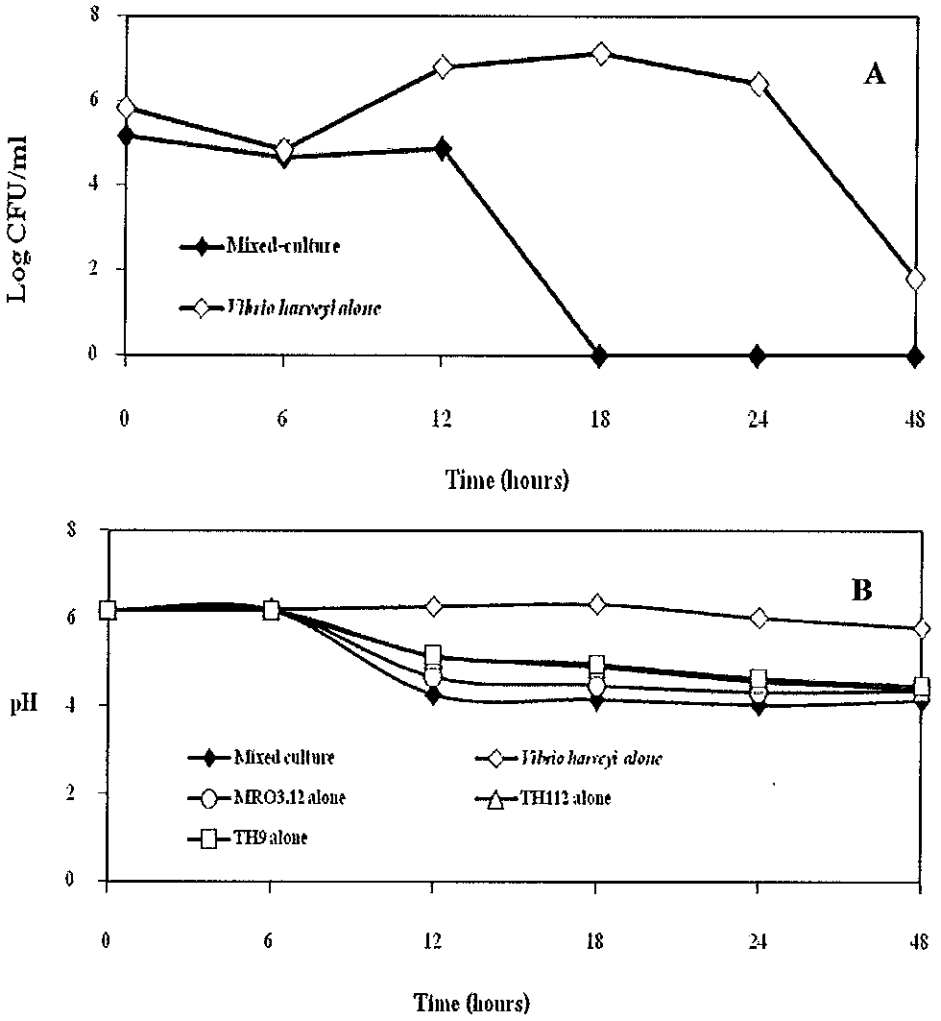
ส่วนการเลี้ยง *Vibrio harveyi* ร่วมกับ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 เพียงอย่างเดียว พบว่าปริมาณ *Vibrio harveyi* ลดลง 3.17 log CFU ต่อมิลลิลิตร ภายใน 24 ชั่วโมงของการบ่ม (ขนิษฐา คงนุ่ม, 2550) และจากรายงานของทิพรัตน์ หงภัทรคีรี และกิจการ ศุภมาตย์ (2548) พบว่า *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 สามารถลดการเจริญของ *Vibrio harveyi* ได้ 4.08 และ 4.26 log CFU ต่อมิลลิลิตร ภายในเวลา 24 ชั่วโมง ดังนั้นจากการทดลองจึงแสดงให้เห็นว่าการเพาะเลี้ยงร่วมกันของเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งการเจริญของ *Vibrio harveyi* ได้ดีกว่าการเพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 เพียงอย่างเดียว ทั้งนี้อาจเกิดจากความสามารถในการสร้างกรดของแบคทีเรียแลกติก เพราะเมื่อนำอาหารเลี้ยงเชื้อในชุดที่มีการเพาะเลี้ยงร่วมกันของเชื้อทั้ง 4

ชนิด มาหาค่าพีเอช พบว่า ค่าพีเอชของอาหารจะค่อย ๆ ลดลงจากเริ่มต้นที่มีค่าพีเอช 6.19 เป็น 4.15 ภายใน 18 ชั่วโมงของการบ่ม และค่าพีเอชจะลดลงจนเหลือ 4.11 ภายใน 48 ชั่วโมงของการบ่ม ในขณะที่ชุดการทดลองที่มีเฉพาะ *Vibrio harveyi* เพียงอย่างเดียวจะมีค่าพีเอชเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จาก 6.19 เป็น 6.32 ภายใน 18 ชั่วโมงของการบ่มและจะค่อย ๆ ลดลงเหลือ 5.77 ภายใน 48 ชั่วโมงของการบ่ม ส่วนค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 เพียงอย่างเดียวจะมีค่าเริ่มต้นที่ 6.19 และจะค่อย ๆ ลดลงจนเหลือ 4.35, 4.38 และ 4.47 ตามลำดับ ภายใน 48 ชั่วโมงของการบ่ม (ภาพที่ 6 (B) และ ตารางภาคผนวก ค ที่ 14) จากการทดลองที่พบว่าชุดการทดลองที่มีการผสมโปรไบโอติกทั้ง 3 ชนิด มีค่าพีเอชลดลงอย่างรวดเร็วภายใน 18 ชั่วโมง ซึ่งส่งผลให้ปริมาณ *Vibrio harveyi* ถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์ นั้นอาจเนื่องมาจากปริมาณ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 ในชุดที่มีการผสมกันกับยีสต์ มีการเจริญเติบโตดีกว่าชุดที่มี *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 เพียงชนิดเดียว ซึ่งอาจเกิดจากการที่ยีสต์สามารถผลิตวิตามินที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียแลกติกได้ โดยจากรายงานของจิตรวดี เชยชม (2548) พบว่ายีสต์สามารถส่งเสริมการเจริญของ *Leuconostoc dextranicum* AM20 ได้ โดยสามารถเพิ่มจำนวนของ *Leuconostoc dextranicum* AM20 จาก 10^8 เป็น 10^{16} CFU ต่อมิลลิลิตร ภายในเวลา 48 ชั่วโมง นอกจากนั้นยีสต์สายพันธุ์ *Candida* sp. ยังสามารถส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียแลกติกได้เนื่องจากยีสต์อาจผลิตสารบางอย่างที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียแลกติก และยีสต์ยังมีความสามารถในการช่วยกระบวนการเมตาบอลิซึมของแบคทีเรียแลกติกให้สมบูรณ์ขึ้น และปล่อย growth factors ออกมาซึ่งมีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียแลกติก (Naruhas and Gadaga, 2001; Vilijoen, 2001)

นอกจากนั้น ขนิษฐา คงนุ่น (2550) ได้ศึกษาคุณสมบัติบางประการของสารยับยั้งที่ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 ผลิตขึ้นโดยการใช้การทดสอบด้วยวิธี Broth microdilution assay พบว่า *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 มีความสามารถในการยับยั้ง *Vibrio harveyi* ที่ 50 AU ต่อมิลลิลิตร และเมื่อนำส่วนใสของ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 มาปรับพีเอชให้เป็น 5-5.5 เพื่อจำกัดสารยับยั้งที่เกิดจากกรดอินทรีย์ พบว่า *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Vibrio harveyi* ลดลงเหลือ 40 AU ต่อมิลลิลิตร ซึ่งแสดงให้เห็นว่าความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Vibrio harveyi* ส่วนหนึ่งมาจากการทำงานของกรดอินทรีย์ หลังจากนั้นนำส่วนใสของ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 มาเติมเอนไซม์คะตะเลสเพื่อจำกัดสารยับยั้งที่เกิดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และพบว่า *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Vibrio harveyi* ลดลงเหลือ 20 AU ต่อมิลลิลิตร ซึ่งแสดงให้เห็นว่าความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Vibrio harveyi* ส่วนหนึ่งมาจากการทำงานของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ดังนั้นจากการทดลองนี้จึงสามารถสรุปได้ว่า ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *Vibrio harveyi* ที่

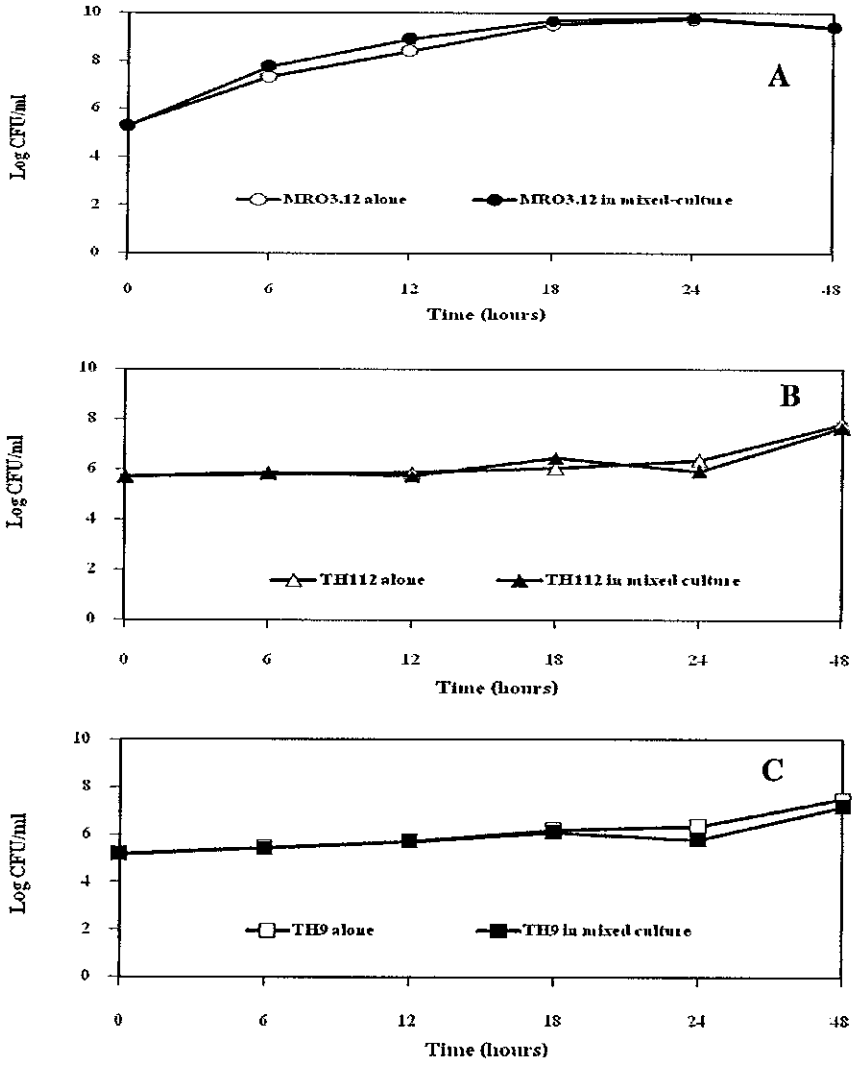
Lactobacillus plantarum MRO3.12 ผลิตขึ้นมาเกิดจากการทำงานร่วมกันของสารหลาย ๆ ชนิด เช่น กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และ สารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งอื่น ๆ เช่น แบคเทอริโอซิน ไดอะซิทิว (Diacetyl) และ รูทีริน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Villamil (2002) ที่พบว่าการยับยั้งของแบคทีเรียแลกติกเกิดจากการทำงานร่วมกันของสารประกอบที่แบคทีเรียแลกติกสร้างขึ้นไม่ใช่เพียงแต่กรดแลกติกเท่านั้น นอกจากนั้น Niku-Paavola (1999) ยังพบว่า *Lactobacillus plantarum* VTTE-78076 สามารถผลิตสารยับยั้งซึ่งเป็นสารโมเลกุลต่ำพวก benzoic acid (CAS 65-85-0), 5-methyl-2, 4-imidazolidineione (CAS616-03-5, methylhydantion), tetrahydro-4-hydroxy-4-methyl-2H-pyran-2-one (CAS 674-26-0, mevalonolactone) และ 3-(2-methylpropyl)-2, 5-piperazinedione (CAS 5845-67-0, cyclo(glycyl-L-leucyl)) ซึ่งพบว่าสารเหล่านี้มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Enterobacter agglomerans* ได้

และเพื่อเป็นการยืนยันว่าบนอาหาร MRS agar มีเพียง *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 เจริญ ส่วนอาหาร YM agar มีเพียง *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 เจริญ และบนอาหาร TCBS agar มีเพียง *Vibrio harveyi* เจริญ ดังนั้นจึงได้มีการทดสอบการเจริญของ *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9 และ *Vibrio harveyi* บนอาหาร MRS agar ทดสอบการเจริญของ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 และ *Vibrio harveyi* บนอาหาร YM agar และ ทดสอบการเจริญของ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 บนอาหาร TCBS agar และจากการทดสอบพบว่า *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 สามารถเจริญบนอาหาร MRS ที่มี bromocresol purple 0.02 เปอร์เซ็นต์ ได้ และจะมีโคลีนีเป็นสีเหลือง (Kozaki *et al.*, 1992) และ *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 สามารถเจริญบน อาหาร MRS ได้แต่จะไม่เปลี่ยนสีอาหาร ดังนั้นจึงสามารถแบ่งแยกโคโลนีของ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 กับยีสต์ได้ ในขณะที่ *Vibrio harveyi* ไม่เจริญบนอาหาร MRS (ภาพที่ 8) ส่วน *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 จะสามารถเจริญบนอาหาร YM ที่มีคลอแรมฟีนิคอล 0.001 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากคลอแรมฟีนิคอลสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ (Beuchat, 1993) ดังนั้น *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 และ *Vibrio harveyi* จึงไม่สามารถเจริญได้ (ภาพที่ 9 และ ภาพที่ 10) ส่วน *Vibrio harveyi* จะสามารถเจริญบนอาหาร TCBS ในขณะที่ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 ไม่สามารถเจริญได้ เนื่องจาก อาหาร TCBSมีองค์ประกอบของ thiosulfate, citrate และสารประกอบ strong alkalinity อยู่และสารพวกนี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ Enterobacteriaceae ได้ (ภาพที่ 11)



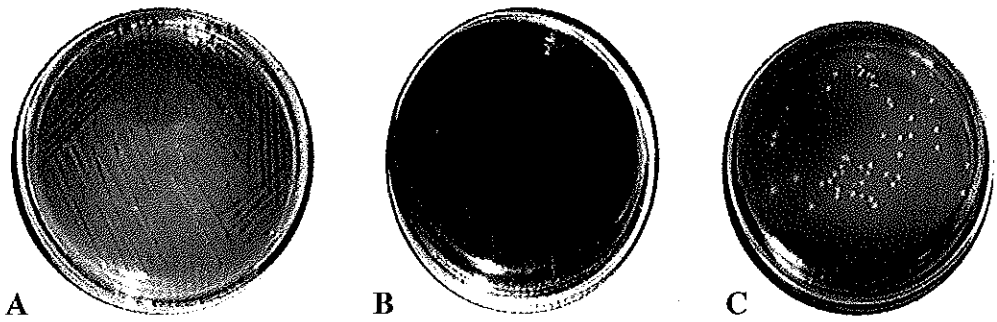
ภาพที่ 6 การเจริญของ *Vibrio harveyi* (A) และ ค่าพีเอช (B) เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *C. tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีการเติม *Vibrio harveyi* เพียงชนิดเดียวในอาหารที่เป็นส่วนผสมของ MRS, YM และ TSB broth ในอัตราส่วน 1:1:1 และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีอากาศ

Figure 6 Growth of *Vibrio harveyi* (A) and pH value (B) which cultured with *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 and *Pseudozyma antarctica* TH9 compared to control treatment (*Vibrio harveyi* alone) in mixed medium containing MRS, YM and TSB broth (1:1:1) and incubated under aerobic condition at 30 °C.



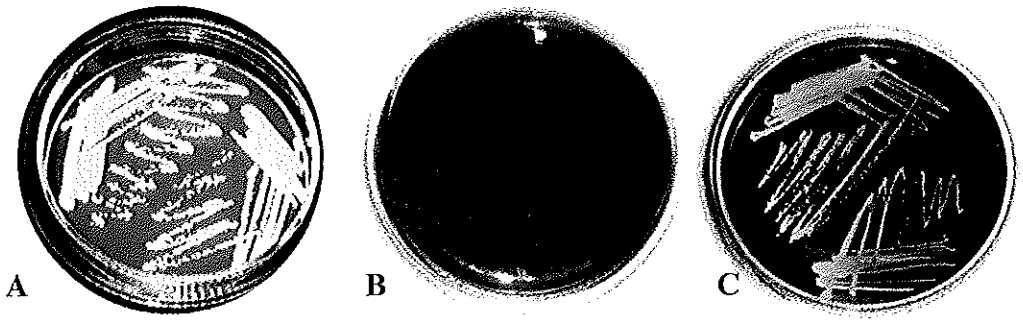
ภาพที่ 7 การเจริญของ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 (A), *Candida tropicalis* TH112 (B) และ *Pseudozyma antarctica* TH9 (C) ในชุดที่มีการเพาะเลี้ยงร่วมกันระหว่าง *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9 และ *Vibrio harveyi* เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีการเติม *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *C. tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 เพียงชนิดเดียวในอาหารที่เป็นส่วนผสมของ MRS, YM และ TSB broth ในอัตราส่วน 1:1:1 และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีอากาศ

Figure 7 Growth of *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 (A), *Candida tropicalis* TH112 (B) and *Pseudozyma antarctica* TH9 (C) in mixed-culture system compared to control treatment (*Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112, and *Pseudozyma antarctica* TH9 alone) in mixed medium containing MRS, YM and TSB broth (1:1:1) and incubated under aerobic condition at 30 °C.



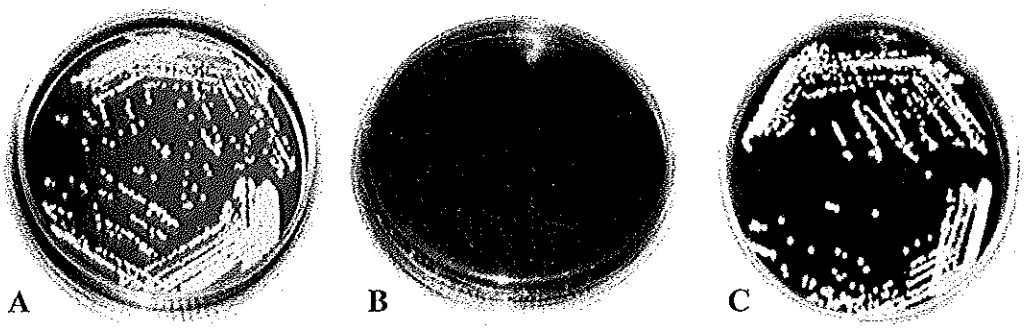
ภาพที่ 8 ลักษณะของ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 บนอาหาร YM agar ที่มีคลอแรมฟินิคอล 0.001 เปอร์เซ็นต์ (A), TCBS agar (B) และ MRS agar ที่มี bromocresol purple 0.02 เปอร์เซ็นต์ (C)

Figure 8 Colony appearance of *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 on 0.001 % chloramphenicol containing YM agar (A), TCBS agar (B) and 0.02 % bromocresol purple containing MRS agar (C).



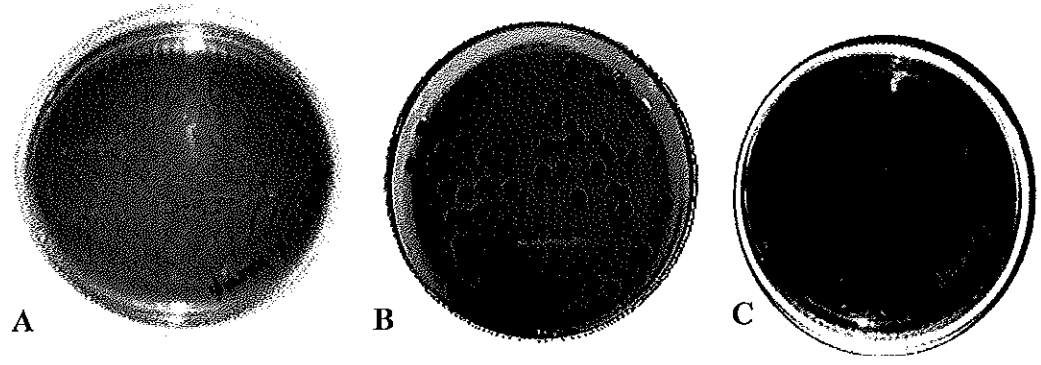
ภาพที่ 9 ลักษณะของ *Candida tropicalis* TH112 บนอาหาร YM agar ที่มีคลอแรมฟินิคอล 0.001 เปอร์เซ็นต์ (A), TCBS agar (B) และ MRS agar ที่มี bromocresol purple 0.02 เปอร์เซ็นต์ (C)

Figure 9 Colony appearance of *Candida tropicalis* TH112 on 0.001 % chloramphenicol containing YMagar (A), TCBS agar (B) and 0.02 % bromocresol purple containing MRS agar (C).



ภาพที่ 10 ลักษณะของ *Pseudozyma antarctica* TH9 บนอาหาร YM agar ที่มีคลอแรมฟินิคอล 0.001 เปอร์เซ็นต์ (A), TCBS agar (B) และ MRS agar ที่มี bromocresol purple 0.02 เปอร์เซ็นต์ (C)

Figure 10 Colony appreance of *Pseudozyma antarctica* TH9 on 0.001 % chloramphenicol containing YM agar (A), TCBS agar (B) and 0.02 % bromocresol purple containing MRS agar (C).



ภาพที่ 11 ลักษณะของ *Vibrio harveyi* บนอาหาร YM agar ที่มีคลอแรมฟินิคอล 0.001 เปอร์เซ็นต์ (A), TCBS agar (B) และ MRS agar ที่มี bromocresol purple 0.02 เปอร์เซ็นต์ (C)

Figure 11 Colony appearance of *Vibrio harveyi* on 0.001 % chloramphenicol containing YM agar (A), TCBS agar (B) and 0.02 % bromocresol purple containing MRS agar (C).

3. ผลของการใช้ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 ร่วมกับยีสต์ *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 ต่อการเจริญ และอัตราการรอดชีวิตของกุ้ง

3.1 การรอดชีวิตของ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 ในอาหารกุ้ง

จากการศึกษาการรอดชีวิตของ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 ในอาหารกุ้งพบว่า วันที่เริ่มต้นผสมเชื้อลงในอาหารกุ้ง (วันที่ 0) นับ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 ในอาหารกุ้งที่มี *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 เพียงชนิดเดียว และอาหารกุ้งที่มีเชื้อผสมทั้ง 3 ชนิด ได้ 8.46 และ 8.56 log CFU ต่อกรัมอาหาร ตามลำดับ และเมื่อเก็บอาหารกุ้งผสมเชื้อไว้ในกล่องพลาสติกที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1, 2 และ 3 วัน พบว่า ในวันที่ 3 ของการเก็บรักษาปริมาณ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ จนมีปริมาณ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 ในอาหารกุ้งที่มีเชื้อ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 เพียงชนิดเดียว และอาหารกุ้งที่มีเชื้อผสมทั้ง 3 ชนิด อยู่ที่ 8.31 และ 8.42 log CFU ต่อกรัมอาหารตามลำดับ หรือมีปริมาณลดลง 0.15 และ 0.14 log CFU ต่อกรัมอาหารจากเริ่มต้น ตามลำดับ (ภาพที่ 12 และตารางภาคผนวก ค ที่ 16)

ส่วนการศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ *Candida tropicalis* TH112 ในอาหารกุ้งจะมีแนวโน้มเช่นเดียวกับ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 นั่นคือ ในวันแรกที่เริ่มต้นผสมเชื้อลงไปในอาหารกุ้ง สามารถตรวจนับปริมาณ *Candida tropicalis* TH112 ในอาหารที่มี *Candida tropicalis* TH112 เพียงชนิดเดียว และ อาหารกุ้งที่มีเชื้อผสมทั้ง 3 ชนิด ได้ 8.37 และ 8.33 log CFU ต่อกรัมอาหาร ตามลำดับ และเมื่อเก็บรักษาอาหารผสมเชื้อไว้ในกล่องพลาสติก ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1, 2 และ 3 วัน พบว่า ในวันที่ 3 ของการเก็บรักษาปริมาณ *Candida tropicalis* TH112 ลดปริมาณลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ จนมีปริมาณ *Candida tropicalis* TH112 ในอาหารที่มีเชื้อ *Candida tropicalis* TH112 เพียงชนิดเดียว และ อาหารกุ้งที่มีเชื้อผสมทั้ง 3 ชนิด อยู่ที่ 8.16 และ 8.10 log CFU ต่อกรัมอาหาร ตามลำดับ หรือมีปริมาณลดลง 0.21 และ 0.23 log CFU ต่อกรัมอาหาร ตามลำดับ (ภาพที่ 12 และตารางภาคผนวก ค ที่ 16)

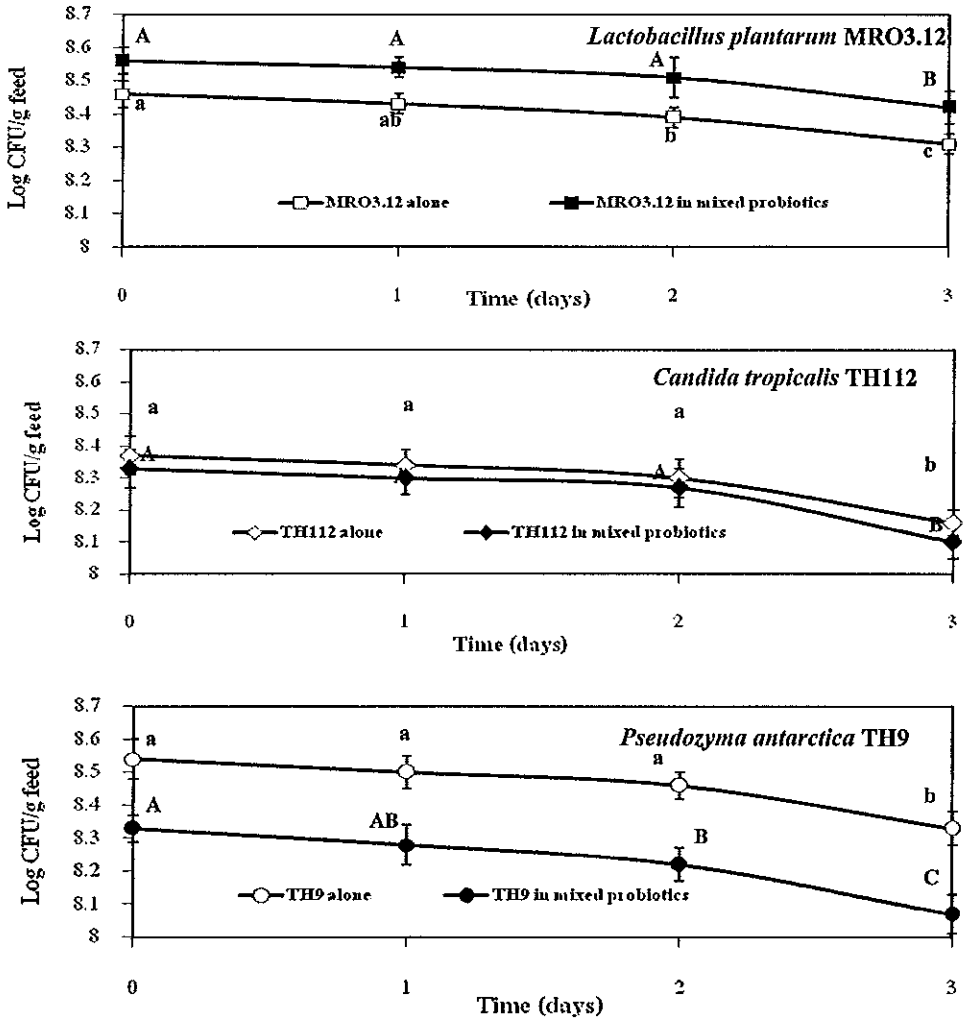
และสำหรับการศึกษาการรอดชีวิตของ *Pseudozyma antarctica* TH9 ในอาหารกุ้งพบว่า ในวันแรกที่เริ่มต้นผสมเชื้อลงไปในอาหารกุ้ง สามารถตรวจนับปริมาณ *Pseudozyma antarctica* TH9 ในอาหารที่มี *Pseudozyma antarctica* TH9 เพียงชนิดเดียว และ อาหารกุ้งที่มีเชื้อผสมทั้ง 3 ชนิด ได้ 8.54 และ 8.33 log CFU ต่อกรัมอาหาร ตามลำดับ และเมื่อเก็บรักษาอาหารผสมเชื้อไว้ในกล่องพลาสติก ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1, 2 และ 3 วัน พบว่า ในวันที่ 3 ของการเก็บรักษาปริมาณ *Pseudozyma antarctica* TH9 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ จนปริมาณ *Pseudozyma antarctica* TH9 ในอาหารที่มีเชื้อ *Pseudozyma antarctica* TH9

เพียงอย่าชนิดเดียว และ อาหารกุ้งที่มีเชื้อผสมทั้ง 3 ชนิด อยู่ที่ 8.33 และ 8.07 log CFU ต่อกรัมอาหาร ตามลำดับ หรือมีค่าลดลง 0.21 และ 0.26 log CFU ต่อกรัมอาหาร ตามลำดับ (ภาพที่ 12 และตารางภาคผนวก ค ที่ 16) และจากรายงานของ ขนิษฐา คงนุ่ม (2550) พบว่าการเก็บอาหารที่ผสมเชื้อโปรไบโอติกไว้ในที่แห้งที่มีอุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียสจะสามารถเก็บรักษาเชื้อโปรไบโอติกไว้ได้ โดยพบว่า *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 และ *Candida tropicalis* TH112 ที่ผสมในอาหารจะลดปริมาณลงเพียง 0.16 และ0.24 log CFU ต่อกรัมอาหาร ตามลำดับหลังจากการเก็บรักษาไว้เป็นเวลา 3 วัน

ถึงแม้ปริมาณ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 ในวันที่ 3 ของการเก็บรักษาลดลงอย่างมีนัยสำคัญ แต่ปริมาณเชื้อทั้ง 3 ชนิด ทั้งในอาหารกุ้งที่มีเชื้อแต่ละชนิดเพียงชนิดเดียวและอาหารกุ้งที่มีเชื้อผสมของทั้ง 3 ชนิด ยังมีค่าที่มากกว่า 10^8 CFU ต่อกรัมอาหาร ซึ่งตามเกณฑ์ของพระราชบัญญัติควบคุมอาหารสัตว์ที่กล่าวว่าผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ที่นำมาผสมลงในอาหารสัตว์เพื่อขายต้องมีจำนวนจุลินทรีย์ไม่ต่ำกว่า 10^5 CFU ต่อกรัมอาหาร ดังนั้นจึงสามารถใช้สภาวะในการเก็บรักษาอาหารที่ผสมเชื้อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสได้

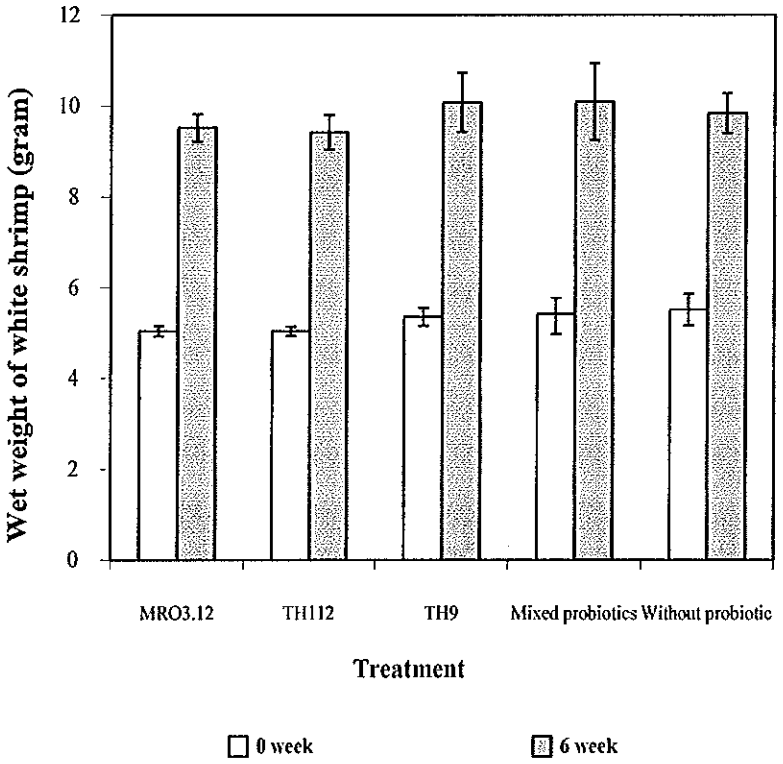
3.2 อัตราการเจริญ การเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ และ อัตราการรอดชีวิตของกุ้งขาว

เมื่อนำอาหารกุ้งที่มีการเติม *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9 เพียงชนิดเดียว และ อาหารกุ้งที่มีการเติมเชื้อผสมทั้ง 3 ชนิด ที่มีปริมาณเชื้ออยู่ที่ 2.5-5.0x10^8 CFU ต่อกรัมอาหาร มาใช้เลี้ยงกุ้งขาวที่ผ่านการอนุบาลมา 1 สัปดาห์ และมีน้ำหนักเฉลี่ยอยู่ที่ 4.92-5.90 กรัมต่อตัว พบว่า กุ้งขาวจะมีน้ำหนักเฉลี่ยอยู่ที่ 9.42-10.09 กรัมต่อตัว (ภาพที่ 13 และตารางภาคผนวก ค ที่ 17) เมื่อเลี้ยงครบ 6 สัปดาห์ โดยกุ้งขาวในกลุ่มที่มีอัตราการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักที่สูงสุดที่ 88.84 เปอร์เซ็นต์จากน้ำหนักเริ่มต้น คือกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่ผสมเชื้อ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 ส่วนกุ้งขาวในชุดควบคุมที่ได้รับอาหารที่ไม่ผสมโปรไบโอติกมีเปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้นของน้ำหนักต่ำสุดที่ 78.74 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสม *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9 เพียงชนิดเดียว และ เชื้อผสมทั้ง 3 ชนิด มีผลการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักอยู่ที่ 86.96, 87.93 และ 86.28 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 6 และเมื่อนำอัตราการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักของกุ้งขาวในแต่ละชุดการทดลองมาวิเคราะห์ทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ *($p>0.05$)* ในระหว่างชุดการทดลองทั้ง 5 ชุดการทดลอง



ภาพที่ 12 ปริมาณเชื้อ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 ในอาหารเลี้ยงกุ้งที่มีเชื้อ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ*Pseudozyma antarctica* TH9 เพียงอย่างเดียว และอาหารเลี้ยงกุ้งที่ผสมโปรไบโอติกของเชื้อทั้ง 3 ชนิด เมื่อเก็บรักษาไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน กราฟที่กำกับด้วยอักษรต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *($p<0.05$)*

Figure 12 Population of *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 and *Pseudozyma antarctica* TH9 in shrimp diet contained *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 and *Pseudozyma antarctica* TH9 alone and shrimp diet contained mixed probiotics of *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 *Candida tropicalis* TH112 and *Pseudozyma antarctica* TH9 when storage at 4 °C for 3 days. Data (mean±SD.) with different letters are significantly different *($p<0.05$)* among treatments



ภาพที่ 13 น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาวก่อนการทดลอง เปรียบเทียบกับกุ้งขาวหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ ด้วยอาหารที่ผสมและไม่ผสมโปรไบโอติก

Figure 13 Mean weight of white shrimp before (0 week) and after feeding trial (6 weeks) with shrimp diets containing probiotics and without probiotic.

เมื่อคำนวณอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (% Feed conversion ratio, % FCR) พบว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสม *Candida tropicalis* TH112 มีอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อต่ำที่สุดคือมีความสามารถในการเปลี่ยนอาหารให้เป็นเนื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงที่สุด คือมีอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้ออยู่ที่ 2.21 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ กุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสม *Pseudozyma antarctica* TH9 เพียงชนิดเดียว, กุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่ผสมเชื้อโปรไบโอติกทั้ง 3 ชนิด, กุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสม *Lactobacillus plantalum* MRO3.12 เพียงชนิดเดียว และกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่ไม่ผสมโปรไบโอติกตามลำดับโดยมีอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้ออยู่ที่ 2.22, 2.28, 2.36 และ 2.44 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 6 เมื่อนำอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อของกุ้งขาวในแต่ละชุดการทดลองมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ *($p>0.05$)* ในระหว่างชุดการทดลองทั้ง 5 ชุดการทดลอง

จากการทดลองพบว่ากุ้งขาวในชุดการทดลองที่ได้รับโปรไบโอติกจะมีอัตราการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักสูงกว่ากุ้งขาวที่ไม่ได้รับโปรไบโอติก ทั้งนี้อาจเกิดจากความสามารถในการสร้างสารอาหารของแบคทีเรียแลกติก เช่นวิตามิน บี 12 (Irianto and Austin, 2002) และนอกจากนั้นผนังเซลล์ของยีสต์ยังเป็นแหล่งของโปรตีนซึ่งสามารถส่งเสริมการเจริญของกุ้งได้ (Burgents *et al.*, 2004) แต่อย่างไรก็ตามพบว่าการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักของกุ้งขาวไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมเชื้อ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9 เพียงชนิดเดียว และ เชื้อผสมโปรไบโอติกทั้ง 3 ชนิด และกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่ไม่ผสมโปรไบโอติก ทั้งนี้อาจเกิดจากระยะเวลาในการทดลองเลี้ยงใช้เวลาเพียง 6 สัปดาห์ ดังนั้นอาจจะทำให้ไม่สามารถเห็นความแตกต่างในระหว่างชุดการทดลองได้ ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Scholz และคณะ (1999) ที่ทดลองเลี้ยงกุ้งขาวด้วยอาหารผสมของ*Saccharomyces cerevisiae*, β-glucan ที่สกัดจาก *Saccharomyces cerevisiae*, *Phaffia rhodozyma* และ*Saccharomyces exiguous* เปรียบเทียบกับกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ไม่ได้รับการผสมเชื้อยีสต์ และพบว่าไม่มีความแตกต่างในด้านน้ำหนักของกุ้งขาวที่เพิ่มขึ้นและอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อในระหว่างชุดการทดลองที่เลี้ยงด้วยด้วยยีสต์ กับชุดที่ไม่ได้รับยีสต์ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 7 สัปดาห์ ส่วนมณฑกานต์ ทองสม (2547) พบว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารที่ผสมโปรไบโอติกในปริมาณ 10^8 CFU ต่อกรัมอาหารเป็นเวลา 1 เดือนจะมีเปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นที่สูงกว่ากุ้งกุลาดำที่ไม่ได้รับโปรไบโอติกแต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ *($p>0.05$)*

การผสมเชื้อ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 ในอาหารกุ้งไม่ส่งผลที่เป็นอันตรายต่อกุ้งขาวที่เลี้ยง เนื่องจากกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีโปรไบโอติกมีอัตราการรอดชีวิตที่สูงกว่ากุ้งขาวที่ไม่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก โดยพบว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสม *Candida tropicalis* TH112 เพียงชนิดเดียว และได้รับอาหารที่ผสมเชื้อโปรไบโอติกทั้ง 3 ชนิด มีอัตราการรอดชีวิตที่สูงที่สุดที่ 100 เปอร์เซ็นต์ และชุดกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมเชื้อ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 หรือ *Pseudozyma antarctica* TH9 เพียงชนิดเดียวมีอัตราการรอดชีวิตที่ 98.89 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกุ้งขาวในชุดควบคุมซึ่งเป็นชุดที่ไม่ได้รับโปรไบโอติกมีอัตราการรอดชีวิตของกุ้งขาวเพียง 68.39 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 6 และเมื่อนำอัตราการรอดชีวิตมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติพบว่า กุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมเชื้อโปรไบโอติกมีอัตราการรอดชีวิตที่สูงกว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่ไม่มีการผสมเชื้อโปรไบโอติก อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ *($p<0.05$)* ซึ่งสอดคล้องกับ Scholz และคณะ (1999) ที่พบว่าการเลี้ยงกุ้งกุลาดำเป็นเวลา 7 สัปดาห์โดยใช้อาหารผสมยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*, *Phaffia rhodozyma* และ *Saccharomyces exiguus* จะส่งผลให้กุ้งกุลาดำมีอัตราการรอดชีวิตที่ 71.25, 77.5 และ 76.7 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งกุลาดำที่ไม่ได้รับยีสต์พบว่า มีอัตราการรอดชีวิตที่ 56.25

เปอร์เซ็นต์ ส่วนงานวิจัยของมณฑกานต์ ทองสม (2547) พบว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *Enterococcus faecalis* AM35 และ *Lactobacillus salivarius* AM111 มีอัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ สำหรับกุ้งกุลาดำในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับโปรไบโอติกจะมีอัตราการรอดชีวิตที่ 76.66 เปอร์เซ็นต์ ในขณะเดียวกันถ้าเพิ่มระยะเวลาในการทดลองให้นานขึ้นอาจจะส่งผลให้สามารถเห็นความแตกต่างในระหว่างชุดการทดลองได้ชัดเจนขึ้น เช่นจากการทดลองของทิพรัตน์ หงภัทรดีรี และ กิจการ ศุภมาตย์ (2548) ที่ใช้ *Pseudozyma antarctica* TH9, *Candida tropicalis* TH112 และ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5055 ในปริมาณ 2-5x10^8 CFU ต่อกรัมอาหาร มาใช้เลี้ยงกุ้งกุลาดำเป็นเวลา 8 สัปดาห์ และทำการเปรียบเทียบกับชุดที่ไม่ได้รับยีสต์ พบว่ากุลาดำที่ได้รับอาหารผสมยีสต์มีน้ำหนักตัวสูงกว่ากุ้งที่ไม่ได้รับยีสต์อย่างมีนัยสำคัญ โดยพบว่ากุ้งที่ได้รับ *Candida tropicalis* TH112 มีเปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้นของน้ำหนักที่ 77.57 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ *Pseudozyma antarctica* TH9 และ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5055 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้นของน้ำหนักที่ 74.76 และ72.05 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่กุ้งที่ไม่ได้รับยีสต์มีเปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้นของน้ำหนักที่ 66.35 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนั้นกุ้งในชุดที่ได้รับยีสต์ยังมีอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อที่ดีกว่าชุดที่ไม่ได้รับยีสต์อีกด้วย โดยกุ้งขาวที่ได้รับ *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9, *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5055 และชุดที่ไม่ได้รับยีสต์ มีอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อที่ 2.16, 2.24, 2.32 และ 2.52 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนรายงานของ Wang และคณะ (2005) ที่ทดลองเลี้ยงกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ผสมโปรไบโอติกทางการค้าซึ่งประกอบไปด้วยเชื้อ *Bacillus* sp., *Saccharomyces cerevisiae, Nitrosomonas* sp. และ *Nitrobacter* sp. ในปริมาณ 1.0x10^9, 4.5x10^5, 6.4x10^4 และ 2.8x10^6 cells ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และทำการเปรียบเทียบกับกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ไม่ผสมโปรไบโอติกโดยใช้ระยะเวลาในการเลี้ยง 109 วัน พบว่ากุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติกมีอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อต่ำกว่าชุดที่ไม่ได้รับโปรไบโอติกอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าอยู่ที่ 1.13 และ 1.35 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ตารางที่ 6 น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น, อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ และ อัตราการรอดชีวิตของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9, ชุดของเชื้อผสมทั้ง 3 ชนิด เปรียบเทียบกับกุ้งขาวชุดควบคุมที่ได้รับอาหารที่ไม่มีการเติมโปรไบโอติก ที่ระยะเวลาการเลี้ยงที่ 6 สัปดาห์ ตัวเลขที่กำกับด้วยอักษรต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *($p<0.05$)*

Table 6 % Weight increased, feed conversion ratio and % survival of white shrimp fed on diets containing *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9, mixed probiotics compared to control treatment (without porbiotic) at 6 week feeding trial. Data (mean±SD.) with different letters are significantly different *($p<0.05$)* among treatments.

Treatments	% Weight increased	% Feed conversion ratio	% Survival
Lactobacillus plantarum MRO3.12	88.84 ± 2.6^{a}	2.36 ± 0.12^{a}	98.89 ± 1.92^{a}
Candida tropicalis TH112	86.96 ± 4.99^{a}	2.21 ± 0.01^{a}	100^{a}
Pseudozyma antarctica TH9	87.93 ± 5.33^{a}	2.22 ± 0.21^{a}	98.89 ± 1.92^{a}
Mixed probiotics	86.28 ± 9.22^{a}	2.28 ± 0.27^{a}	100^{a}
Control (without probiotics)	78.74 ± 7.44^{a}	2.44 ± 0.01^{a}	68.39 ± 16.44^{b}

3.3 ปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งขาว

เมื่อนำกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกของ *Lactobacillus plantalum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9 เพียงชนิดเดียว และ อาหารผสมโปรไบโอติกทั้ง 3 ชนิด เป็นเวลา 6 สัปดาห์มานับปริมาณเม็ดเลือด พบว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกของ *Lactobacillus plantalum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9 เพียงชนิดเดียว และ อาหารผสมโปรไบโอติกทั้ง 3 ชนิด มีปริมาณเม็ดเลือดรวมอยู่ที่ 7.34, 7.22, 7.08 และ 7.40 log cells ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และพบว่ามีปริมาณเม็ดเลือดรวมสูงขึ้นจากตอนเริ่มต้นการทดลอง ซึ่งมีค่าอยู่ที่ 6.97 log cells ต่อมิลลิลิตร และเมื่อนำปริมาณเม็ดเลือดรวมมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์พบว่าปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งขาวในชุดที่ได้รับเชื้อผสมทั้ง 3 ชนิด, *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 เพียงชนิดเดียว และ *Candida tropicalis* TH112 เพียงชนิดเดียว มีปริมาณสูงกว่าชุดเริ่มต้นทดลองอย่างมีนัยสำคัญ *($p<0.05$)*

ในขณะที่กุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่ไม่มีการผสมโปรไบโอติกมีปริมาณเม็ดเลือดรวมลดลงจากชุดก่อนการทดลองและมีค่าต่ำสุดที่ 6.91 log cells ต่อมิลลิลิตร เมื่อนำปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งขาวในแต่ละชุดการทดลองมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ พบว่าปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งขาวในชุดที่ได้รับอาหารที่ไม่มีการผสมโปรไบโอติกมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งขาวชุดที่ได้รับอาหารผสมของเชื้อผสมทั้ง 3 ชนิด, *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 และ *Candida tropicalis* TH112 แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ *(p>0.05)* กับกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสม *Pseudozyma antarctica* TH9 (ภาพที่ 14 และตารางภาคผนวก ค ที่ 18) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ ทิพรัตน์ หงภัทรดีรี และ กิจการ ศุภมาตย์ (2548) ที่พบว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารที่ผสม *Pseudozyma antarctica* TH9 มีปริมาณเม็ดเลือดรวมสูงที่สุดที่ $3.63x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือกุ้งกุลาดำที่ได้รับ *Candida tropicalis* TH112, *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5055 และชุดที่ไม่ได้รับโปรไบโอติก ซึ่งมีปริมาณเม็ดเลือดรวม $3.22x10^6$, $2.98x10^6$ และ$2.29x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนั้น Sajeevan และคณะ (2006) พบว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมของ *Candida sake* ในปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อน้ำหนักอาหารเป็นเวลา 28 วันจะสามารถเพิ่มปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งได้สูงกว่ากุ้งที่ไม่ได้รับเชื้อ *Candida sake*

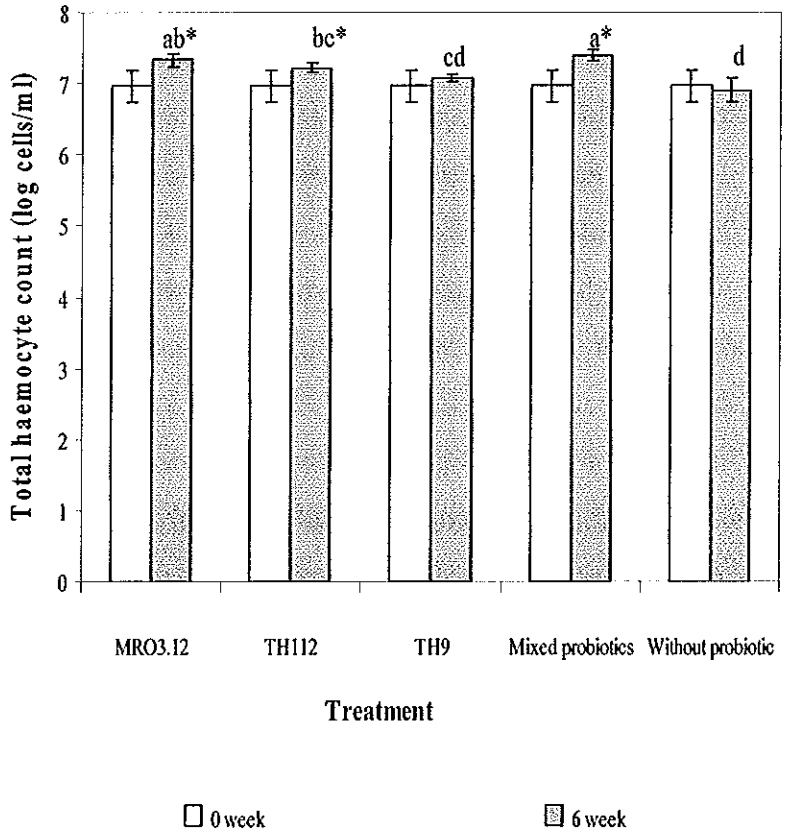
จากการทดลองจะพบว่ากุ้งขาวชุดที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกมีอัตราการรอดชีวิตและมีปริมาณเม็ดเลือดรวมที่สูงกว่ากุ้งขาวที่ไม่ได้โปรไบโอติก แสดงให้เห็นว่า *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 ที่ผสมในอาหารกุ้งมีความสามารถในการส่งเสริมภูมิคุ้มกันของกุ้งได้ และเนื่องจากกุ้งจัดเป็นสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลังและมีเปลือกภายนอกแข็ง และมีระบบป้องกันตัวที่มีประสิทธิภาพ เพื่อไม่ให้สิ่งมีชีวิตที่ทำให้เกิดโรคเข้ามาบุกรุกทำลายอวัยวะต่าง ๆ ของร่างกาย ถึงแม้ว่าสัตว์ในกลุ่มนี้จะมีโครงสร้างภายนอกที่แข็งและมีคุณสมบัติพิเศษทางด้านเคมี ซึ่งเป็นตัวขวางกั้นในการเข้าทำลายของกุ้งชื้อโรค แต่ระบบภูมิคุ้มกันยังมีความจำเป็นอย่างมากในการกำจัดเชื้อโรคประเภทที่ฉวยโอกาสเข้าไปในร่างกายของสัตว์ ในขณะที่เกิดบาดแผลหรือในช่วงที่มีการลอกคราบ ซึ่งระบบการป้องกันตัวของสัตว์กลุ่มนี้จะอาศัย เซลล์เม็ดเลือด (hemocytes) ในการทำหน้าที่กำจัดเซลล์สิ่งแปลกปลอมออกจากร่างกาย (Ford *et al.*, 1993) ดังนั้นการเพิ่มขึ้นของปริมาณเม็ดเลือดจะช่วยชักนำให้ประสิทธิภาพของระบบภูมิคุ้มกันและการต้านทานโรคในกุ้งเพิ่มขึ้นด้วย (Moullac *et al.*, 1998)

เมื่อพิจารณาอัตราการรอดชีวิต และปริมาณเม็ดเลือดของกุ้งพบว่าให้ผลสอดคล้องกันโดยจะเห็นว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกมีอัตราการรอดชีวิตที่สูงกว่ากุ้งขาวที่ไม่ได้รับโปรไบโอติก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 ที่เติมลงไปจะไปช่วยกระตุ้นการสร้างเม็ดเลือดของกุ้ง และเมื่อกุ้งขาว

มีปริมาณเม็ดเลือดสูงขึ้นจะทำให้กุ้งขาวมีความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียก่อโรคออกไปนอกระบบไหลเวียนเลือดได้ดีขึ้นและทำให้อัตราการรอดชีวิตของกุ้งขาวสูงขึ้นด้วย โดยมีรายงานว่า peptidoglycan ที่ผลิตโดย *Bifidobacterium thermophilum* สามารถป้องกันปลา rainbow trout จากการติดเชื้อ *Vibrio* sp. ได้ (Matsuo and Miyazono, 1993) และ จากรายงานของ Itami และคณะ (1998) ที่ใช้ peptidoglycan ที่ผลิตโดย *Bifidobacterium thermophilum* ในการเลี้ยงกุ้งขาวในอัตรา 0.2 มิลลิกรัม ต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัวจะส่งผลให้กุ้งขาวมีอัตราการรอดชีวิตที่สูงขึ้น นอกจากนั้นเบต้ากลูแคนที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ยีสต์จะสามารถช่วยเพิ่มศักยภาพในการกำจัดแบคทีเรียก่อโรคได้ (Suphantharika *et al.*, 2003; Sajeevan *et al.*, 2006) และนอกจากนี้ Rungsri และคณะ (2004) ได้รายงานว่ากุ้งที่มีอาการติดเชื้อแบคทีเรียจะมีปริมาณเม็ดเลือดไหลเวียนต่ำกว่ากุ้งที่ไม่ติดเชื้อ เพราะเมื่อเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสิ่งแปลกปลอมได้เข้าสู่ตัวกุ้ง เม็ดเลือดจะเข้ามาล้อมจับเพื่อกำจัดเชื้อแบคทีเรียนั้นออกไปนอกตัว และทำให้ปริมาณเม็ดเลือดในระบบไหลเวียนลดลง

3.4 จำนวนแบคทีเรียแลกติก, ยีสต์, *Vibrio* sp. และจุลินทรีย์ทั้งหมดในระบบทางเดินอาหารของกุ้งขาว

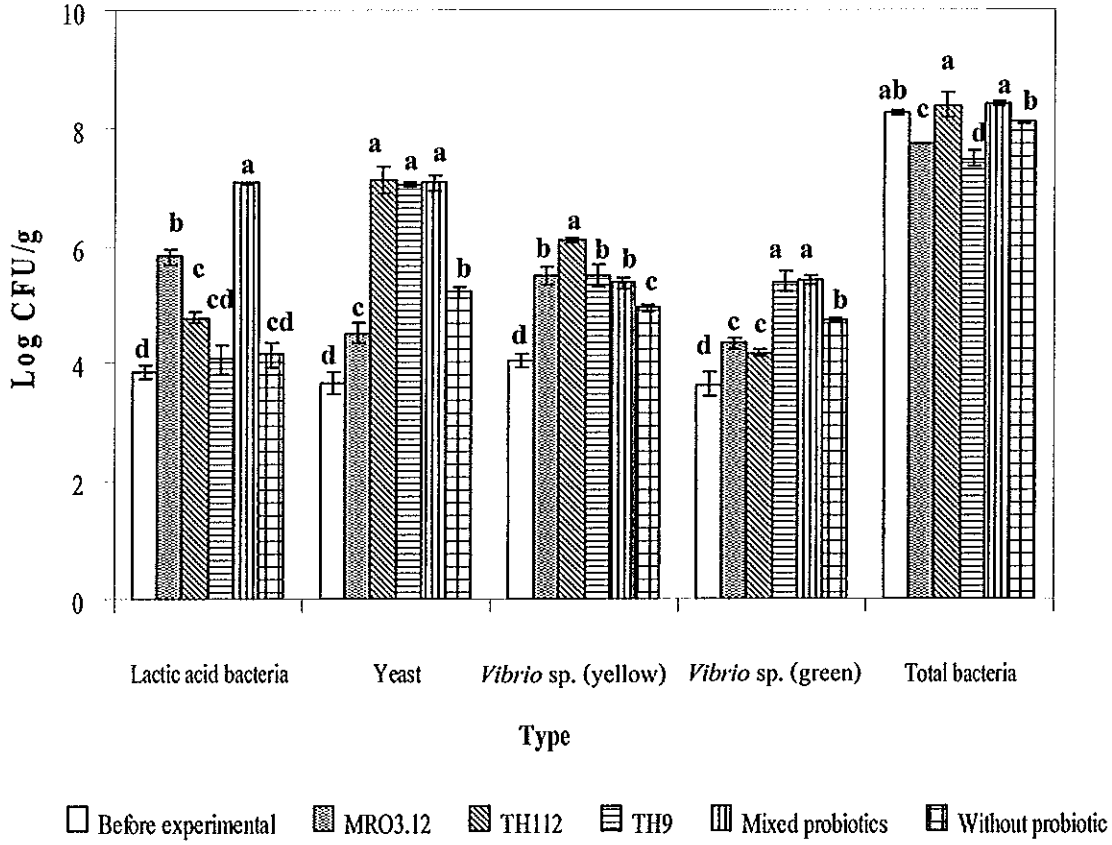
จากการตรวจนับแบคทีเรียแลกติก, ยีสต์, *Vibrio* sp. และจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในระบบทางเดินอาหารของกุ้งขาวก่อนและหลังได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกเป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าทางเดินอาหารของกุ้งขาวก่อนเริ่มการทดลองมีปริมาณแบคทีเรียแลกติก 3.87 log CFU ต่อกรัมของทางเดินอาหาร และเพิ่มเป็น 5.82 และ 7.07 log CFU ต่อกรัมของทางเดินอาหาร ซึ่งเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ หลังจาก 6 สัปดาห์ เมื่อได้รับอาหารผสมเชื้อ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 เพียงชนิดเดียว และได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกทั้ง 3 ชนิด ตามลำดับ ส่วนกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสม *Candida tropicalis* TH112 เพียงชนิดเดียว, กุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่ไม่ผสมโปรไบโอติก และกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสม *Pseudozyma antarctica* TH9 เพียงชนิดเดียว มีปริมาณแบคทีเรียแลกติกที่ 4.78, 4.16 และ 4.08 log CFU ต่อกรัมของทางเดินอาหารตามลำดับ และเมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์พบว่ากุ้งขาวในชุดที่ได้รับอาหารที่ผสม *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 เพียงชนิดเดียว และได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกทั้ง 3 ชนิดมีปริมาณแบคทีเรียแลกติกมากกว่ากุ้งขาวในกลุ่มที่ไม่ได้รับ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 อย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 15 และตารางภาคผนวก ค ที่ 19)



* mean data in the same treatments are significantly different *($p<0.05$)*.

ภาพที่ 14 ปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9, ชุดของเชื้อผสมทั้ง 3 ชนิด เปรียบเทียบกับกุ้งขาวชุดควบคุมที่ได้รับอาหารที่ไม่มีการเติมโปรไบโอติกที่ระยะเวลาการเลี้ยงที่ 6 สัปดาห์ กราฟแท่งของปริมาณเม็ดเลือดในสัปดาห์ที่ 6 ที่กำกับด้วยอักษรต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *($p<0.05$)*

Figure 14 Total count of haemocyte from white shrimps before and after being fed on diets contained *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9, mixed probiotics compared to control treatment (without porbiotic) at 6 week feeding trial. Bars (mean±SD.) of total haemocyte count at 6 week with different letters are significantly different *($p<0.05$)* among treatments.



ภาพที่ 15 จำนวนแบคทีเรียแลกติก, ยีสต์, *Vibrio* sp. และ แบคทีเรียทั้งหมด ในระบบทางเดินอาหารของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสม *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9, โปรไบโอติกผสมทั้ง 3 ชนิด และ กุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่ไม่ผสมโปรไบโอติกที่ระยะเวลาการเลี้ยงที่ 6 สัปดาห์ เปรียบเทียบกับกุ้งขาวชุดก่อนได้รับอาหารที่มีโปรไบโอติก กราฟแท่งที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิต *($p<0.05$)* (ใช้ตัวอย่างชุดการทดลองละ 3 ตัว)

Figure 15 Microbial counts in gastrointestinal tract of white shrimp fed on diets contained *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9, mixed probiotics and control treatment (without probiotic) at 6 week feeding trial compared to white shrimp before probiotics feeding. Data (mean ± SD.) with different letters are significantly different *($p<0.05$)* among treatments (n=3).

สำหรับปริมาณยีสต์ที่ตรวจพบในระบบทางเดินอาหารของกุ้งขาวจะให้ผลในทำนองเดียวกันกับปริมาณแบคทีเรียแลกติก คือก่อนการทดลองกุ้งขาวมีปริมาณยีสต์อยู่ที่ 3.68 log CFU ต่อ

กรัมของทางเดินอาหาร แต่หลังจากได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกเป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบปริมาณยีสต์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะในทางเดินอาหารของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมยีสต์ *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9 และโปรไบโอติกทั้ง 3 ชนิด มีปริมาณเชื้อยีสต์สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ คือ 7.12, 7.05 และ 7.07 log CFU ต่อกรัมของทางเดินอาหาร ตามลำดับ ส่วนกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่ผสม *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 เพียงชนิดเดียว และกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่ไม่ผสมโปรไบโอติก มีปริมาณยีสต์เพิ่มขึ้นเป็น 4.52 และ 5.22 log CFU ต่อกรัมของทางเดินอาหาร ตามลำดับ ซึ่งเพิ่มขึ้นน้อยกว่ากุ้งที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกที่มียีสต์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 15 และตารางภาคผนวก ค ที่ 19)

ในการตรวจนับปริมาณ *Vibrio* sp. ได้รายงานการตรวจนับเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม *Vibrio* sp. ที่มีลักษณะโคโลนีเป็นสีเหลือง และสีเขียวบนอาหาร TCBS agar ตามความสามารถของ *Vibrio* sp. ในการหมักน้ำตาลซูโครสบนอาหาร TCBS เนื่องจากในการศึกษาการเลี้ยงสัตว์น้ำมักพบว่ากลุ่ม *Vibrio* sp. ที่สามารถหมักน้ำตาลซูโคสถือว่าเป็น good vibrio เช่น *Vibrio alginolyticus* (Garriques and Wyban, 1993) และจากรายงานของ Lightner (1993) อ้างโดย มณฑกานต์ ทองสม (2547) พบว่าการเติมน้ำตาลทราย 3 กิโลกรัมต่อไร่ลงไปในบ่อเพาะเลี้ยงจะช่วยส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ในกลุ่มที่มีประโยชน์ที่สามารถใช้น้ำตาลทรายได้ และจะทำให้ปริมาณเชื้อก่อโรคเช่น *Vibrio harveyi*, *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio vulnificus* ซึ่งเป็นกลุ่มที่ไม่สามารถใช้น้ำตาลทรายได้ลดปริมาณลง โดย Austin (1995) พบว่า *Vibrio alginolyticus* ที่มีลักษณะโคโลนีสีเหลือง ขนาด 3-5 มิลลิเมตร บนอาหาร TCBS agar สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในปลา เช่น *Vibrio ordalii* และ *Vibrio anguillarum* จากการทดลองครั้งนี้พบว่าทางเดินอาหารของกุ้งขาวก่อนเริ่มต้นการทดลองมีปริมาณเชื้อ *Vibrio* sp. สีเหลืองที่ 4.05 log CFU ต่อกรัมของทางเดินอาหาร และเมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 6 สัปดาห์พบว่ากุ้งขาวในทุกชุดการทดลองมีปริมาณ *Vibrio* sp. สีเหลืองเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยกุ้งขาวที่ได้รับ *Candida tropicalis* TH112 เพียงชนิดเดียวมีปริมาณ *Vibrio* sp. สีเหลืองมากที่สุดที่ 6.10 log CFU ต่อกรัมของทางเดินอาหาร และรองลงมาคือ กุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสม *Pseudozyma antarctica* TH9, *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 เพียงชนิดเดียว, กุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกทั้ง 3 ชนิด และกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่ไม่ผสมโปรไบโอติก โดยมีปริมาณ *Vibrio* sp. สีเหลืองที่ 5.50, 5.49, 5.37 และ 4.95 log CFU ต่อกรัมของทางเดินอาหาร ตามลำดับ และสำหรับ *Vibrio* sp. สีเขียว พบว่ากุ้งขาวก่อนเริ่มต้นการทดลองมีปริมาณเชื้อที่ 3.65 log CFU ต่อกรัมของทางเดินอาหาร และเมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 6 สัปดาห์ พบว่าทางเดินอาหารของกุ้งขาวในทุกชุดการทดลองมีปริมาณ *Vibrio* sp. สีเขียวที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกัน โดยกุ้งขาวที่ได้รับอาหาร

ผสมโปรไบโอติกทั้ง 3 ชนิดมีปริมาณ *Vibrio* sp. สีเขียวมากที่สุดที่ 5.42 log CFU ต่อกรัมอาหาร ส่วนกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสม *Pseudozyma antarctica* TH9 เพียงชนิดเดียว, กุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่ไม่ผสมโปรไบโอติก, กุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่ผสม *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 และ*Candida tropicalis* TH112 เพียงชนิดเดียว มีปริมาณ *Vibrio* sp. สีเขียวที่ 5.39, 4.73, 4.34 และ 4.17 log CFU ต่อกรัมของทางเดินอาหาร ตามลำดับ (ภาพที่ 15 และตารางภาคผนวก ค ที่ 19)

เมื่อนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในระบบทางเดินอาหารของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกทั้ง 3 ชนิด และกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสม *Candida tropicalis* TH112 เพียงชนิดเดียวครบ 6 สัปดาห์มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดสูงขึ้นโดยมีปริมาณ 8.41 และ 8.38 log CFU ต่อกรัมของทางเดินอาหาร ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่แตกต่างกับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในทางเดินอาหารของกุ้งขาวก่อนให้อาหารที่ผสมโปรไบโอติกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งมีจำนวน 8.26 log CFU ต่อกรัมของทางเดินอาหาร ส่วนกุ้งขาวที่ไม่ได้รับโปรไบโอติก, กุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสม *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 เพียงชนิดเดียวมีปริมาณแบคทีเรียที่ 8.09, 7.72 และ 7.47 log CFU ต่อกรัมของทางเดินอาหาร ตามลำดับ (ภาพที่ 15 และตารางภาคผนวก ค ที่ 19)

ผลการทดลองแสดงจำนวนแบคทีเรียแลกติกและยีสต์ในทางเดินอาหารของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมของ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 เพียงชนิดเดียว และได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกทั้ง 3 ชนิด มีปริมาณที่สูงกว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่ไม่ผสมโปรไบโอติก แสดงว่าการให้อาหารที่ผสมโปรไบโอติกสามารถเพิ่มปริมาณของจุลินทรีย์ที่จัดว่าเป็นโปรไบโอติกในระบบทางเดินอาหารของกุ้งขาวได้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Wang และคณะ (2005) ที่พบว่ากุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยโปรไบโอติกทางการค้ามีปริมาณ *Bacillus* sp. มากกว่ากุ้งขาวในชุดควบคุมโดยมีปริมาณ *Bacillus* sp. 1.52×10^4 และ 9.80×10^2 CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนั้นยังพบว่ากุ้งขาวที่ได้รับโปรไบโอติกมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่สูงกว่าด้วย โดยมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด 1.95×10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร ในขณะที่กุ้งขาวในชุดควบคุมมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด 1.89×10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของมณฑกานต์ ทองสม (2547) ที่เลี้ยงกุ้งกุลาดำด้วยอาหารผสมโปรไบโอติกเป็นเวลา 1 เดือน โดยพบว่าปริมาณแบคทีเรียแลกติกในทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำ 2.4×10^2-1.0×10^5 CFU ต่อกรัมของทางเดินอาหาร ในขณะที่ชุดควบคุมที่ไม่ได้รับโปรไบโอติกมีปริมาณแบคทีเรียแลกติก 1.1×10^2 CFU ต่อกรัมของทางเดินอาหาร และเมื่อนับจำนวน *Vibrio* sp. พบว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับโปรไบโอติกมีปริมาณ *Vibrio* sp. 1.1×10^4-1.9×10^5 CFU ต่อกรัมของทางเดินอาหาร ในขณะที่กุ้งกุลาดำที่ไม่ได้รับโปรไบโอติกมีปริมาณ *Vibrio* sp. 1.1×10^5 CFU ต่อกรัมของทางเดินอาหาร และจากการทดลองของ Li และคณะ (2007) พบว่ากุ้งขาวที่เลี้ยงในสารแขวนลอยของจุลินทรีย์โปรไบโอติกสายพันธุ์

Bacillus licheniformis ปริมาณ 10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและปริมาณ *Vibrio* sp. $5.1x10^6$ และ $1.16x10^5$CFU ต่อกรัมของทางเดินอาหาร ตามลำดับ ในขณะที่กุ้งขาวที่ไม่ได้รับโปรไบโอติก มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและปริมาณ *Vibrio* sp. $4.4x10^5$ และ $2.6x10^5$ CFU ต่อกรัมของทางเดินอาหาร ตามลำดับ นอกจากแบคทีเรียแล้ว จิตรวดี เชยชม (2548) ยังพบว่ายีสต์ก็มีความสามารถในการยึดเกาะที่ผนังลำไส้เช่นกัน โดยตรวจพบปริมาณยีสต์ในทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมเชื้อยีสต์มีค่าอยู่ที่ $4.65x10^4$-$2.57x10^5$ CFU ต่อกรัมของทางเดินอาหาร ในขณะที่กุ้งกุลาดำที่ไม่ได้รับยีสต์มีค่าอยู่ที่ $9.3x10^3$ CFU ต่อกรัมอาหาร

3.5 ความสามารถในการต้านทานแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* (Challenge test)

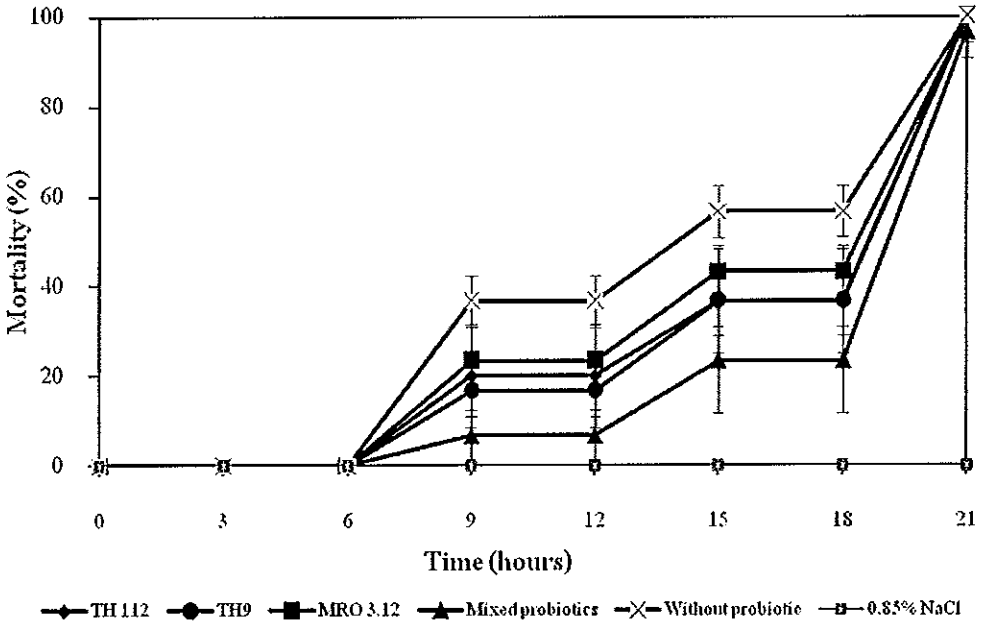
เมื่อเลี้ยงกุ้งขาวในแต่ละชุดครบ 6 สัปดาห์ ได้นำกุ้งมาทดสอบความสามารถในการต้านทานเชื้อ *Vibrio harveyi* โดยจะแบ่งกลุ่มการทดลองเป็น 2 ชุด คือ

3.5.1 การฉีด *Vibrio harveyi* เข้าระบบเลือดกุ้งโดยตรง (Injection challenge)

กุ้งขาวในแต่ละชุดการทดลอง ถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม โดยกุ้งในกลุ่มแรกถูกฉีดด้วยสารแขวนลอยของ *Vibrio harveyi* ที่มีความเข้มข้น 4.8-$7.61x10^7$CFU ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นสุดท้ายของ *Vibrio harveyi* ในกุ้ง คือ 4.8-$7.61x10^5$CFU ต่อกรัม) ส่วนอีกกลุ่มถูกฉีดด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ที่ปลอดเชื้อ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เพื่อเป็นการยืนยันผลการทดลองว่ากุ้งที่ตายเกิดจากการติดเชื้อจริง ไม่ใช่เกิดจากบาดแผลของการฉีดเชื้อ โดยแต่ละชุดการทดลองใช้กุ้งขาว 10 ตัว หลังจากนั้นสังเกตและบันทึกอัตราการตายหลังการฉีดเชื้อทุก ๆ 3 ชั่วโมงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และจากการทดลองพบว่า กุ้งขาวในแต่ละชุดการทดลองเริ่มแสดงอาการของการติดเชื้อ คือ เริ่มว่ายน้ำช้าลง ลอยนิ่งอยู่กับที่ และเริ่มตายหลังจาก 6 ชั่วโมงของการฉีดเชื้อ และอัตราการตายจะเริ่มเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จากชั่วโมงที่ 9-21 โดยพบว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกทั้ง 3 ชนิด มีอัตราการตายที่ต่ำที่สุดในทุกช่วงเวลา โดยในชั่วโมงที่ 9 กุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกทั้ง 3 ชนิดมีอัตราการตาย 6.67 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสม *Candida tropicalis* TH112, *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Pseudozyma antarctica* TH9 เพียงชนิดเดียว และกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่ไม่ผสมโปรไบโอติก มีอัตราการตาย 16.67, 20.00, 23.33 และ 33.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ต่อมาในชั่วโมงที่ 12 พบว่ากุ้งขาวในทุกชุดการทดลองมีอัตราการตายเท่ากับชั่วโมงที่ 9 และเมื่อถึงชั่วโมงที่ 18 พบว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกทั้ง 3 ชนิดอัตราการตายเพิ่มขึ้นเป็น 23.33 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสม *Candida tropicalis* TH112, *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Pseudozyma antarctica* TH9 เพียงชนิดเดียว และกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่ไม่ผสมโปรไบโอติก มีอัตราการตาย 36.67, 36.67, 43.33 และ 56.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อถึงชั่วโมงที่ 21 พบว่ามีเพียงกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก

ทั้ง 3 ชนิดเท่านั้นที่รอดชีวิต โดยกุ้งขาวมีอัตราการตาย 96.67 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสม *Candida tropicalis* TH112, *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Pseudozyma antarctica* TH9 เพียงชนิดเดียว และกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่ไม่ผสมโปรไบโอติก มีอัตราการตาย 100 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อพิจารณาอัตราการตายของกุ้งขาวที่ฉีดด้วย สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าในแต่ละชุดการทดลองไม่มีกุ้งขาวที่ตาย ดังนั้นจึงยืนยันได้ว่าการตายของกุ้งในแต่ละชุดการทดลองไม่ได้เกิดจากบาดแผลของการฉีดด้วยเข็มฉีดยา เมื่อนำอัตราการตายมาวิเคราะห์ผลทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ที่ชั่วโมงที่ 9-12 กุ้งขาวทุกชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกมีอัตราการตายที่ต่ำกว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่ไม่มีการเติมโปรไบโอติกอย่างมีนัยสำคัญ และ ที่ชั่วโมงที่ 15-18 กุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกในชุดของโปรไบโอติกผสมทั้ง 3 ชนิด, *Candida tropicalis* TH112 และ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 เพียงชนิดเดียวมีอัตราการตายที่ต่ำกว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารไม่ผสมโปรไบโอติกอย่างมีนัยสำคัญ *($p<0.05$)* แต่กุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสม *Pseudozyma antarctica* TH9 เพียงชนิดเดียวมีอัตราการตายที่ไม่แตกต่างจากกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่ไม่มีการเติมโปรไบโอติกอย่างมีนัยสำคัญ *($p>0.05$)* (ภาพที่ 16 และตารางภาคผนวก ค ที่ 20)

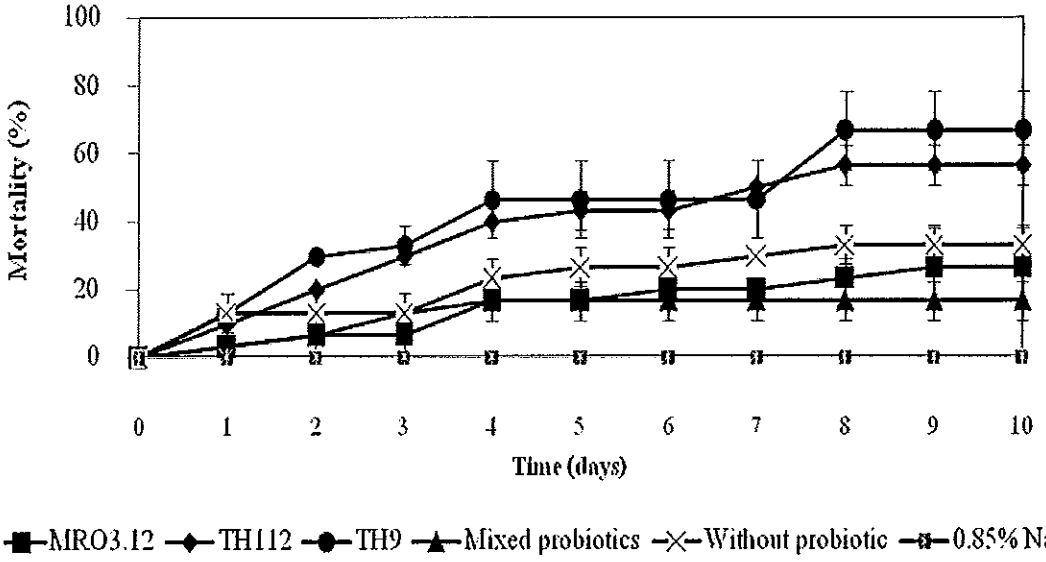
เมื่อลดระดับความเข้มข้นของ *Vibrio harveyi* เป็น 4.8-7.61x10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร (ความเข้มข้นสุดท้ายของ *Vibrio harveyi* ในกุ้ง คือ 4.8-7.61x10^3CFU ต่อกรัม) โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับตอนต้น หลังจากนั้นสังเกตและบันทึกการตายหลังการฉีดเชื้อทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 10 วัน พบว่า กุ้งขาวที่ได้รับ *Vibrio harveyi* ทุกชุดการทดลองแสดงอาการของการติดเชื้อ และตายหลังจากได้รับเชื้อเป็นเวลา 1 วัน โดยพบว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่ผสมโปรไบโอติกทั้ง 3 ชนิด มีอัตราการตายที่ต่ำที่สุดหลังจากได้รับเชื้อผ่านไป 10 วัน โดยมีอัตราการตายที่ 16.67 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสม *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 เพียงชนิดเดียว, กุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่ไม่ผสมโปรไบโอติก, กุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสม *Candida tropicalis* TH112 และ กุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสม *Pseudozyma antarctica* TH9 เพียงชนิดเดียว มีอัตราการตาย 23.33, 33.33, 56.67 และ 66.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาอัตราการตายของกุ้งขาวที่ฉีดด้วย สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าในแต่ละชุดการทดลองไม่มีกุ้งขาวที่ตาย ดังนั้นจึงยืนยันได้ว่าการตายของกุ้งในแต่ละชุดการทดลองไม่ได้เกิดจากบาดแผลของการฉีดด้วยเข็มฉีดยา เมื่อนำอัตราการตายมาวิเคราะห์ผลทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ พบว่ากุ้งขาวในชุดที่ได้รับโปรไบโอติกผสมทั้ง 3 ชนิด และกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสม *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 เพียงชนิดเดียวมีอัตราการตายที่ต่ำกว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่ไม่ผสมโปรไบโอติกอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 17 และตารางภาคผนวก ค ที่ 21)



Values aer mean ± SD. (n=10)

ภาพที่ 16 อัตราการตายของกุ้งขาวเมื่อฉีด *Vibrio harveyi* ที่ความเข้มข้น 4.8-7.61x10^7 CFU ต่อมิลลิลิตรหลังจากการเลี้ยงด้วย อาหารผสม *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9 และชุดโปรไบโอติกผสมทั้ง 3 ชนิดเปรียบเทียบกับกุ้งขาวชุดควบคุมที่ได้รับอาหารที่ไม่ผสมโปรไบโอติก ครบ 6 สัปดาห์

Figure 16 % mortality of white shrimp fed on diets contained *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9, mixed probiotics compared to control treatment (without porbiotics) at 6 week feeding trial after challenged test by injected with cell suspension of *Vibrio harveyi* at the concentration 4.8-7.61 x10^7CFU/ml.



Values aer mean ± SD. (n=10)

ภาพที่ 17 อัตราการตายของกุ้งขาวเมื่อฉีด *Vibrio harveyi* ที่ความเข้มข้น 4.8-7.61x10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร หลังจากการลี้ยงด้วย อาหารผสม *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9 และโปรไบโอติกผสมทั้ง 3 ชนิด เปรียบเทียบกับกุ้งขาวชุดควบคุมที่ได้รับอาหารที่ไม่ผสมโปรไบโอติก ครบ 6 สัปดาห์

Figure 17 % mortality of white shrimp fed on diets contained *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9, mixed probiotics compared to control treatment (without porbiotic) at 6 week feeding trial after challenged test by injected with cell suspension of *Vibrio harveyi* at the concentration 4.8-7.61 x10^5CFU/ml.

3.5.2 การแช่กุ้งขาวในน้ำทะเลที่มี *Vibrio harveyi* (Immersion challenge)

จากการนำกุ้งขาวในแต่ละชุดการทดลอง มาชุดการทดลองละ 10 ตัว และแช่ในถังที่มี *Vibrio harveyi* 4.8-7.61x10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนน้ำเป็นน้ำทะเลปกติที่ไม่มี *Vibrio harveyi* พบว่ากุ้งในทุกชุดการทดลองไม่แสดงอาการของการติดเชื้อหลังจากได้รับเชื้อเป็นเวลา 10 วัน โดยพบว่าทุกชุดการทดลองมีอัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์เท่ากัน และเมื่อนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลกติก ยีสต์ และ *Vibrio* sp. ในแต่ละชุดการทดลอง พบว่าหลังจาก

การแช่กุ้งขาวในน้ำทะเลที่มี *Vibrio harveyi* 4.8-7.61x10^5 CFU ต่อมิลลิลิตรเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทางเดินอาหารของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่ไม่ผสมโปรไบโอติกมีปริมาณ *Vibrio* sp. (โคโลนีสีเขียวบนอาหาร TCBS) สูงสุดที่ 5.37 log CFU ต่อกรัมของทางเดินอาหาร รองลงมาคือกุ้งขาวในชุดที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกทั้ง 3 ชนิด, *Pseudozyma antarctica* TH9, *Candida tropicalis* TH112 และ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 เพียงชนิดเดียว โดยพบ *Vibrio* sp. จำนวน 4.41, 4.25, 4.18 และ 4.12 log CFU ต่อกรัมของทางเดินอาหาร ตามลำดับ ซึ่งน้อยกว่าจำนวน *Vibrio* sp. ในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่ไม่ผสมโปรไบโอติก อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 7 เมื่อนำกุ้งขาวที่แช่ในน้ำที่มี *Vibrio harveyi* ครบ 48 ชั่วโมงมาตรวจนับเชื้อแบคทีเรียแลกติก และ ยีสต์ พบว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสม *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 เพียงชนิดเดียว และได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกทั้ง 3 ชนิด มีปริมาณแบคทีเรียแลกติกในทางเดินอาหารสูงกว่ากุ้งที่ไม่ได้รับ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลกติก 5.67 และ 5.38 log CFU ต่อกรัมของทางเดินอาหาร ตามลำดับ รองลงมาเป็นทางเดินอาหารของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมยีสต์ *Pseudozyma antarctica* TH9 หรือ *Candida tropicalis* TH112 เพียงชนิดเดียว คือมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลกติก 4.29 และ 3.90 log CFU ต่อกรัมของทางเดินอาหาร โดยกุ้งขาวที่ไม่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก พบปริมาณแบคทีเรียแลกติกต่ำสุดที่ 3.08 log CFU ต่อกรัม ส่วนปริมาณเชื้อยีสต์พบว่าทางเดินอาหารของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมยีสต์ *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 เพียงชนิดเดียว และได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกทั้ง 3 ชนิด มีปริมาณยีสต์ที่สูงกว่ากุ้งที่ไม่ได้รับ *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยมีปริมาณยีสต์ 7.37, 6.41 และ 6.54 log CFU ต่อกรัมของทางเดินอาหาร ตามลำดับรองลงมาเป็นทางเดินอาหารของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสม *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 เพียงชนิดเดียว และชุดที่ไม่ได้รับโปรไบโอติก ซึ่งมีปริมาณยีสต์ 3.72 และ 4.62 log CFU ต่อกรัมของทางเดินอาหาร ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 7

หลังจากทำให้กุ้งขาวติดเชื้อ *Vibrio harveyi* แล้วเลี้ยงต่อจนครบ 10 วัน นำทางเดินอาหารของกุ้งขาวในแต่ละชุดการทดลองมาหาปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลกติก ยีสต์ และ *Vibrio* sp. อีกครั้ง พบว่า กุ้งขาวในชุดที่ได้รับอาหารที่ไม่ผสมโปรไบโอติก มีปริมาณ *Vibrio* sp. ที่มีลักษณะโคโลนีสีเขียวบนอาหาร TCBS agar สูงกว่ากุ้งขาวที่ได้รับโปรไบโอติกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยมีปริมาณ *Vibrio* sp. ที่มีลักษณะโคโลนีสีเขียวบนอาหาร TCBS agar 4.47 log CFU ต่อกรัมของทางเดินอาหาร ส่วนกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสม *Candida tropicalis* TH112 เพียงชนิดเดียวมีปริมาณเชื้อ 4.06 log CFU ต่อกรัมของทางเดินอาหาร ในขณะที่กุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสม *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Pseudozyma antarctica* TH9 เพียงชนิด

เดียว และผสมโปรไบโอติกทั้ง 3 ชนิด ตรวจไม่พบเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีสีเขียว และมีขนาด 2-3 มิลลิเมตรของ *Vibrio* sp. ก่อโรค บนอาหาร TCBS และเมื่อพิจารณาถึงความสามารถในการกำจัดเชื้อ *Vibrio harveyi* ออกจากตัวกุ้ง พบว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกทั้ง 3 ชนิดสามารถกำจัดเชื้อได้ 4.41 log CFU ต่อกรัมของทางเดินอาหาร รองลงมาคือ กุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสม *Pseudozyma antarctica* TH9, *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 เพียงชนิดเดียว, กุ้งขาวในชุดที่ได้รับอาหารที่ไม่ผสมโปรไบโอติก และกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสม *Candida tropicalis* TH112 เพียงชนิดเดียว ซึ่งสามารถลดปริมาณเชื้อลง 4.25, 4.12, 0.9 และ 0.12 log CFU ต่อกรัมของทางเดินอาหาร ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 7 ส่วนผลการนับจำนวนแบคทีเรียแลกติก และยีสต์ เมื่อครบ 10 วันเป็นทำนองเดียวกับผลการทดลองในช่วงแรกโดย พบว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสม *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 เพียงชนิดเดียว และได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกทั้ง 3 ชนิด มีปริมาณแบคทีเรียแลกติกในทางเดินอาหารสูงกว่ากุ้งที่ไม่ได้รับ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลกติก 6.04 และ 5.39 log CFU ต่อกรัมของทางเดินอาหาร รองลงมาคือทางเดินอาหารของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วย *Candida tropicalis* TH112 เพียงชนิดเดียว และ กุ้งขาวที่ไม่ได้รับโปรไบโอติกมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลกติก 2.82 และ 4.82 log CFU ต่อกรัมของทางเดินอาหาร ตามลำดับ ส่วนกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสม *Pseudozyma antarctica* TH9 เพียงชนิดเดียว ตรวจไม่พบเชื้อที่มีโคโลนีสีเหลือง ซึ่งเป็นลักษณะของแบคทีเรียแลกติกบนอาหาร MRS agar ที่มี bromocresol purple 0.02 เปอร์เซ็นต์ ส่วนปริมาณเชื้อยีสต์พบว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมยีสต์ *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 เพียงชนิดเดียว และได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกทั้ง 3 ชนิด มีปริมาณยีสต์ที่สูงกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ โดยพบว่ากุ้งขาวที่ได้รับ *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9 เพียงชนิดเดียว และโปรไบโอติกผสมทั้ง 3 ชนิด มีปริมาณยีสต์ 7.97, 7.85 และ 5.86 log CFU ต่อกรัมของทางเดินอาหาร ตามลำดับ ส่วนกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมของ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 เพียงชนิดเดียว และชุดที่ไม่ได้รับโปรไบโอติกมีปริมาณยีสต์ 4.29 และ 3.78 log CFU ต่อกรัมของทางเดินอาหาร ตามลำดับ และเมื่อวิเคราะห์ค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ พบว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารเชื้อยีสต์ *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 เพียงชนิดเดียว และได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกทั้ง 3 ชนิด จะให้ปริมาณยีสต์ที่สูงกว่าชุดที่ไม่ได้รับ *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 อย่างมีนัยสำคัญ ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 จำนวนแบคทีเรียแลกติก ยีสต์ และ *Vibrio* sp. ที่พบในทางเดินอาหารกุ้งขาวเมื่อทดสอบการต้านทานเชื้อ *Vibrio harveyi* ด้วยการแช่ในสารแขวนลอยของเชื้อที่มีความเข้มข้น 4.8-7.61x10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร ตัวเลขที่กำกับด้วยอักษรต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *($p<0.05$)*

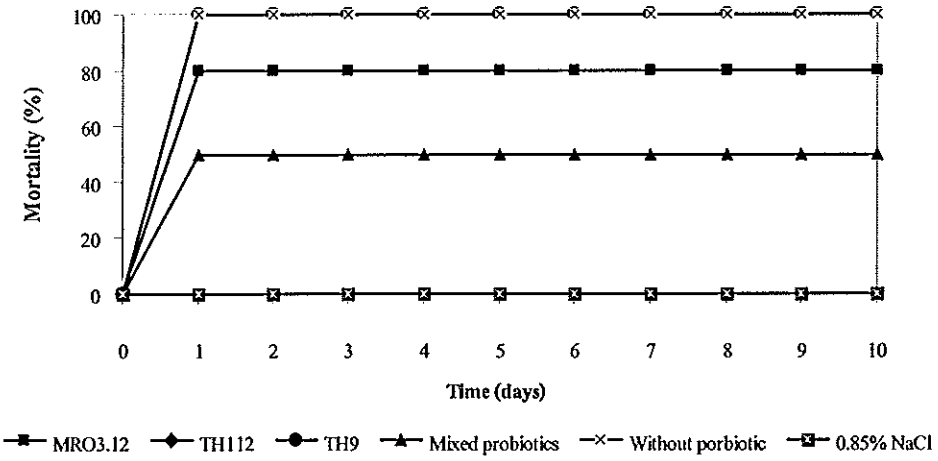
Table 7 Microbial counts in white shrimp gastrointestinal tract after challenged test by immersed with cell suspension of *Vibrio harveyi* at the concentration 4.8-7.61x10^{5}CFU/ml. Data (mean±SD.) with different letters are significantly different *($p<0.05$)* among treatments (n=3).

Strains	Treatments	Microbial counts (log CFU/g)	
		48 hrs	10 days
Lactic acid bacteria	MRO3.12	5.67 ± 0.02^{a}	6.04 ± 0.08^{a}
	TH112	3.90 ± 0.17^{d}	2.82 ± 0^{d}
	TH9	4.29 ± 0.12^{c}	ND.
	Mixed probiotics	5.38 ± 0.11^{b}	5.39 ± 0.11^{b}
	Without probiotic	3.02 ± 0.17^{e}	4.82 ± 0.12^{c}
Yeast	MRO3.12	3.72 ± 0.18^{d}	4.29 ± 0.05^{c}
	TH112	7.37 ± 0.14^{a}	7.97 ± 0.07^{a}
	TH9	6.41 ± 0.14^{b}	7.85 ± 0.05^{a}
	Mixed probiotics	6.54 ± 0.07^{b}	5.86 ± 0.20^{b}
	Without probiotic	4.62 ± 0.09^{c}	3.78 ± 0.05^{d}
Vibrio sp. (Green)	MRO3.12	4.12 ± 0.12^{b}	ND.
	TH112	4.18 ± 0.10^{b}	4.06 ± 0.10^{b}
	TH9	4.25 ± 0.23^{b}	ND.
	Mixed probiotics	4.41 ± 0.26^{b}	ND.
	Without probiotic	5.37 ± 0.32^{a}	4.47 ± 0.07^{a}

ND. means Not detectable.

เมื่อทำให้กุ้งขาวติดเชื้อ *Vibrio harveyi* โดยวิธีการแช่ในน้ำทะเลที่มี *Vibrio harveyi* ปริมาณสูง (4.8-7.61x10^7 CFU ต่อมิลลิลิตร) พบว่ากุ้งขาวแสดงอาการของการติดเชื้อภายใน 5 ชั่วโมงแรก โดยกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสม *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9

เพียงชนิดเดียว และ กุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่ไม่ผสมโปรไบโอติกมีอัตราการตายสูงสุดที่ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกุ้งขาวชุดที่ได้รับอาหารผสม *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 เพียงชนิดเดียว และ ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกทั้ง 3 ชนิด มีอัตราการตาย 80.00 และ 50.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และไม่พบอัตราการตายในกุ้งขาวที่ไม่ผ่านการแช่เชื้อ *Vibrio harveyi* เมื่อเวลาผ่านไป 10 วันไม่มีการตายเพิ่มในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสม *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 เพียงชนิดเดียว และ ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกทั้ง 3 ชนิด (ภาพที่ 18 และตารางภาคผนวก ค ที่ 22) แสดงให้เห็นว่าปริมาณเชื้อ *Vibrio harveyi* มีผลต่อการตายของกุ้งขาว ซึ่งถ้ามี ปริมาณ *Vibrio harveyi* ที่มากขึ้นจะส่งผลให้กุ้งขาวมีอัตราการตายเพิ่มสูงขึ้นด้วย



Values aer mean ± SD. (n=5)

ภาพที่ 18 อัตราการตายของกุ้งขาวเมื่อแช่ในน้ำทะเลที่มี *Vibrio harveyi* 4.8-7.61x10^7 CFU ต่อมิลลิลิตร หลังจากการเลี้ยงด้วย อาหารผสม *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9 และ โปรไบโอติกผสมทั้ง 3 ชนิด เปรียบเทียบกับกุ้งขาวชุดควบคุมที่ได้รับอาหารที่ไม่มีการเติมโปรไบโอติก ครบ 6 สัปดาห์

Figure 18 % mortality of white shrimp fed on diets contained *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9, mixed probiotics compared to control treatment (without porbiotic) at 6 week feeding trial after challenged test by immersed with cell suspension of *Vibrio harveyi* at the concentration 4.8-7.61 x10^7CFU/ml.

เมื่อทำการตรวจนับปริมาณแบคทีเรียแลกติก ยีสต์ และ *Vibrio* sp. ในทางเดินอาหารของกุ้งขาวแต่ละชุดการทดลอง พบว่าหลังจากการแช่กุ้งขาวในน้ำทะเลที่มี *Vibrio harveyi* 4.8-7.61x10^7 CFU ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 5 ชั่วโมง กุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่ไม่ผสมโปรไบโอติกมีปริมาณเชื้อ *Vibrio* sp. ที่มีลักษณะโคโลนีสีเขียวบนอาหาร TCBS agar น้อยกว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกเพียงชนิดเดียวของ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9 และ อาหารผสมโปรไบโอติกทั้ง 3 ชนิด อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าที่ 6.94 log CFU ต่อกรัมของทางเดินอาหาร รองลงมาคือกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่ผสม *Pseudozyma antarctica* TH9 เพียงชนิดเดียว, โปรไบโอติกผสมทั้ง 3 ชนิด, *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 และ *Candida tropicalis* TH112 เพียงชนิดเดียว โดยมีปริมาณเชื้อ *Vibrio* sp. ที่มีลักษณะโคโลนีสีเขียวบนอาหาร TCBS agar 7.44, 7.48, 7.51 และ 7.68 log CFU ต่อกรัมของทางเดินอาหาร ส่วนการนับแบคทีเรียแลกติก และยีสต์ พบว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมเชื้อ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 เพียงชนิดเดียว และได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกทั้ง 3 ชนิด มีปริมาณแบคทีเรียแลกติกในทางเดินอาหารที่สูงกว่ากุ้งที่ไม่ได้รับ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลกติก 5.45 และ 5.36 log CFU ต่อกรัมของทางเดินอาหาร ตามลำดับ ในขณะที่กุ้งขาวที่เลี้ยงด้วย *Pseudozyma antarctica* TH9 เพียงชนิดเดียวมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลกติก 3.22 log CFU ต่อกรัมของทางเดินอาหาร ส่วนกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสม *Candida tropicalis* TH112 เพียงชนิดเดียว และ กุ้งขาวที่ไม่ได้รับโปรไบโอติก ตรวจไม่พบเชื้อที่มีโคโลนีสีเหลือง ซึ่งเป็นลักษณะของแบคทีเรียแลกติกบนอาหาร MRS agar ที่มี bromocresol purple 0.02 เปอร์เซ็นต์ ส่วนปริมาณเชื้อยีสต์พบว่าทางเดินอาหารของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมยีสต์ *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 เพียงชนิดเดียว และได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกทั้ง 3 ชนิด มีปริมาณยีสต์ที่สูงกว่ากุ้งที่ไม่ได้รับ *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยมีปริมาณยีสต์ 6.07, 5.98 และ 6.15 log CFU ต่อกรัมของทางเดินอาหาร ตามลำดับ ส่วนกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมของ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 เพียงชนิดเดียว และชุดที่ไม่ได้รับโปรไบโอติกมีปริมาณยีสต์ 4.40 และ 3.93 log CFU ต่อกรัมของทางเดินอาหาร ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 8

เมื่อนำกุ้งขาวในชุดการทดลองที่รอดชีวิตครบ 10 วัน มาตรวจนับปริมาณเชื้อ *Vibrio* sp. ที่มีลักษณะโคโลนีสีเขียวบนอาหาร TCBS agar อีกครั้งพบว่า ทางเดินอาหารของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกทั้ง 3 ชนิด ไม่พบเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีสีเขียว ของ *Vibrio* sp. บนอาหาร TCBS agar เลย คือมีปริมาณเชื้อ *Vibrio* sp. ลดปริมาณลง 7.48 log CFU ต่อกรัมของทางเดินอาหาร และ กุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสม *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 เพียงชนิดเดียวมีปริมาณ

Vibrio sp. อยู่ 2.98 log CFU ต่อกรัมของทางเดินอาหาร หรือสามารถลดปริมาณ *Vibrio* sp. ลง 4.53 log CFU ต่อกรัมของทางเดินอาหาร ดังแสดงในตารางที่ 8 ส่วนผลการนับปริมาณแบคทีเรียแลกติกและยีสต์ในทางเดินอาหารของกุ้งเป็นไปในทำนองเดียวกับข้อมูลในช่วงแรกโดยพบว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมเชื้อ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 เพียงชนิดเดียว และกุ้งที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกทั้ง 3 ชนิด มีปริมาณแบคทีเรียแลกติกที่สูงโดยมีปริมาณ 5.41 และ 5.45 log CFU ต่อกรัมของทางเดินอาหาร ตามลำดับ ส่วนปริมาณเชื้อยีสต์พบว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกทั้ง 3 ชนิดจะมีปริมาณยีสต์ 6.22 log CFU ต่อกรัมของทางเดินอาหาร ในขณะที่ส่วนกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมของ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 เพียงชนิดเดียวตรวจไม่พบปริมาณเชื้อยีสต์บนอาหาร YM agar ดังแสดงในตารางที่ 8

เมื่อพิจารณาผลของการทดสอบการต้านทาน *Vibrio harveyi* ที่ความเข้มข้นของเชื้อ 4.8-7.61x10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร ทั้งแบบฉีดเชื้อเข้ากล้ามนื้อโดยตรง และแบบแช่ในน้ำทะเลที่มีเชื้อพบว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่ผสมโปรไบโอติกทั้ง 3 ชนิด มีความสามารถในการทนต่อการติดเชื้อได้สูงที่สุดโดยพบว่ามีอัตราการตายต่ำที่สุด 16.67 และ 0 เปอร์เซ็นต์ ของการฉีดเชื้อ และ การแช่ในน้ำทะเลที่มีเชื้อ ตามลำดับ นอกจากนั้นเมื่อนับปริมาณเชื้อในระบบทางเดินอาหารของกุ้งขาวที่ได้รับเชื้อในแบบแช่พบว่า ในช่วง 48 ชั่วโมงแรกของการแช่ในน้ำทะเลที่มีปริมาณ *Vibrio* sp. (โคโลนีสีเขียวบนอาหาร TCBS agar) ในกุ้งขาวที่ได้รับโปรไบโอติกทุกชุดไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญแต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกุ้งขาวที่ไม่ได้รับโปรไบโอติก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากกุ้งขาวในชุดที่ได้รับโปรไบโอติกมีความสามารถในการกำจัดเชื้อก่อโรคออกจากระบบเลือดได้ดีกว่ากุ้งขาวที่ไม่ได้รับโปรไบโอติก แต่เมื่อพิจารณากุ้งขาวในกลุ่มที่ได้รับอาหารผสม *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 เพียงชนิดเดียว ในแบบฉีดเชื้อเข้าระบบเลือดโดยตรงกลับมีอัตราการตายสูงกว่าชุดที่ไม่ได้รับโปรไบโอติก นั้นอาจเกิดจากทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสภาวะในการทดลองที่อาจส่งผลให้กุ้งขาวเกิดภาวะเครียด และส่งผลให้จุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของกุ้งเปลี่ยนแปลงไป หรือทำให้เกิดสภาวะที่ไม่สมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร (Burgents, 2004) และนอกจากนั้นยังพบว่าการแช่จะมีอัตราการตายที่ต่ำกว่าในแบบฉีดเนื่องจากเชื้อก่อโรคไม่ได้เข้าไปในร่างกายกุ้งโดยตรง เลยทำให้เกิดการแสดงออกของอาการติดเชื้อ และก่อให้เกิดการตายจะน้อยกว่า โดยการฉีด *Vibrio* sp. เข้ากล้ามเนื้อโดยตรงจะทำให้ความสามารถในการนำออกซิเจนเข้าสู่ร่างกายของกุ้งลดน้อยลง โดยพบว่าความสามารถนี้ลดลง 27.00 เปอร์เซ็นต์ภายใน 4 ชั่วโมง และ ลดลง 40.00 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 24 ชั่วโมง (Scholnick, 2006) ดังนั้นกุ้งขาวที่ได้รับการฉีดด้วยเชื้อจะมีอัตราการตายที่สูงกว่าชุดการทดลองแบบแช่

ตารางที่ 8 จำนวนแบคทีเรียแลกติก ยีสต์ และ *Vibrio* sp. ที่พบในทางเดินอาหารกุ้งขาวเมื่อทดสอบการต้านทานเชื้อ *Vibrio harveyi* ด้วยการแช่ในสารแขวนลอยของเชื้อที่มีความเข้มข้น 4.8-7.61x10^{7} CFU ต่อมิลลิลิตร ตัวเลขที่กำกับด้วยอักษรต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *($p<0.05$)*

Table 8 Microbial counts in white shrimp gastrointestinal tract after challenged test by immersed with cell suspension of *Vibrio harveyi* at the concentration 4.8-7.61x10^{7}CFU/ml. Data (mean±SD.) with different letters are significantly different *($p<0.05$)* among treatments (n=3).

Strains	Treatments	Microbial counts (log CFU/g)	
		5 hrs	10 days
Lactic acid bacteria	MRO3.12	5.45 ± 0.09^{a}	5.41 ± 0.08
	TH112	ND.	-
	TH9	3.22 ± 0.18^{b}	-
	Mixed probiotics	5.36 ± 0.09^{a}	5.45 ± 0.05
	Without probiotic	ND.	-
Yeast	MRO3.12	4.40 ± 0.09^{c}	ND.
	TH112	6.07 ± 0.05^{ab}	-
	TH9	5.98 ± 0.05^{b}	-
	Mixed probiotics	6.15 ± 0.09^{a}	6.22 ± 0.03
	Without probiotic	3.93 ± 0.11^{d}	-
Vibrio sp. (Green)	MRO3.12	7.51 ± 0.08^{ab}	2.98 ± 0.28
	TH112	7.68 ± 0.12^{a}	-
	TH9	7.44 ± 0.16^{b}	-
	Mixed probiotics	7.48 ± 0.09^{ab}	ND.
	Without probiotic	6.94 ± 0.11^{c}	-

- : Shrimp death occurred during these experiments, ND. means Not dectectable

เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ *Vibrio harveyi* เป็น 4.8-7.61x10^{7}CFU ต่อมิลลิลิตร และทดสอบทั้งแบบฉีดเชื้อเข้ากล้ามเนื้อโดยตรง และแบบแช่ในสารแขวนลอยของเชื้อ พบว่ากุ้งขาวที่

ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกมีอัตราการตายต่ำกว่ากุ้งขาวที่ไม่ได้รับโปรไบโอติก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก ทั้ง 3 ชนิด มีการรอดชีวิตที่สูงที่สุดโดยในการทดลองแบบฉีดพบว่าที่เวลาผ่านไป 18 ชั่วโมง กุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมของเชื้อทั้ง 3 ชนิดมีอัตราการตายต่ำสุด 23.33 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับโปรไบโอติกอื่น ๆ มีอัตราการตายที่ประมาณ 36.67-43.33 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกุ้งขาวที่ไม่ได้รับโปรไบโอติกมีอัตราการตาย 56.67 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในการทดลองแบบแช่กุ้งในน้ำทะเลที่มี *Vibrio harveyi* พบว่า กุ้งขาวที่ได้รับโปรไบโอติกผสมทั้ง 3 ชนิดมีอัตราการตายต่ำที่สุดเช่นกัน โดยมีอัตราการตาย 50 เปอร์เซ็นต์ที่เวลาการทดสอบ 10 วัน และนอกจากนั้นเมื่อทดลองนับปริมาณเชื้อในระบบทางเดินอาหารของกุ้งขาวที่ได้รับเชื้อในแบบแช่ พบว่า ในช่วง 5 ชั่วโมงแรกของการแช่ในสารแขวนลอยของเชื้อระดับของ *Vibrio* sp. (โคโลนีสีเขียวบนอาหาร TCBS agar) ในชุดการทดลองที่ได้รับโปรไบโอติกมีปริมาณมากกว่าชุดที่ไม่ได้รับโปรไบโอติกอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อสิ้นสุดการทดลองปรากฏว่ากุ้งขาวในชุดที่ได้รับโปรไบโอติกผสมทั้ง 3 ชนิด มีความสามารถในการกำจัด *Vibrio* sp. (โคโลนีสีเขียวบนอาหาร TCBS agar) ออกจากร่างกายได้ถึง 7.48 log CFU ต่อกรัมของทางเดินอาหาร

จากการทดลองจะพบว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมเชื้อทั้ง 3 ชนิดจะมีอัตราการตายที่ต่ำที่สุดไม่ว่าจะเป็นวิธีการทำให้ติดเชื้อที่แตกต่างกัน และระดับการติดเชื้อทั้งสองระดับ ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากการที่กุ้งขาวได้รับอาหารที่ผสมจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิด ที่มีคุณสมบัติในการควบคุมโรคได้หลายทางโดยเฉพาะ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 ที่คัดเลือกได้จากทางเดินอาหารของกุ้งทะเล เพราะมีกิจกรรมการยับยั้ง *Vibrio harveyi* ได้โดยตรงซึ่งจะเห็นได้จากกุ้งขาวที่ได้รับ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 เพียงอย่างเดียวสามารถลดปริมาณ *Vibrio harveyi* ได้ถึง 4.12-4.53 log CFU ต่อกรัมของทางเดินอาหาร เมื่อพิจารณาผลการทดลองที่มีการเพาะเลี้ยงร่วมกันระหว่างโปรไบโอติกทั้ง 3 ชนิด และ *Vibrio harveyi* พบว่าความสามารถในการยับยั้ง *Vibrio harveyi* ของโปรไบโอติกทั้ง 3 ชนิดเกิดจากความสามารถในการผลิตกรดอินทรีย์ของ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 ซึ่งพบว่า *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 สามารถผลิตกรดอินทรีย์ได้มากและเร็วกว่ายีสต์ทั้งสองชนิด นอกจากนั้นขนิษฐา คงนุ่ม (2550) พบว่าความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *Vibrio harveyi* ที่ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 ผลิตขึ้นมานั้นเกิดจากการทำงานร่วมกันของสารหลาย ๆ ชนิด เช่น กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และ สารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งอื่น ๆ และ Irianto และ Austin (2002) รายงานว่า แบคทีเรียแลกติกสามารถผลิตสารออกมายับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค เช่นสามารถผลิตกรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคเทอริโอซิน นอกจากนี้การใช้ยีสต์ *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 ผสมร่วมกันก็เพื่อส่งเสริมภาวะภูมิคุ้มกันในกุ้งต่อภาวะการติดเชื้อ โดยจะพบว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสม *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 ทั้งแบบเชื้อเดี่ยว และแบบ

โปรไบโอติกผสมทั้ง 3 ชนิด จะมีปริมาณเม็ดเลือดรวมที่สูงขึ้นกว่าชุดที่ไม่ได้รับโปรไบโอติก ทั้งนี้เนื่องจากส่วนเบต้ากลูแคนจากยีสต์สามารถกระตุ้นสภาวะภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวได้โดยการไปส่งเสริมการสร้างเม็ดเลือดขาวของกุ้งได้ (Chang *et al.*, 2003) ส่วน *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 นอกจากจะสามารถผลิตสารยับยั้งเชื้อ *Vibrio harveyi* แล้วยังพบว่า ที่ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 ยังสามารถช่วยส่งเสริมภาวะภูมิคุ้มกันของกุ้งได้ โดยส่วนของผนังเซลล์ที่ประกอบด้วย peptidoglycan มีความสามารถในการส่งเสริมและกระตุ้นภาวะภูมิคุ้มกันในกุ้งขาว จากการทดลองของ Chiu และ คณะ (2007) พบว่า กุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสม *Lactobacillus plantarum* ในปริมาณ 10^7 และ 10^{10} CFU ต่อกิโลกรัมอาหาร จะมีปริมาณเม็ดเลือดรวมสูงขึ้น และ มีประสิทธิภาพในการต้านทานโรคจากเชื้อ *Vibrio alginolyticus* ได้ดีกว่าชุดที่ไม่ได้รับโปรไบโอติก

นอกจากนั้น Burgents และคณะ (2004) พบว่ากุ้งขาวที่ใช้ยีสต์ทางการค้า (XP yeast) เลี้ยงเป็นเวลา 1 และ 2 สัปดาห์ จะมีความสามารถในการต้านทานโรคหลังการฉีดด้วย *Vibrio harveyi* ที่ระดับความเข้มข้น $2.0x10^8$ CFU ต่อมิลลิลิตร ได้ไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อเพิ่มระยะเวลาของการให้อาหารเป็น 3 สัปดาห์พบว่า กุ้งขาวที่ได้รับยีสต์จะมีอัตราการรอดชีวิต 74.20 เปอร์เซ็นต์ในขณะที่กุ้งขาวที่ไม่ได้รับยีสต์มีอัตราการรอดชีวิต 42.9 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนั้นทิพรัตน์ หงภัทรดีรี และกิจการ ศุภมาตย์ (2548) รายงานว่าเมื่อทดสอบการต้าน *Vibrio harveyi* ของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Pseudozyma antarctica*, *Saccharomyces cerevisiae* และ *Candida tropicalis* มีอัตราการรอดชีวิตที่สูงกว่าชุดควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อ โดยมีอัตราการรอดชีวิต 91.25, 87.50 และ 75.00 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ในขณะที่กุ้งกุลาดำในชุดควบคุมมีอัตราการรอดชีวิตเพียง 45 เปอร์เซ็นต์ และจากรายงานของ มณฑกานต์ ทองสม (2547) พบว่าการเลี้ยงกุ้งกุลาดำด้วยแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *Enterococcus faecalis* AM35, *Enterococcus faecalis* AM107, *Lactobacillus salivarius* AM111 และ *Lactobacillus farciminis* AM115 ให้อัตราการรอดชีวิตของกุ้งกุลาดำ 100 เปอร์เซ็นต์หลังการทดสอบการต้านทาน*Vibrio harveyi* ในขณะที่ชุดควบคุมที่ไม่ได้รับเชื้อแบคทีเรียแลกติกให้อัตราการรอดชีวิตเพียง 50.00 เปอณ์เซ็นต์ เท่านั้น

และนอกจากนั้นยังพบว่าที่ระดับความเข้มข้นของเชื้อ *Vibrio harveyi* ต่ำ ๆ จะทำให้อัตราการตายลดต่ำด้วย และเมื่อเพิ่มความเข้นข้นของ *Vibrio harveyi* ให้สูงขึ้นอัตราการตายก็จะเพิ่มสูงขึ้นด้วยซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของ Hjelm (2004) ที่พบว่าการเพิ่มความเข้นข้นของเชื้อก่อโรคจะเพิ่มอัตราการตายโดยพบว่าปลา turbot ที่แช่ในสารแขวนลอยของ *Vibrio anguillarum* ที่ระดับ 0, 10^3,10^5 และ 10^7 ในการทดสอบความสามารถในการต้านทานโรคของกุ้งขาว มีอัตราการตายที่ 26.00, 68.00, 78.00 และ 92.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และนอกจากนั้นยังพบว่าการเพิ่มความเข้นข้นของโปรไบโอติกก็จะสามารถลดอัตราการตายได้โดยพบว่าปลา turbot ที่แช่ในสารแขวนลอยของ *Roseobacter* spp. ที่ระดับความเข้นข้น 0, 10^3,10^5 และ 10^7 และทำการทดสอบการต้านทานเชื้อ

Vibrio anguillarum พบว่าชุดที่ไม่ได้แช่ในสารแขวนลอยของ *Roseobacter* spp. มีอัตราการตายที่สูงที่สุดที่ 26 เปอร์เซ็นต์ สวนชุดที่แช่ในสารแขวนลอยของ *Roseobacter* spp. ที่ระดับความเข้มข้น 10^3,10^5 และ 10^7 มีอัตราการตายที่ 14.00, 12.00 และ 2.00 เปอร์เซ็นต์

3.6 ความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียก่อโรคออกจากระบบไหลเวียน (Clearance ability of bacteria)

เมื่อฉีด *Vibrio harveyi* ความเข้มข้น 4.8-6.2x10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร (ประมาณ 5.74 log CFU ต่อมิลลิลิตร) เข้าสู่ระบบเลือดของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสม *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9 เพียงชนิดเดียว, โปรไบโอติกผสมทั้ง 3 ชนิด และกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่ไม่ผสมโปรไบโอติก เป็นเวลา 6 สัปดาห์ แล้วดึงตัวอย่างเลือดกุ้งมา 0.1 มิลลิลิตร หลังจากฉีดครบ 3 ชั่วโมงมาทำการนับปริมาณ *Vibrio harveyi* ที่เหลืออยู่ในเลือดกุ้ง พบว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีโปรไบโอติกผสมมีปริมาณ *Vibrio harveyi* เหลืออยู่ในเลือดน้อยที่สุด โดยมีปริมาณ *Vibrio harveyi* 4.26 log CFU ต่อมิลลิลิตร และรองลงมาคือ เลือดของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสม *Pseudozyma antarctica* TH9, *Candida tropicalis* TH112 และ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 ซึ่งมีปริมาณ *Vibrio harveyi* 4.32, 4.37 และ 4.85 log CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งขาวที่ไม่ได้รับโปรไบโอติกซึ่งมีปริมาณ *Vibrio harveyi* 5.76 log CFU ต่อมิลลิลิตร แล้วพบว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกจะมีความสามารถในการกำจัดแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ออกจากร่างกายได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงกว่า เมื่อนำปริมาณ *Vibrio harveyi* ในเลือดมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติพบว่า กุ้งขาวที่ได้รับโปรไบโอติกมีปริมาณ *Vibrio harveyi* ในเลือดต่ำกว่ากุ้งขาวที่ไม่ได้รับโปรไบโอติกอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 9 เมื่อนำปริมาณ *Vibrio harveyi* ในแต่ละชุดการทดลองมาคำนวณค่าประสิทธิภาพในการกำจัด *Vibrio harveyi* ออกจากกุ้งพบว่า กุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกทั้ง 3 ชนิด มีประสิทธิภาพในการกำจัด *Vibrio harveyi* ออกจากระบบไหลเวียนสูงสุดที่ 96.80 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมเชื้อเพียงชนิดเดียวของ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 มีประสิทธิภาพในการกำจัด *Vibrio harvey* ออกจากระบบไหลเวียนที่ 86.68, 95.80 และ 96.22 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 9 และเมื่อนำประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อ *Vibrio harveyi* ออกจากระบบไหลเวียนไปวิเคราะห์ค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ พบว่าประสิทธิภาพในการกำจัด *Vibrio harveyi* ออกจากระบบไหลเวียนของกุ้งที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกทั้ง 3 ชนิด, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 มีค่าสูงกว่า กุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสม *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) จากการทดลองพบว่าสอดคล้องกับงานทดลองที่ได้นำ

Pseudozyma antarctica TH9, *Candida tropicalis* TH112 และ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5055 มาเลี้ยงกุ้งกุลาดำ และพบว่ากุ้งที่ไม่ได้รับโปรไบโอติกมีประสิทธิภาพในการกำจัด *Vibrio harveyi* ออกจากเม็ดเลือดได้ต่ำกว่ากุ้งที่ได้รับโปรไบโอติก (ทิพรัตน์ หงภัทรดีรี และ กิจการ ศุภมาตย์, 2548) นอกจากนั้น Chiu และคณะ (2007) พบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารผสม *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 ในระดับ 10^7 และ 10^{10} CFU ต่อกิโลกรัมอาหาร เป็นเวลา 2 วันมีความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียก่อโรคออกจากกุ้งเพิ่มขึ้น 79.8 และ 77.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อเพิ่มระยะเวลาเป็น 7 วัน พบว่าความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียก่อโรคออกจากกุ้งคิดเป็น 82.40 และ 66.60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

จากการทดลองในครั้งนี้พบว่ากุ้งขาวที่รับอาการผสม *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9 และ โปรไบโอติกผสมทั้ง 3 ชนิดมีความสามารถในการกำจัดเชื้อก่อโรคออกจากกุ้งได้ดีกว่ากุ้งที่ไม่ได้รับโปรไบโอติก ดังนั้นจะเห็นได้ว่า *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9 จะมีผลต่อการส่งเสริมภาวะภูมิคุ้มกันของกุ้งได้ และเมื่อพิจารณาถึงปริมาณเม็ดเลือดของกุ้งในแต่ละชุดการทดลองก็พบความสอดคล้องระหว่างปริมาณเม็ดเลือดรวมกับความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียก่อโรคนั่นคือ ในกุ้งขาวที่ได้รับโปรไบโอติกจะมีปริมาณเม็ดเลือดรวมมากกว่ากุ้งขาวที่ไม่ได้รับโปรไบโอติก และจะส่งผลให้กุ้งขาวที่ได้รับโปรไบโอติกมีความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียก่อโรคออกได้ดีกว่ากุ้งขาวที่ไม่ได้รับโปรไบโอติก และส่งผลให้กุ้งมีอัตราการรอดชีวิตที่สูงขึ้นด้วย

ตารางที่ 9 ปริมาณ *Vibrio harveyi* และประสิทธิภาพในการกำจัด *Vibrio harveyi* ออกจากระบบไหลเวียนของกุ้งขาวหลังจากฉีดด้วยสารละลายเชื้อ *Vibrio harveyi* ที่มีความเข้มข้น 4.8-6.2x10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสม *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9, ชุดโปรไบโอติก ผสมทั้ง 3 ชนิด เปรียบเทียบกับกุ้งขาวชุดควบคุมที่ได้รับอาหารที่ไม่มีการเติมโปรไบโอติกที่ระยะเวลาการเลี้ยงที่ 6 สัปดาห์ ตัวเลขที่กำกับด้วยอักษรต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *($p<0.05$)*

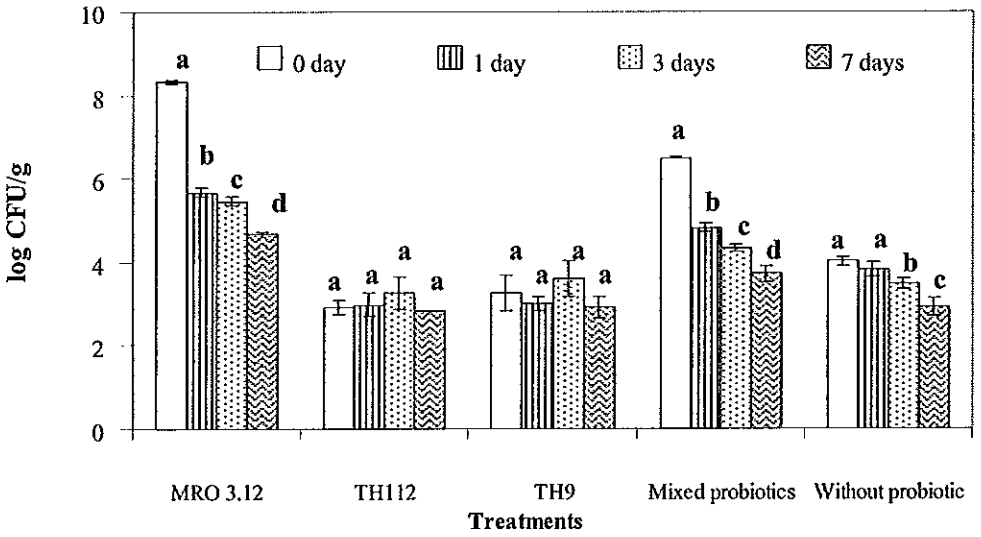
Table 9 Viable count of *Vibrio harveyi* and clearance efficiency of white shrimp in haemocyte of shrimp after injected with cell suspension at the concentration 4.8-6.2x10^5 CFU/ml for 3 hours of white shrimps fed on diets containing *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9, mixed probiotics compared to control treatment (without porbiotic) at 6 week feeding trial. Data (mean±SD.) with different letters are significantly different *($p<0.05$)* among treatments.

Treatment	Viable count of *Vibrio harveyi* (logCFU/ml)	Clearance efficiency (%)
***Lactobacillus plantarum* MRO3.12**	4.85 ± 0.11^{b}	86.68 ± 6.26^{b}
***Candida tropicalis* TH112**	4.37 ± 0.04^{a}	95.80 ± 1.24^{a}
***Pseudozyma antarctica* TH9**	4.32 ± 0.21^{a}	96.22 ± 1.18^{a}
Mixed probiotics	4.26 ± 0.03^{a}	96.80 ± 0.59^{a}
Without probiotic	5.76 ± 0.11^{c}	-

3.7 ศึกษาการคงอยู่ของ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 ภายในระบบทางเดินอาหาร

หลังจากการเลี้ยงกุ้งขาวครบ 6 สัปดาห์ ด้วยอาหารที่ผสมโปรไบโอติกของ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 เพียงชนิดเดียว และได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกทั้ง 3 ชนิด แล้วเปลี่ยนอาหารเป็นอาหารเม็ดธรรมดาติดต่อกันเป็นเวลา 7 วัน และตรวจสอบปริมาณแบคทีเรียแลกติก และยีสต์ที่มีอยู่ในระบบทางเดินอาหารของ

กุ้งขาวในวันที่ 0, 1, 3 และ 7 ของการทดลอง เพื่อทดสอบความสามารถในการคงอยู่ของแบคทีเรียแลกติก และยีสต์ พบว่าในวันเริ่มต้นของการทดลอง (วันที่ 0) กุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสม *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 เพียงชนิดเดียว และโปรไบโอติกทั้ง 3 ชนิด มีปริมาณแบคทีเรียแลกติก 8.43 และ 6.49 log CFU ต่อกรัมของทางเดินอาหาร ตามลำดับ และ ปริมาณแบคทีเรียแลกติกลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อหยุดให้อาหารผสมโปรไบโอติกที่เวลา 1, 3 และ 7 วัน โดยมีจำนวนแบคทีเรียแลกติกในทางเดินอาหารของกุ้งที่ได้รับอาหารผสม *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 เพียงชนิดเดียวที่ 5.68, 5.47 และ 5.42 log CFU ต่อกรัมของทางเดินอาหาร ตามลำดับ ส่วนกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกทั้ง 3 ชนิด มีจำนวนแบคทีเรียแลกติก 4.82, 4.34 และ 3.72log CFU ต่อกรัมของทางเดินอาหาร ตามลำดับ ส่วนกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสม *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9 เพียงชนิดเดียว พบว่าวันแรกที่หยุดให้โปรไบโอติกทางเดินอาหารของกุ้งขาวมีปริมาณแบคทีเรียแลกติก 2.92 และ 3.36 log CFU ต่อกรัมของทางเดินอาหาร ตามลำดับ และจำนวนแบคทีเรียแลกติกในทางเดินอาหารของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสม *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9 เพียงชนิดเดียวเปลี่ยนแปลงไม่มากนัก โดยไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อหยุดให้โปรไบโอติก 1, 3 และ 7 วัน โดยมีจำนวนแบคทีเรียแลกติกในทางเดินอาหารของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสม *Candida tropicalis* TH112 เพียงชนิดเดียวที่ 2.98, 3.26 และ 2.82 log CFU ต่อกรัมของทางเดินอาหาร ตามลำดับ และ กุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสม *Pseudozyma antarctica* TH9 เพียงชนิดเดียว พบแบคทีเรียแลกติกในทางเดินอาหารของกุ้ง 3.02, 3.59 และ 2.92 log CFU ต่อกรัมของทางเดินอาหาร ตามลำดับ ในขณะที่กุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่ไม่ผสมโปรไบโอติกมีปริมาณแบคทีเรียแลกติกอยู่ที่ 4.03 log CFU ต่อกรัมของทางเดินอาหาร ในวันเริ่มต้นทดลอง (วันที่ 0) หลังจากนั้นปริมาณแบคทีเรียแลกติกจะลดลงอย่างไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในวันที่ 1 และ จะลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อตรวจในวันที่ 3 และ 7 โดยพบจำนวนแบคทีเรียแลกติก 3.81, 3.48 และ 2.92 log CFU ต่อกรัมของทางเดินอาหาร ตามลำดับ (ภาพที่ 19 และตารางภาคผนวก ค ที่ 23)

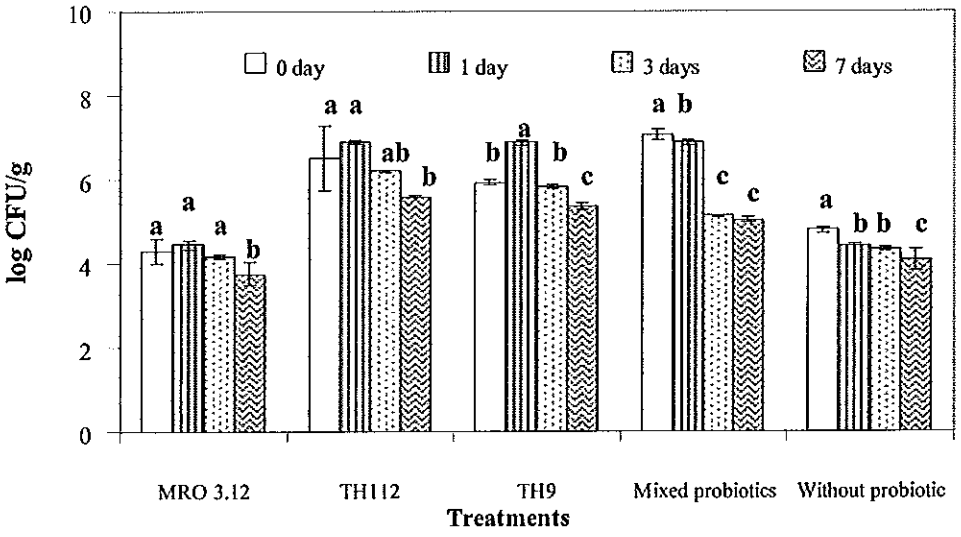


ภาพที่ 19 การคงอยู่ของแบคทีเรียแลกติกในระบบทางเดินอาหารของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสม *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9, โปรไบโอติกผสมทั้ง 3 ชนิด เป็นเวลา 6 สัปดาห์แล้วหยุดให้ และเปลี่ยนเป็นอาหารเม็ดธรรมดาที่ไม่ผสมโปรไบโอติกเป็น เวลา 0, 1, 3 และ 7 วัน กราฟแท่งที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *($p<0.05$)*

Figure 19 Number of lactic acid bacteria count of white shrimp fed on diets contained *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9, mixed probiotics and control treatment (without probiotic) for 6 weeks and followed with regular feed (without probiotic) for 0, 1, 3 and 7 day. Bars (mean±SD.) with different letters are significantly different *($p<0.05$)* among treatments.

สำหรับปริมาณยีสต์นั้นพบว่า ในวันเริ่มต้นของการทดลอง (วันที่ 0) กุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสม *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 เพียงชนิดเดียวมีจำนวนยีสต์ 4.79 log CFU ต่อกรัมของทางเดินอาหาร และในวันที่ 1 และ 3 ปริมาณยีสต์เปลี่ยนแปลงเล็กน้อยอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติกับวันแรกที่หยุดให้โปรไบโอติกที่ 4.45 และ 4.18 log CFU ต่อกรัมของทางเดินอาหาร ตามลำดับ และในวันที่ 7 ของการหยุดให้โปรไบโอติก พบว่าปริมาณยีสต์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยมีปริมาณยีสต์ 3.75 log CFU ต่อกรัมของทางเดินอาหาร ส่วนกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสม *Candida tropicalis* TH112 เพียงชนิดเดียว มีปริมาณยีสต์ในวันเริ่มต้นของการทดลอง (วันที่ 0) 6.5 log CFU ต่อกรัมของทางเดินอาหาร และในวันที่ 1 และ 3 ปริมาณยีสต์เปลี่ยนแปลงเล็กน้อยอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติกับวันแรกที่หยุดให้โปรไบโอติกที่ 6.90 และ 6.20

log CFU ต่อกรัมของทางเดินอาหาร ตามลำดับ ในวันที่ 7 ของการหยุดให้โปรไบโอติก พบว่าปริมาณยีสต์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยมีปริมาณยีสต์ที่ 5.58 log CFU ต่อกรัมของทางเดินอาหาร สำหรับเชื้อ *Pseudozyma antarctica* TH9 เพียงชนิดเดียว มีปริมาณยีสต์ 5.93 log CFU ต่อกรัมของทางเดินอาหาร ในวันที่เริ่มหยุดให้โปรไบโอติก และ ในวันที่ 1 ของการหยุดให้โปรไบโอติก พบว่าปริมาณยีสต์ในทางเดินอาหารของกุ้งเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เป็น 6.88 log CFU ต่อกรัมของทางเดินอาหาร หลังจากนั้นเมื่อหยุดให้โปรไบโอติก 3 และ 7 วัน พบว่าปริมาณยีสต์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากวันที่ 1 ที่หยุดให้โปรไบโอติก โดยพบจำนวนยีสต์ 5.82 และ 5.36 log CFU ต่อกรัมของทางเดินอาหาร ตามลำดับ ในขณะที่กุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกทั้ง 3 ชนิดมีปริมาณยีสต์ 7.07 log CFU ต่อกรัมของทางเดินอาหาร ในวันที่เริ่มหยุดให้โปรไบโอติก และปริมาณยีสต์ในวันที่ 1, 3 และ 7 จะลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ จากวันที่เริ่มหยุดให้โปรไบโอติก โดยพบปริมาณยีสต์ 6.88, 5.13 และ 5.04 log CFU ต่อกรัมของทางเดินอาหาร ตามลำดับ ส่วนกุ้งขาวที่ไม่ได้รับโปรไบโอติกพบว่า ในวันเริ่มต้นที่หยุดให้โปรไบโอติกมีปริมาณยีสต์ 4.28 log CFU ต่อกรัมของทางเดินอาหาร และปริมาณยีสต์ในวันที่ 1, 3 และ 7 จะลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ จากวันที่เริ่มหยุดให้โปรไบโอติก โดยพบปริมาณยีสต์ 4.43, 4.35 และ 4.08 log CFU ต่อกรัมของทางเดินอาหาร ตามลำดับ (ภาพที่ 20 และตารางภาคผนวก ค ที่ 23)



ภาพที่ 20 การคงอยู่ของยีสต์ในระบบทางเดินอาหารของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสม *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9, โปรไบโอติกทั้ง 3 ชนิด เป็นเวลา 6 สัปดาห์ แล้วหยุดให้ และเปลี่ยนเป็นอาหารเม็ดธรรมดาที่ไม่ผสมโปรไบโอติกเป็นเวลา 0, 1, 3 และ 7 วัน กราฟแท่งที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *($p<0.05$)*

Figure 20 Number of lactic acid bacteria count of white shrimp fed on diets contained *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9, mixed probiotics and control treatment (without probiotic) for 6 weeks and followed with regular feed (without probiotic) for 0, 1, 3 and 7 day. Bars (mean±SD.) with different letters are significantly different *($p<0.05$)* among treatments.

โดยทั่วไปในระบบทางเดินอาหารของตัวอ่อนของสัตว์จะมีจุลินทรีย์ที่ประจำถิ่นอยู่ตั้งแต่เกิด แต่เมื่อเจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัย จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์เหล่านั้นจะค่อย ๆ ลดจำนวนลง (Fuller, 1992) ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ให้กับสัตว์เจ้าบ้าน โดยจุลินทรีย์ที่เพิ่มลงไปจะต้องสามารถเกาะติดที่ผนังลำไส้เพื่อแสดงออกถึงประโยชน์ของโปรไบโอติกได้ ซึ่งการที่จะสามารถเกาะติดได้นั้นจุลินทรีย์โปรไบโอติกจะต้องมีอัตราการเจริญและแบ่งตัวได้รวดเร็วกว่าอัตราการถูกขับออกนอกร่างกาย (Conway, 1996) โดยขั้นตอนของการเกาะติดนั้นส่วนใหญ่แล้วจะอาศัยคุณสมบัติในการเกาะติดกับเซลล์บุผิวลำไส้ หรือเยื่อเมือกต่าง ๆ ซึ่งการเกาะติดนี้จะช่วยป้องกันไม่ให้จุลินทรีย์ก่อโรคมาเกาะติดที่ผนังลำไส้ (Balcazar, 2006) เช่นการเติม *Bacillus* sp. ลง

ไปในในน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งขาวเป็นเวลา 20 วันจะช่วยให้ *Bacillus* sp. เข้าไปแทนที่เชื้อ *Vibrio* sp. ในบริเวณตับอ่อนได้ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ (Gullian *et al*, 2004) จากการทดลองพบว่าโดยส่วนใหญ่แล้วปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลกติก และเชื้อยีสต์ที่เติมลงไปจะค่อย ๆ ลดลงภายในวันที่ 7 ของการทดลอง ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของ Nikoskelainen และคณะ(2001) ที่พบว่าการเลี้ยงปลาเรนโบว์เทร้าท์ด้วยอาหารผสม *Lactobacillus rhamnosus* จะทำให้ตรวจพบแบคทีเรียเพิ่มขึ้นที่ 5.56-10.95 log CFU ต่อมิลลิลิตร และหลังจากเปลี่ยนอาหารเป็นอาหารปกติพบว่าปริมาณแบคทีเรียแลกติกลดลงอย่างมากและมีค่า 3.59 log CFU ต่อมิลลิลิตร นอกจากนั้น Jaborn และคณะ (1997) รายงานว่าการเลี้ยงปลาด้วยแบคทีเรียแลกติกสามารถเปลี่ยนแปลงจำนวนของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของปลาได้แต่หลังจากการหยุดให้อาหารที่ผสมโปรไบโอติกแล้วพบว่าปริมาณแบคทีเรียแลกติกก็ลดลงอย่างรวดเร็วเช่นเดียวกัน ส่วนงานทดลองของบุญกอบ วิริยพงศ์สุธี (2549) ที่ตรวจติดตาม *Lactobacillus plantarum* ในระบบทางเดินอาหารของกุ้งขาวโดยใช้เทคนิค Fluorescence *In situ* Hybridization (FISH) ที่ชั่วโมงที่ 0, 1, 2, 3, 6, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง หลังการให้อาหารผสมเชื้อ *Lactobacillus plantarum* ที่ความเข้มข้น 10^3, 10^6 และ 10^9 CFU ต่อกรัมอาหาร โดยปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้รับ *Lactobacillus plantarum* และพบว่าไม่สามารถตรวจพบ *Lactobacillus plantarum* ในกุ้งขาวที่ไม่ได้รับ *Lactobacillus plantarum* ในทุกชั่วโมงของการทดลอง ในขณะที่กุ้งขาวที่ได้รับ *Lactobacillus plantarum* ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ จะสามารถตรวจติดตามได้ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 เป็นต้นไป โดยชั่วโมงที่ 72 พบ *Lactobacillus plantarum* ปริมาณ 7.12, 7.12 และ 7.28 log cellsต่อกรัมของทางเดินอาหาร ในชุดกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมเชื้อ *Lactobacillus plantarum* ที่ความเข้มข้น 10^3, 10^6 และ 10^9 CFU ต่อกรัมอาหาร ตามลำดับ

จากการที่ปริมาณโปรไบโอติกที่เติมลงไปในอาหารและเข้าไปสู่ระบบทางเดินอาหารของกุ้งมีปริมาณที่ลดลงอาจมีสาเหตุมาจากตัวสัตว์เจ้าบ้านเองเช่นอุณหภูมิของร่างกาย หรือ การผลิตเอนไซม์บางชนิด ตัวอย่างเช่น โปรไบโอติกทั้งทางอาหารและทางน้ำที่จะผ่านทางปาก และลงไปที่ระบบทางเดินอาหารบางส่วนอาจจะเกาะติดอยู่ที่ผนังลำไส้ แต่บางส่วนอาจจะถูกทำลายโดนระบบย่อยอาหารของสัตว์เจ้าบ้าน และบางครั้งการเจริญของโปรไบโอติกอาจถูกยับยั้งโดยสารต้านจุลินทรีย์ที่สัตว์เจ้าบ้านผลิตขึ้น นอกจากนั้นปัจจัยที่เกี่ยวกับโปรไบโอติกเองก็เป็นสาเหตุให้โปรไบโอติกที่เสริมลงไปลดจำนวนลง เช่น โปรไบโอติกบางสายพันธุ์สามารถผลิตสารยับยั้งต่าง ๆ เช่น แบคเทอริโอซิน ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ กรดอินทรีย์ ไลโซไซม์ ไดอะซิทิว (Diacetyl) ซึ่งสารเหล่านี้อาจจะไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่น ๆ ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์เจ้าบ้านได้ (Balcazar, 2006)

4. ศึกษาการผลิตผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกผงโดยการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

4.1 ผลของสารตัวกลางต่อการรอดชีวิตของ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 จากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze drying)

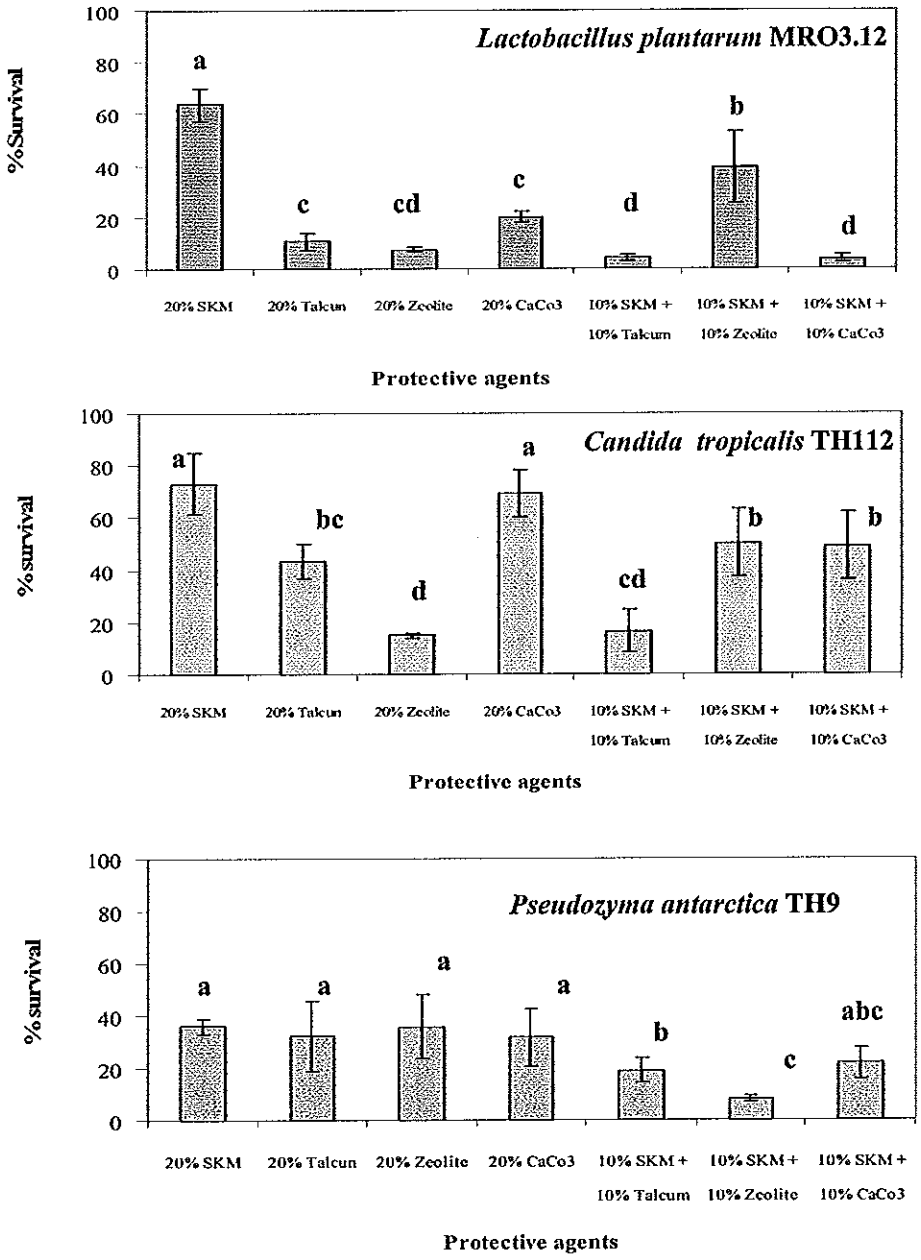
สารที่ใช้เป็นตัวกลางในการป้องกันเซลล์ (cryoprotectants) มีบทบาทสำคัญในการป้องกันรักษาเซลล์ระหว่างการแช่เยือกแข็ง นอกจากนั้นยังมีส่วนช่วยให้เซลล์สามารถถูกทำแห้งได้ง่ายมีความคงตัวสูง อีกทั้งสามารถละลายกลับได้ง่าย สารที่มีคุณสมบัติดังกล่าวมีอยู่หลายกลุ่มได้แก่ พอลิแซคคาไรด์ ไดแซคคาไรด์ กรดอะมิโน โปรตีน และแร่ธาตุหลาย ๆ ชนิด (Champagne *et al.* 1991; Huba´lek, 2003) จากการทดลองการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 โดยใช้สารตัวกลางต่าง ๆ เช่น ทัลคัม ซีโอไลท์ และแคลเซียมคาร์บอเนต ซึ่งเป็นสารที่ใช้ในการปรับปรุงคุณภาพน้ำในการเพาะเลี้ยงกุ้งอยู่แล้วมาทดสอบเปรียบเทียบกับการใช้นมผงพร่องมันเนย เนื่องจากนมผงพร่องมันเนยสามารถใช้เป็นสารป้องกันเซลล์ได้ในเชื้อจุลินทรีย์หลาย ๆ ชนิด (Morgan *et al*, 2006) พบว่า *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 ที่ใช้นมผงพร่องมันเนย 20 เปอร์เซ็นต์เป็นสารตัวกลาง มีการรอดชีวิตสูงที่สุดที่ 63.81 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ กับการรอดชีวิตของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 ที่ใช้ทัลคัม ซีโอไลท์ และแคลเซียมคาร์บอเนต 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารตัวกลาง ที่มีผลทำให้ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 มีการรอดชีวิตเพียง 10.64, 7.42 และ 20.13 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ทำนองเดียวกันกับการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งของ *Candida tropicalis* TH112 ที่การใช้ นมผงพร่องมันเนย 20 เปอร์เซ็นต์เป็นสารตัวกลางให้อัตราการรอดชีวิตสูงที่สุดที่ 73.13 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่แคลเซียมคาร์บอเนต 20 เปอร์เซ็นต์เป็นสารตัวกลาง ซึ่งมีการรอดชีวิต 69.29 เปอร์เซ็นต์ แต่จะแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้ทัลคัม และ ซีโอไลท์ 20 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งทำให้ *Candida tropicalis* TH112 มีการรอดชีวิตเพียง 43.32 และ 14.98 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เช่นเดียวกันกับการทำแห้ง *Pseudozyma antarctica* TH9 ด้วยวิธีเดียวกันที่พบว่าการใช้ นมผงพร่องมันเนย 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารตัวกลางให้อัตราการรอดชีวิตสูงที่สุดที่ 36.04 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้ ทัลคัม ซีโอไลท์ และ แคลเซียมคาร์บอเนต 20 เปอร์เซ็นต์เป็นสารตัวกลาง โดยให้อัตราการรอดชีวิตที่ 32.3, 35.93 และ 31.61 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 21 และตารางภาคผนวก ค ที่ 24)

เนื่องจากนมผงพร่องมันเนยมีราคาค่อนข้างสูงจึงได้ทดลองนำนมผงพร่องมันเนยมาผสมกับสารตัวกลางอื่น ๆ เช่น ทัลคัม ซีโอไลท์ และแคลเซียมคาร์บอเนต ในอัตราส่วนนมผงพร่องมันเนย

10 เปอร์เซ็นต์ กับ ทัลคัม ซีโอไลท์ และแคลเซียมคาร์บอเนต 10 เปอร์เซ็นต์ เพื่อศึกษาอัตราการรอดชีวิตของเชื้อทั้ง 3 ชนิด และจากการทดลองพบว่า และพบว่าการใช้ นมผงพร่องมันเนย 20 เปอร์เซ็นต์ยังคงมีการรอดชีวิตของเชื้อทั้ง 3 ชนิดสูงที่สุด และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์กับ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 ที่ใช้นมผงพร่องมันเนย 10 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับ ทัลคัม หรือ ซีโอไลท์ หรือ แคลเซียมคาร์บอเนต 10 เปอร์เซ็นต์เป็นสารตัวกลาง ซึ่งมีอัตราการรอดชีวิต 4.36, 39.11 และ 3.88 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ในทำนองเดียวกันกับ *Candida tropicalis* TH112 ที่พบว่าการใช้ นมผงพร่องมันเนย 20 เปอร์เซ็นต์ยังคงมีการรอดชีวิตของเชื้อที่สูงกว่าชุดการทดลองที่มีการใช้นมผงพร่องมันเนย 10 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับ ทัลคัม หรือ ซีโอไลท์ หรือ แคลเซียมคาร์บอเนต 10 เปอร์เซ็นต์เป็นสารตัวกลาง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีการรอดชีวิต 16.55, 50.30 และ 49.08 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ในขณะที่ *Pseudozyma antarctica* TH9 ที่มีการใช้นมผงพร่องมันเนย 10 เปอร์เซ็นต์ กับแคลเซียมคาร์บอเนต 10 เปอร์เซ็นต์ มีการรอดชีวิตที่ 21.61 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ กับการใช้นมผงพร่องมันเนย 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารตัวกลาง ในขณะที่การใช้ ทัลคัม และ ซีโอไลท์ 10 เปอร์เซ็นต์ กับ นมผงพร่องมันเนย 10 เปอร์เซ็นต์ ให้การรอดชีวิตของเชื้อที่น้อยกว่า การใช้นมผงพร่องมันเนย 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารตัวกลางอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยมีการรอดชีวิตเพียง 18.89 และ 7.86 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 21 และตารางภาคผนวก ค ที่ 24)

จากการทดลองพบว่าการรอดชีวิตของเชื้อขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อเช่นกัน โดยพบว่าในการทำแห้งที่ใช้สภาวะเดียวกัน เช่น ใช้นมผงพร่องมันเนย 20 เปอร์เซ็นต์เป็นสารตัวกลาง และใช้อุณหภูมิและเวลาในการทำแห้งเท่ากัน *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 จะมีความสามารถในการรอดชีวิตจากการทำแห้งที่สภาวะเดียวกันได้แตกต่างกัน โดยมีการรอดชีวิตที่ 63.81, 73.13 และ 36.04 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Wang และคณะ (2004) ที่ได้ทำแห้งเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* และ *Streptococcus thermophilus* และพบว่ามีอัตราการรอดชีวิตที่ 46.20-49.80 และ 74.70-75.10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนการทดลองของ To และ Etzel (1997) ที่ทำแห้งเชื้อ *Lactococcus cremoris* และ *Lactobacillus pseudoplantarum* ที่ทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งและใช้นมผงพร่องมันเนยเป็นสารตัวกลาง และพบว่า *Lactococcus cremoris* และ *Lactobacillus pseudoplantarum* มีอัตราการรอดชีวิตที่ 63.00 และ 71.00 เปอร์เซ็นต์ การที่เชื้อแต่ละชนิดมีอัตราการรอดชีวิตที่แตกต่างกัน เนื่องมาจากลักษณะของเซลล์ เช่น รูปร่าง และ ขนาด เช่น จากการทดลองของ Bozoglu และคณะ (1987) อ้างโดย Santivarangkna และคณะ (2007) ที่รายงานว่าเซลล์ที่มีรูปร่างกลม จะมีอัตราการรอดชีวิตหลังการทำแห้งสูงกว่าเซลล์ที่มีรูปร่างเป็นแท่งยาว เนื่องจากมีพื้นที่ผิวน้อยกว่า และนอกจากนั้น Champomier-Verges และ คณะ

(2002) พบว่า ความสามารถในการรอดชีวิตของ *Bifidobacterium* sp. สายพันธุ์ต่าง ๆ ขึ้นอยู่กับความสามารถในการทนต่อความร้อน และ ออกซิเจน นอกจากชนิดของเชื้อจะมีผลต่อการทำแห้งแล้วยังพบว่าสารตัวกลางที่ใช้ในการทำแห้งก็มีผลต่ออัตราการรอดชีวิตเช่นกัน โดยจากการทดลองพบว่าการใช้ นมผงพร่องมันเนย 20 เปอร์เซ็นต์จะให้อัตราการรอดชีวิตของเชื้อทั้ง 3 ชนิดที่สูงที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Otero และ คณะ (2007) ที่พบว่าการใช้นมผงพร่องมันเนย 6 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ ซูโครส 6 เปอร์เซ็นต์เป็นสารตัวกลาง ทำให้เชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* มีปริมาณลดลงหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง 2 log CFU ต่อมิลลิลิตร และน้อยกว่าการใช้น้ำเป็นสารตัวกลางอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีปริมาณเชื้อลดลง 9 log CFU ต่อมิลลิลิตร แต่ไม่จำเป็นว่านมผงพร่องมันเนยจะเหมาะสมสำหรับเชื้อทุกชนิด เช่นจากการทดลองของ Costa (2000) ที่ทำแห้งเชื้อ *Pantoea agglomerans* CPA-2 ด้วยวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง และใช้สารตัวกลางต่าง ๆ ในการทำแห้ง พบว่า น้ำตาลพวกไดแซคคาร์ไรด์ให้อัตราการรอดชีวิตของเชื้อ *Pantoea agglomerans* CPA-2 สูงที่สุดมากกว่า 60.00 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การใช้นมผงพร่องมันเนยให้อัตราการรอดชีวิตที่ 15.00 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น การที่นมผงพร่องมันเนยช่วยให้เชื้อมีการรอดชีวิตที่สูงกว่าสารตัวกลางชนิดอื่น ๆ เนื่องจาก นมผงพร่องมันเนยเป็นโปรตีนที่สามารถไปเคลือบปกป้องบริเวณผนังเซลล์ได้ และนอกจากนั้นมีคุณสมบัติที่ช่วยป้องกันผนังเซลล์ไม่ให้เกิดการเสียหายในระหว่างการทำแห้ง โดยจะช่วยให้การเกิดผลึกน้ำแข็งขนาดเล็ก (Carvalho *et al*, 2004)



ภาพที่ 21 ผลของการใช้สารตัวกลางต่อการรอดชีวิตของ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 จากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง กราฟแท่งที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *($p<0.05$)*

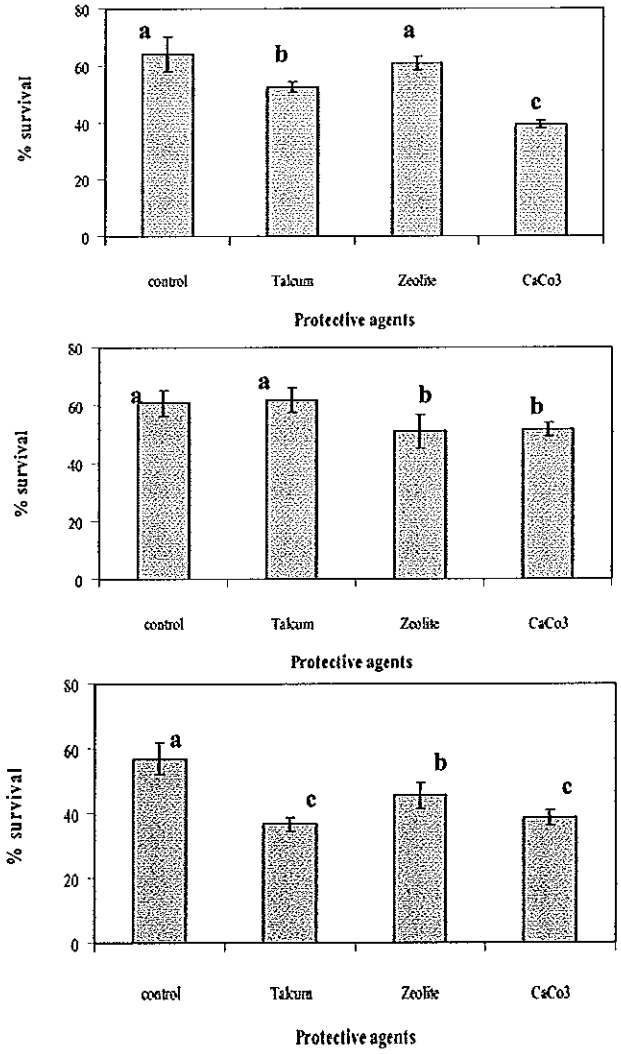
Figure 21 Effects of protective agents on survival of *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 and *Pseudozyma antarctica* TH9 after freeze-drying. Bars (mean±SD.) with different letters are significantly differ *($p<0.05$)* among treatments.

4.2 ศึกษาความสามารถของสารตัวกลางในการทำหน้าที่เป็นสารพยุงเซลล์เมื่อผสมสารตัวกลางลงไปในระหว่างการเลี้ยง *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 ก่อนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

ถึงแม้สารตัวกลางที่ใช้ในการทดลอง เช่น ทัลคัม ซีโอไลท์ และแคลเซียมคาร์บอเนต จะให้อัตราการรอดชีวิตของเชื้อทั้ง 3 ชนิดที่ต่ำกว่าการใช้นมผงพร่องมันเนย แต่เนื่องจากสารทั้ง 3 ชนิดนี้มีโครงสร้างที่เป็นรูพรุน ซึ่งอาจจะสามารถใช้เป็นสารพยุงเซลล์ในระหว่างการเลี้ยงเซลล์ได้ และอาจจะช่วยให้อัตราการรอดชีวิตของเชื้อเพิ่มขึ้น นอกจากนั้นสารทั้ง 3 ชนิด ยังสามารถใช้ในการปรับปรุงคุณภาพน้ำในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้ โดยการช่วยปรับค่าพีเอชของน้ำทะเล และ ช่วยในการตกตะกอนสารแขวนลอยที่อยู่ในบ่อเพาะเลี้ยง (ดีพร้อม ไชยวงศ์เกียรติ, 2548) ดังนั้นจึงได้ทดลองใช้สารทั้ง 3 ชนิด คือ ทัลคัม ซีโอไลท์ และแคลเซียมคาร์บอเนต ในการเป็นสารพยุงเซลล์ในระหว่างการเลี้ยงเซลล์ และจากการทดลองพบว่าการเลี้ยง *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 ในอาหาร MRS broth ที่ไม่มีการเติมสารพยุงมีการรอดชีวิตหลังการทำแห้งสูงสุดที่ 64.06 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์กับการเลี้ยง *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 ในอาหาร MRS broth ที่มีการเติม ซีโอไลท์ ทัลคัม และ แคลเซียมคาร์บอเนท 2 เปอร์เซ็นต์ ที่มีการรอดชีวิต 60.95, 52.42 และ 39.41 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนการรอดชีวิตของ *Candida tropicalis* TH112 หลังการทำแห้ง พบว่า *Candida tropicalis* TH112 ที่เลี้ยงในอาหาร YM broth ที่มีการเติมทัลคัม 2 เปอร์เซ็นต์ มีการรอดชีวิตหลังการทำแห้งสูงสุดที่ 61.48 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ กับการรอดชีวิตที่ 60.75 เปอร์เซ็นต์ ของ *Candida tropicalis* TH112 ที่ไม่มีการเติมสารพยุงในระหว่างการเพาะเลี้ยง แต่จะแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ กับการรอดชีวิตที่ 50.94 และ 51.75 เปอร์เซ็นต์ ที่มีการเติม ซีโอไลท์ และ แคลเซียมคาร์บอเนต 2 เปอร์เซ็นต์ ในระหว่างการเพาะเลี้ยง ตามลำดับ ในขณะที่การรอดชีวิตของ *Pseudozyma antarctica* TH9 ที่เลี้ยงในอาหาร YM broth ที่ไม่มีการเติมสารพยุงมีการรอดชีวิตหลังการทำแห้งสูงสุดที่ 56.96 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งพบว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ กับการรอดชีวิตที่ 45.52, 38.59 และ 36.59 เปอร์เซ็นต์ ของ *Pseudozyma antarctica* TH9 ที่เลี้ยงในอาหาร YM broth ที่มีการเติม ซีโอไลท์ ทัลคัม และ แคลเซียมคาร์บอเนต 2 เปอร์เซ็นต์ในการเลี้ยงเซลล์ (ภาพที่ 22 และตาราง ภาคผนวก ค ที่ 25)

เนื่องจากสารพยุงที่เลือกใช้มีสามารถในการดูดความชื้นได้ดี (ดีพร้อม ไชยวงศ์เกียรติ, 2548) ดังนั้นอาจจะช่วยส่งเสริมความสามารถในการรอดชีวิตระหว่างการเก็บรักษาได้ จึงเลือกตัวพยุงที่เหมาะสมสำหรับเชื้อแต่ละตัวสำหรับการศึกษาในข้อต่อไป โดยสำหรับ *Lactobacillus*

plantarum MRO3.12 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 ได้เลือกซีโอไลท์ เป็นสารพยุงในระหว่างการเลี้ยงเซลล์ ส่วน *Candida tropicalis* TH112 ได้เลือกทัลคัม เป็นสารพยุงในระหว่างการเลี้ยงเซลล์



Lactobacillus plantarum **MRO3.12**

Candida tropicalis **TH112**

Pseudozyma antarctica **TH9**

ภาพที่ 22 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งโดยใช้นมผงพร่องมันเนย 20 เปอร์เซ็นต์เป็นสารตัวกลางในการป้องกันเซลล์ของ *Lactobacillus plantar* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 ที่เจริญในอาหารที่มีสารพยุงชนิดต่าง ๆ กราฟแท่งที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *($p<0.05$)*

Figure 22 Effects of different protective agents which mixed 2% (w/v) into media broth on survival of *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 and *Pseudozyma antarctica* TH9 after freeze-drying. Bars (mean±SD.) with different letters are significantly different *($p<0.05$)* among treatments.

5. ผลของวิธีปิดผนึกบรรจุภัณฑ์ที่มีต่อการรอดชีวิตของผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกผงในขณะที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่าง ๆ

จากการทดลองในข้อ 4.1 พบว่า การใช้ นมผงพร่องมันเนย 20 เปอร์เซ็นต์ให้อัตราการรอดชีวิตของ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 ได้สูงที่สุด ดังนั้นจึงเลือกนมผงพร่องมันเนย 20 เปอร์เซ็นต์เป็นสารในการป้องกันเซลล์ หลังจากนั้นได้ศึกษาการใช้ทัลคัม ซีโอไลท์ และแคลเซียมคาร์บอเนตเป็นสารพยุงเซลล์ในระหว่างการเพาะเลี้ยง และพบว่า ซีโอไลท์ให้อัตราการรอดชีวิตของ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 ที่สูงกว่าสารพยุงอื่นๆ ส่วน ทัลคัม ให้อัตราการรอดชีวิตของ *Candida tropicalis* TH112 สูงกว่าสารพยุงอื่นๆ ดังนั้นจึงเลือกซีโอไลท์เป็นสารพยุงในการเพาะเลี้ยง *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 และ ทัลคัมเป็นสารพยุงในการเพาะเลี้ยง *Candida tropicalis* TH112

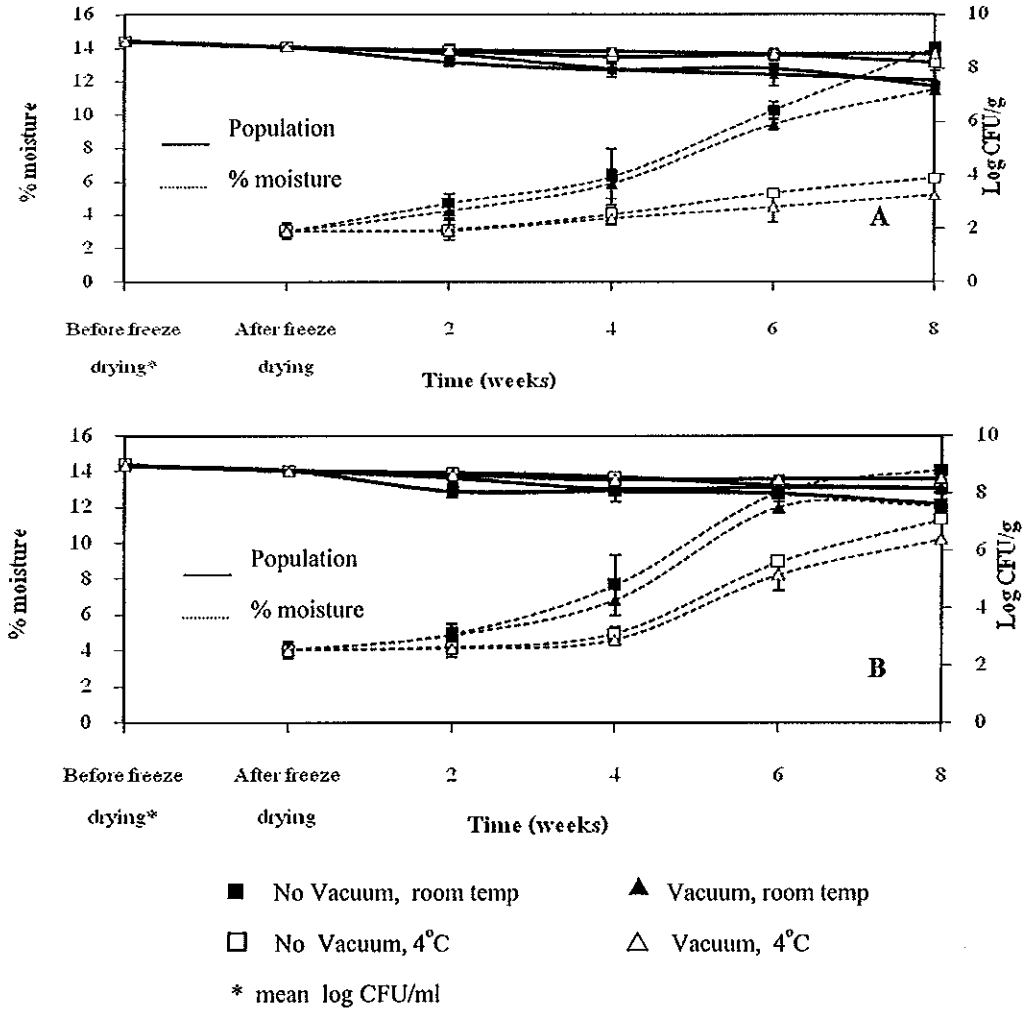
เมื่อนำโปรไบโอติกผงทั้ง 3 ชนิดมาเก็บไว้ในถุงอะลูมิเนียมฟอยล์ ซึ่งเป็นถุงเคลือบ 3 ชั้น ประกอบด้วย ไนลอน พอลิเอทิลีน และ ฟอยล์ หลังจากนั้นบรรจุภายใต้สภาวะสุญญากาศ และสภาวะบรรยากาศปกติ แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่า สภาวะการบรรจุทั้งสองแบบไม่มีผลต่อการรอดชีวิต ในขณะที่อุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษามีอิทธิพลอย่างมากต่อการรอดชีวิตของเชื้อทั้ง 3 ชนิด โดย *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 ที่มีการเติมสารพยุงในระหว่างการเลี้ยงเซลล์จะมีจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตในระหว่างการเก็บรักษาในสภาวะการบรรจุทั้งแบบสุญญากาศ และ แบบสภาวะบรรยากาศปกติไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ คือ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 ที่บรรจุในสภาวะสุญญากาศ และบรรยากาศปกติมีจำนวนเชื้อลดลงเหลือ 7.57 และ 7.33 log CFU ต่อกรัม หรือมีปริมาณลดลง 1.23 และ 1.47 log CFU ต่อกรัม ตามลำดับ เมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้อง 8 สัปดาห์จากจำนวนเชื้อเริ่มต้น 8.8 log CFU ต่อกรัม ส่วนการเก็บเชื้อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 มีจำนวนลดลงเหลือ 8.55 และ 8.22 log CFU ต่อกรัม หรือลดลง 0.25 และ 0.58 log CFU ต่อกรัม ตามลำดับ (ภาพที่ 23 (A) และตารางภาคผนวก ค ที่ 26) จะเห็นได้ว่าการเก็บรักษาเชื้อไว้ในสภาวะที่มีการบรรจุแบบสุญญากาศและแบบบรรยากาศปกติไม่ส่งผลให้เกิดการลดลงของเชื้ออย่างมีนัยสำคัญ *($p>0.05$)* แต่การเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องจะส่งผลให้เกิดการลดลงของเชื้ออย่างมีนัยสำคัญ *($p<0.05$)* เมื่อเทียบกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และเมื่อพิจารณาถึงปริมาณความชื้นจะพบว่าตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาปริมาณความชื้นในทุกชุดการทดลองจะมีค่าเพิ่มสูงขึ้น โดยปริมาณความชื้นในระหว่างการเก็บรักษาในสภาวะสุญญากาศ และ บรรยากาศปกติไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีปริมาณความชื้นเพิ่มขึ้นเป็น 11.50 และ14.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับเมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 8 สัปดาห์

จากปริมาณความชื้นเริ่มต้น 3.04 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การเก็บรักษาไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ปริมาณความชื้นระหว่างการเก็บรักษาในสภาวะสุญญากาศ และ บรรยากาศปกติแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีปริมาณความชื้นเพิ่มขึ้นเป็น 5.20 และ 6.22 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และพบว่าปริมาณความชื้นของผลิตภัณฑ์ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง และ 4 องศาเซลเซียส จะมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 23 (A) และตารางภาคผนวก ค ที่ 28)

ในขณะที่ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 ที่ไม่มีการเติมสารพยุงในระหว่างการเพาะเลี้ยงจะพบว่าการบรรจุในสภาวะสุญญากาศ และ สภาวะบรรยากาศปกติจะทำให้การรอดชีวิตของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยพบการรอดชีวิตที่ 8.19 และ 7.62 log CFU ต่อกรัม หรือลดลง 0.59 และ 1.16 log CFU ต่อกรัม ตามลำดับ เมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้อง จากปริมาณเชื้อเริ่มต้นหลังการทำแห้งที่ 8.78 log CFU ต่อกรัม ส่วนการเก็บเชื้อที่ 4 องศาเซลเซียสให้ผลเช่นเดียวกันกับการเก็บที่อุณหภูมิห้อง โดยพบการรอดชีวิตของเชื้อที่ 8.52 และ 8.16 log CFU ต่อกรัม หรือลดลง 0.26 และ 0.62 log CFU ต่อกรัม ตามลำดับ (ภาพที่ 23 (B) และตารางภาคผนวก ค ที่ 26) และพบว่าการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องจะส่งผลให้เกิดการลดลงของเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อพิจารณาถึงปริมาณความชื้นพบว่าทุกชุดการทดลองมีปริมาณความชื้นเพิ่มขึ้น โดยพบว่าที่อุณหภูมิการเก็บรักษา 4 องศาเซลเซียส ปริมาณความชื้นทั้งในสภาวะบรรจุแบบสุญญากาศ และ แบบบรรยากาศปกติไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยพบว่ามีปริมาณความชื้นที่ 10.25 และ 11.34 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเก็บรักษาไว้ 8 สัปดาห์ จากปริมาณความชื้นเริ่มต้น 4.06 เปอร์เซ็นต์ แต่สำหรับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องพบว่าปริมาณความชื้นของการเก็บในสภาวะบรรจุแบบสุญญากาศ และ แบบบรรยากาศปกติมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยพบว่ามีปริมาณความชื้นที่ 12.09 และ 14.11 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 23 (B) และตารางภาคผนวก ค ที่ 28)

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการเลี้ยง *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 แบบเติมและไม่เติมสารพยุงพบว่าการรอดชีวิตของเชื้อไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ หลังการเก็บรักษาไว้ที่สภาวะต่าง ๆเป็นเวลา 8 สัปดาห์ (ตารางภาคผนวก ค ที่ 27) และสำหรับความชื้น พบว่า การเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องทั้งในสภาวะบรรจุแบบสุญญากาศ และบรรยากาศปกติจะไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ระหว่างชุดการทดลองที่เติมและไม่เติมสารพยุง แต่เมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจะ

พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ระหว่างชุดการทดลองที่เติมและไม่เติมสารพยุง (ตารางภาคผนวก ค ที่ 28)



ภาพที่ 23 จำนวนเชื้อที่รอดชีวิต และปริมาณความชื้นก่อน และหลังการทำแห้ง และ การเก็บรักษาในถุงภายใต้สภาวะสุญญากาศ และ บรรยากาศปกติ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ อุณหภูมิห้อง ของ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 ที่เจริญในอาหารที่มีซีโอไลท์เป็นสารพยุง (A) และไม่มีสารพยุง (B) จากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งโดยมีนมผงพร่องมันเนย 20 เปอร์เซ็นต์เป็นสารตัวกลาง

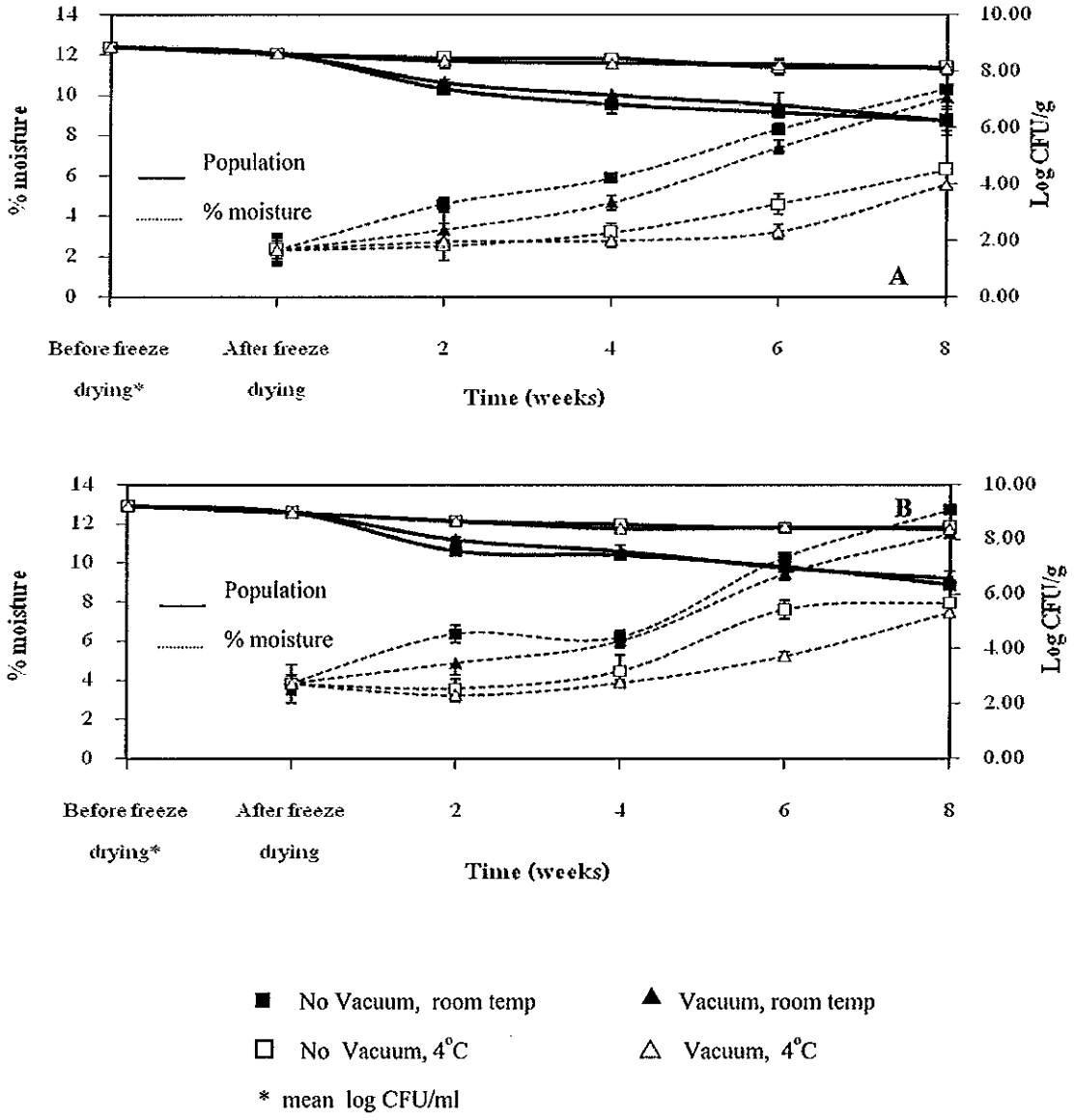
Figure 23 Viable population and moisture content before and after freeze drying *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 grown in zeolite containing MRS broth (A) and without zeolite (B) stored in vacuum and no vacuum packages under 4 °C and room temperature for 8 weeks.

สำหรับการรอดชีวิตของ *Candida tropicalis* TH112 ให้ผลเช่นเดียวกันกับ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 โดยพบว่า การบรรจุทั้งสองสภาวะไม่ส่งผลต่อการรอดชีวิตของเชื้อ ในขณะที่อุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษาจะมีอิทธิผลต่อการรอดชีวิตมากกว่า โดยจากการทดลองพบว่า *Candida tropicalis* TH112 ที่เลี้ยงโดยมีการเติมสารพยุงเซลล์ จะมีจำนวนเชื่อที่รอดชีวิตในระหว่างการเก็บรักษาในสภาวะการบรรจุทั้งแบบสุญญากาศ และ แบบสภาวะบรรยากาศปกติไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ คือ *Candida tropicalis* TH112 มีปริมาณ 6.24 และ 6.26 log CFU ต่อกรัม หรือลดลง 2.39 และ 2.37 log CFU ต่อกรัม ตามลำดับ จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8.63 log CFU ต่อกรัม เมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ในขณะที่การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลลเซียส มีการรอดชีวิตของเชื้อที่ 8.10 และ 8.14 log CFU ต่อกรัม หรือลดลง 0.53 และ 0.49 log CFU ต่อกรัม (ภาพที่ 24 (A) และตารางภาคผนวก ค ที่ 29) จะเห็นได้ว่าการเก็บรักษาเชื้อไว้ในสภาวะที่มีการบรรจุแบบสุญญากาศและแบบบรรยากาศปกติไม่ส่งผลให้เกิดการลดลงของเชื้ออย่างมีนัยสำคัญ *($p>0.05$)* แต่การเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องจะส่งผลให้เกิดการลดลงของเชื้ออย่างมีนัยสำคัญ *($p<0.05$)* เมื่อเทียบกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อพิจารณาถึงปริมาณความชื้นพบว่าปริมาณความชื้นของผลิตภัณฑ์ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องทั้งการบรรจุแบบสุญญากาศ และ บรรยากาศปกติ ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยมีปริมาณความชื้น 9.91 และ 10.30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเก็บรักษาไว้เป็นเวลา 8 สัปดาห์ จากปริมาณความชื้นเริ่มต้น 2.35 เปอร์เซ็นต์ และการเก็บรักษาไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส จะมีปริมาณความชื้นระหว่างการเก็บรักษาในสภาวะสุญญากาศ และบรรยากาศปกติแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีปริมาณความชื้นเพิ่มขึ้นเป็น 5.59 และ 6.31 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และพบว่าปริมาณความชื้นของผลิตภัณฑ์ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง และ 4 องศาเซลเซียส จะมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 24 (A) และตารางภาคผนวก ค ที่ 31)

ในขณะที่การรอดชีวิตของ *Candida tropicalis* TH112 ที่ไม่เติมสารพยุงในระหว่างการเลี้ยงเซลล์จะให้ผลเช่นเดียวกันกับแบบที่มีการเติมสารพยุง คือ การบรรจุในสภาวะสุญญากาศ และสภาวะบรรยากาศปกติ ไม่ส่งผลต่อการรอดชีวิตของเชื้อ ในขณะที่อุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษาจะมีอิทธิผลต่อการรอดชีวิตมากกว่า โดยพบว่า *Candida tropicalis* TH112 ที่เลี้ยงโดยไม่มีการเติมสารพยุงเซลล์ จะมีจำนวนเชื่อที่รอดชีวิตในระหว่างการเก็บรักษาในสภาวะการบรรจุทั้งแบบสุญญากาศ และ แบบสภาวะบรรยากาศปกติไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ คือมีการรอดชีวิต 6.60 และ 6.35 log CFU ต่อกรัม หรือลดลง 2.40 และ 2.65 log CFU ต่อกรัม ตามลำดับ จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น 9.00 log CFU ต่อกรัม เมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ส่วนการเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส พบว่า การรอดชีวิตของ *Candida tropicalis*

TH112 ให้ผลเช่นเดียวกันกับการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง โดนมีการรอดชีวิตที่ 8.39 และ 8.47 log CFU ต่อกรัม หรือลดลง 0.61 และ 0.53 log CFU ต่อกรัม ตามลำดับ (ภาพที่ 24 (B) และตารางภาคผนวก ค ที่ 29) จะเห็นได้ว่าการเก็บรักษาเชื้อไว้ในสภาวะที่มีการบรรจุแบบสุญญากาศและแบบบรรยากาศปกติไม่ส่งผลให้เกิดการลดลงของเชื้ออย่างมีนัยสำคัญ แต่การเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องจะส่งผลให้เกิดการลดลงของเชื้ออย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อนำผลิตภัณฑ์มาหาปริมาณความชื้นพบว่า การเก็บรักษาเชื้อที่การบรรจุแบบสุญญากาศและ บรรยากาศปกติ ที่อุณหภูมิห้องจะมีปริมาณความชื้นที่สูงกว่าการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยพบว่ามีปริมาณความชื้นที่ 11.52 และ 12.74 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง และ 7.47 และ 7.96 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ตามลำดับ จากปริมาณความชื้นเริ่มต้น 3.84 เปอร์เซ็นต์ ของการเก็บรักษาไว้ 8 สัปดาห์ (ภาพที่ 24 (B) และตารางภาคผนวก ค ที่ 31)

เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง *Candida tropicalis* TH112 ที่มีการเติมและไม่เติมสารพยุงในระหว่างการเพาะเลี้ยงพบว่า การรอดชีวิตของเชื้อที่เก็บรักษาไว้ที่สภาวะต่าง ๆ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ หลังการเก็บรักษาไว้ 8 สัปดาห์ (ตารางภาคผนวก ค ที่ 30) และสำหรับความชื้น พบว่า การเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องทั้งในสภาวะบรรจุแบบสุญญากาศ และ บรรยากาศปกติจะไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ระหว่างชุดการทดลองที่เติมและไม่เติมสารพยุง แต่เมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสที่การบรรจุแบบสภาวะปกติจะพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ระหว่างชุดการทดลองที่เติมและไม่เติมสารพยุง (ตารางภาคผนวก ค ที่ 31) และ จากการทดลองจะพบว่าการเก็บรักษาเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องจะมีปริมาณความชื้นสูงกว่าการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 24 จำนวนเชื้อที่รอดชีวิต และปริมาณความชื้นก่อน และหลังการทำแห้ง และ การเก็บรักษาในถุงภายใต้สภาวะสุญญากาศ และ บรรยากาศปกติ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง ของ *Candida tropicalis* TH112 ที่เจริญในอาหารที่มีทัลคัมเป็นสารพยุง (A) และไม่มีสารพยุง (B) จากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งโดยมีนมผงพร่องมันเนย 20 เปอร์เซ็นต์เป็นสารตัวกลาง

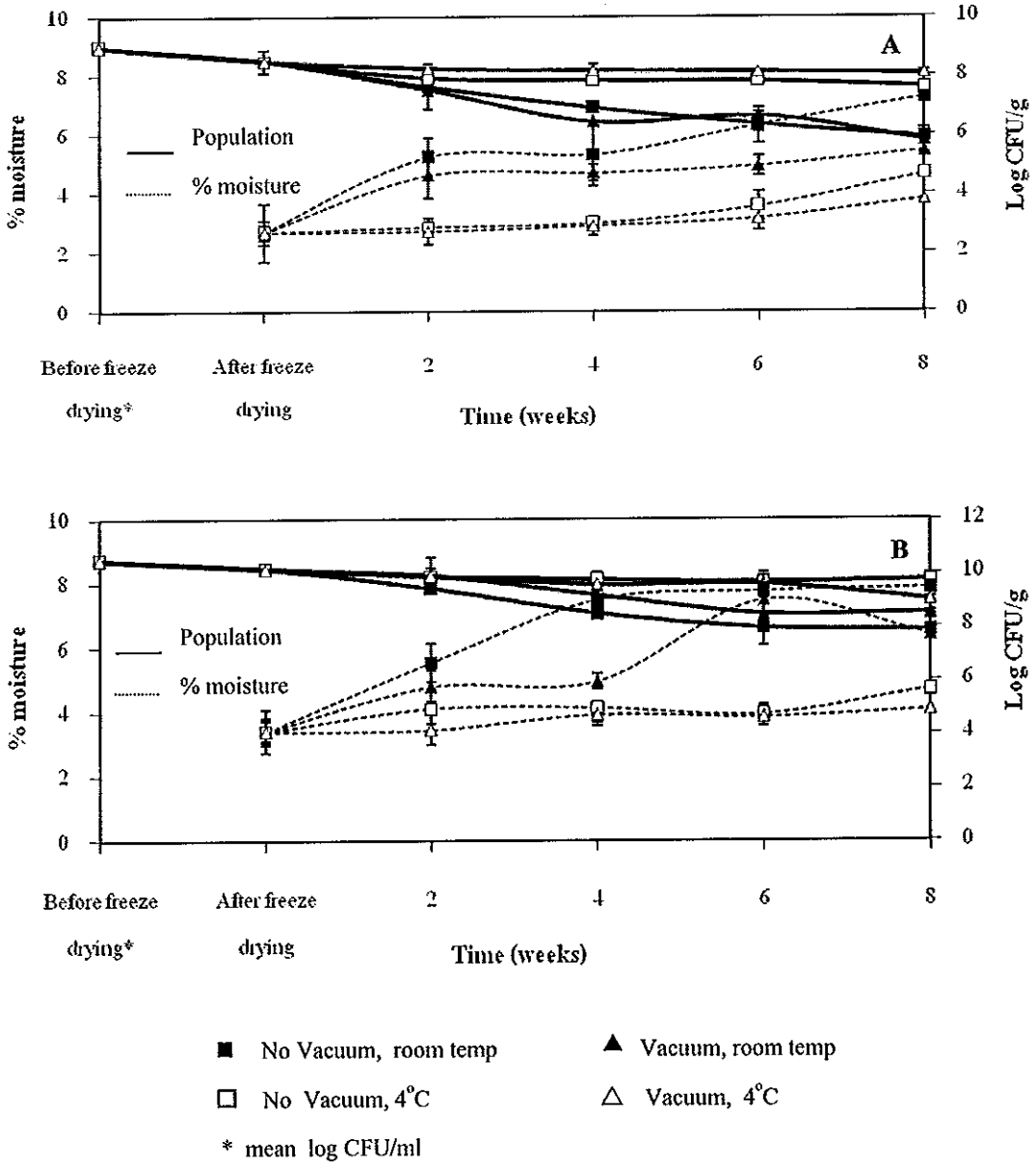
Figure 24 Viable population and moisture content before and after freeze drying *Candida tropicalis* TH112 grown in talcum containing YM broth (A) and without zeolite (B) stored in vacuum and no vacuum packages under 4°C and room temperature for 8 weeks.

และสำหรับการรอดชีวิตของ *Pseudozyma antarctica* TH9 จะมีผลที่ใกล้เคียงกับ *Lactobacillus plantarum* MOR3.12 และ *Candida tropicalis* TH112 กล่าวคือสภาวะในการเก็บรักษาทั้งสองแบบไม่มีผลต่อการรอดชีวิตของเชื้อ แต่ อุณหภูมิในการเก็บรักษาจะมีอิทธิพลอย่างมาก โดย พบว่าในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง *Pseudozyma antarctica* TH9 ที่มีการเติมสารพยุงในระหว่างการเลี้ยงเซลล์ มีการรอดชีวิตในระหว่างการเก็บรักษาที่สภาวะสุญญากาศ และ บรรยากาศปกติ ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ คือ มีการรอดชีวิตที่ 5.80 และ 5.94 log CFU ต่อกรัม หรือลดลง 2.69 และ 2.55 log CFU ต่อกรัม ตามลำดับ หลังจากเก็บรักษาไว้ 8 สัปดาห์ จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8.63 log CFU ต่อกรัม ส่วนการเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียสจะพบว่าการรอดชีวิตของเชื้อที่เก็บรักษาไว้ในสภาวะสุญญากาศ และ บรรยากาศปกติจะมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยมีการรอดชีวิตที่ 8.08 และ 7.62 log CFU ต่อกรัม ตามลำดับ หลังจากเก็บรักษาไว้ 8 สัปดาห์ และ จะเห็นได้ว่าการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องจะส่งผลให้เกิดการลดลงของเชื้ออย่างมีนัยสำคัญ *($p<0.05$)* เมื่อเทียบกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 25 (A) และตารางภาคผนวก ค ที่ 32) และเมื่อวิเคราะห์หาความชื้นพบว่า ที่การเก็บรักษาเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจะทำให้เชื้อมีปริมาณความชื้นที่น้อยกว่าการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยพบว่าการเก็บรักษาเชื้อไว้ในสภาวะสุญญากาศ ที่อุณหภูมิห้อง และ 4 องศาเซลเซียส มีปริมาณความชื้นที่ 5.44 และ 3.80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หลังจากเก็บรักษาเชื้อไว้ 8 สัปดาห์ ส่วนการเก็บเชื้อไว้ที่สภาวะบรรยากาศมีปริมาณความชื้นที่ 7.25 และ 4.66 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากปริมาณความชื้นเริ่มต้น 2.69 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 25 (A) และตารางภาคผนวก ค ที่ 34)

ในขณะที่การรอดชีวิตของ *Pseudozyma antarctica* TH9 ที่ไม่เติมสารพยุงในระหว่างการเลี้ยงเซลล์ พบว่าทั้งสภาวะการบรรจุ และ อุณหภูมิในการเก็บรักษามีผลต่อการรอดชีวิตของเชื้อโดย พบว่าการรอดชีวิตของเชื้อการรักษาเชื้อไว้ในสภาวะสุญญากาศ และ บรรยากาศปกติ ทั้งที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง และ ที่ 4 องศาเซลเซียส มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ คือพบว่า *Pseudozyma antarctica* TH9 มีการรอดชีวิตที่ 7.10 และ 6.55 log CFU ต่อกรัม หรือลดลง 1.36 และ 1.91 log CFU ต่อกรัม ตามลำดับ หลังจากเก็บรักษาไว้ 8 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิห้อง จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8.46 log CFU ต่อกรัม และในการเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส พบการรอดชีวิตที่ 7.52 และ 8.12 log CFU ต่อกรัม หรือลดลง 0.94 และ 0.34 log CFU ต่อกรัม ตามลำดับ หลังจากเก็บรักษาไว้ 8 สัปดาห์ (ภาพที่ 25 (B) และตารางภาคผนวก ค ที่ 32) เมื่อหาปริมาณความชื้นพบว่า ในการเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียสปริมาณความชื้นของผลิตภัณฑ์ที่เก็บไว้ในสภาวะสุญญากาศ และ บรรยากาศปกติ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยมีปริมาณความชื้นที่ 4.89 และ 5.66 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หลังจากเก็บรักษาไว้ 8

สัปดาห์ จากปริมาณความชื้นเริ่มต้นที่ 4.09 ในขณะที่การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ ห้องพบว่าการเก็บไว้ในสภาวะสุญญากาศ และ บรรยากาศปกติจะมีปริมาณความชื้นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยมีปริมาณความชื้นที่ 7.71 และ 9.43 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หลังจากเก็บรักษาไว้ 8 สัปดาห์ (ภาพที่ 25 (B) และตารางภาคผนวก ค ที่ 34)

เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง *Pseudozyma antarctica* TH9 ที่มีการเติมและไม่เติมสารพยุงในระหว่างการเพาะเลี้ยงพบว่า การรอดชีวิตของเชื้อที่เก็บรักษาไว้ที่สภาวะต่าง ๆ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ หลังการเก็บรักษาไว้ 8 สัปดาห์ (ตารางภาคผนวก ค ที่ 33) และสำหรับความชื้น พบว่า การเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องทั้งในสภาวะบรรจุแบบสุญญากาศ และ บรรยากาศปกติจะมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ระหว่างชุดการทดลองที่เติมและไม่เติมสารพยุง แต่เมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสที่การบรรจุแบบสภาวะปกติจะไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ระหว่างชุดการทดลองที่เติมและไม่เติมสารพยุง (ตารางภาคผนวก ค ที่ 34) และจากการทดลองจะพบว่าการเก็บรักษาเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องจะมีปริมาณความชื้นสูงกว่าการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 25 จำนวนเชื้อที่รอดชีวิต และปริมาณความชื้นก่อน และหลังการทำแห้ง และ การเก็บรักษาในถุงภายใต้สภาวะสุญญากาศ และ บรรยากาศปกติ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง ของ *Pseudozyma antarctica* TH9 ที่เจริญในอาหารที่มีซีโอไลท์เป็นตัวพยุง (A) และไม่มีสารพยุง (B) จากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งโดยมีนมผงพร่องมันเนย 20 เปอร์เซ็นต์เป็นสารตัวกลาง

Figure 25 Viable population and moisture content before and after freeze drying *P.antarctica* TH9 grown in zeolite containing YM broth (A) and without zeolite (B) stored in vacuum and no vacuum packages under 4°C and room temperature for 8 weeks.

จากการทดลองทำแห้งเชื้อทั้ง 3 ชนิดของ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 พบว่าเชื้อทั้ง 3 ชนิดที่มีการเลี้ยงโดยไม่มีการใช้สารพยุงจะมีอัตราการรอดชีวิตของเชื้อที่สูงกว่า ชุดที่มีการเติมสารพยุง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากขนาดช่องว่างของสารพยุงที่เลือกใช้ เช่น ซีโอไลท์ มีขนาดแค่ 3-10 อัมสตรอม (วาสนา กิตติกนกรัตน์, 2546) ซึ่งเล็ก กว่าเซลล์ของแบคทีเรียแลกติก และ ยีสต์ จึงทำให้เซลล์ของแบคทีเรียแลกติก และยีสต์ไม่สามารถเข้าไปอยู่ในช่องว่างของตัวพยุงได้ ดังนั้นการเติมสารพยุงลงไปในระหว่างการเลี้ยงเซลล์จึงไม่ส่งผลให้มีการรอดชีวิตที่สูงขึ้น และนอกจากนั้นยังพบว่าสายพันธุ์ของเชื้อก็มีผลต่อการรอดชีวิตของเชื้อในระหว่างการเก็บรักษาเช่นกัน โดยพบว่า *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 มีปริมาณเชื้อที่ลดลงน้อยกว่า *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเชื้อ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 ที่นำมาทำแห้งเป็นเชื้อที่เจริญในช่วง stationary phase ซึ่งเป็นการเจริญในช่วงที่เชื้อมีอัตราการเจริญคงที่ และเป็นช่วงที่เชื้อผ่านสภาวะต่าง ๆ มามากกว่าช่วง Early log phase และ lag phase เช่น สภาวะในการแบ่งเซลล์ หรือ สภาวะที่มีอาหารไม่เพียงพอ จึงทำให้เชื้อมีความสามารถในการทนต่อสภาวะต่าง ๆ ได้ดีกว่า (Morgan *et al.*, 2006) ในขณะที่ยีสต์ *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 ที่นำมาทำแห้งเป็นเชื้อที่เจริญในช่วงต้นของ stationary phase ซึ่งเซลล์อาจจะสะสมสารอาหารพวกคาร์โบไฮเดรตได้น้อยกว่าการเจริญในช่วง stationary phase ซึ่งเป็นช่วงการเจริญที่เซลล์มีการสะสมของคาร์โบไฮเดรตพวก ทรีฮาโลส (trehalose) ไว้เป็นจำนวนมาก และสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งพลังงานสำรองในระหว่างที่เซลล์เกิดขาดแคลนอาหาร และทำให้ยีสต์ในช่วง stationary phase มีความสามารถในการทนต่อสภาวะต่าง ๆ ได้ดีกว่าช่วงการเจริญอื่น ๆ (ศันสนีย์ ชีระพันธ์, 2540) และจากการทดลองของ Wang และคณะ (2004) ที่พบว่าการเก็บรักษาเชื้อ *Streotococcus thermophilus* และ *Bifidobacterium longum* ไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสจะมีอัตราการรอดชีวิตที่ 51.10 และ 68.80 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับในขณะที่การเก็บรักษาเชื้อ *Streotococcus thermophilus* และ *Bifidobacterium longum* ไว้ที่ 25 องศาเซลเซียสจะมีอัตราการรอดชีวิตของเชื้อที่ 38.30 และ 60.80 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

หลังจากการทำแห้งแล้วผลิตภัณฑ์ที่ได้ควรเก็บรักษาไว้ในสภาวะที่เหมาะสม เพื่อให้เชื้อมีการรอดชีวิตสูง ดังนั้นสภาวะที่จะทำให้เชื้อมีการรอดชีวิตต่ำเช่น ออกซิเจน ความชื้น แสง การปนเปื้อนของเชื้ออื่น ๆ และ อุณหภูมิ ควรหลีกเลี่ยง ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการเก็บรักษาเชื้อหลังการทำแห้งไว้ในถุงอลูมิเนียมฟอยล์เนื่องจากถุงอลูมิเนียมฟอยล์จะมีอัตราการซึมผ่านของอากาศต่ำกว่าภาชนะบรรจุอื่น ๆ เช่น ขวดพลาสติก หรือ ขวดแก้ว (Ishibashi and Shimamura, 1993) ซึ่งเป็นการช่วยป้องกันออกซิเจน และ แสงได้ และจากการทดลองของ Costa และคณะ (2002) พบว่าการใช้ถุงพลาสติกที่มีการซึมผ่านของอากาศน้อยจะช่วยให้ผลิตภัณฑ์เชื้อผง *Pentoea agglomerans* มี

การรอดชีวิตในระหว่างการเก็บรักษาสูงกว่าการใช้ถุงพลาสติกที่มีการซึมผ่านของอากาศมาก และทำการเก็บรักษาภายใต้สภาวะสุญญากาศ และ บรรยากาศปกติ พบว่าทั้งสองสภาวะไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในการบรรจุแบบสุญญากาศไม่ได้ใช้ก๊าซไนโตรเจนเข้าไปแทนที่ออกซิเจนดังนั้นในถุงอะลูมิเนียมฟอยล์ยังคงมีออกซิเจนเหลืออยู่ และอาจจะส่งผลให้ออกซิเจนไปสะสมอยู่ที่ผนังเซลล์ และ ทำลายเซลล์ได้ โดยจากรายงานของ Bozoglu และคณะ (1987) อ้างโดย Santivarangkna และ คณะ (2007) ที่พบความแตกต่างของการเก็บรักษาเชื้อ *Lactobacillus bulgaricus* และ *Streptococcus thermophilus* ในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ โดยการแทนที่ด้วยไนโตรเจน พบว่าอัตราการตายที่สูงจะเกี่ยวข้องกับอากาศที่เข้าไปอยู่ในระหว่างเซลล์ และการสะสมอากาศเหล่านี้เข้าไปเซลล์มาก ๆ โดยไม่ได้กำจัดออกจะทำให้เกิดการทำลายผนังเซลล์และในที่สุดเซลล์จะถูกทำลาย

นอกจากนั้นยังพบว่าอุณหภูมิในการเก็บรักษาเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์มากที่สุด เนื่องจากการทดลองจะพบว่าการเก็บรักษาเชื้อไว้ที่อุณหภูมิต่ำ ๆ เช่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจะทำให้เชื้อมีอัตราการรอดชีวิตที่สูงกว่าการเก็บรักษาเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของนอกจากนั้น Costs และคณะ (2002) ที่พบว่า *Pentoea agglomerans* ที่เก็บรักษาไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสมีปริมาณเชื้อลดลงเพียง 0.5 log CFU ต่อมิลลิลิตรที่เวลาการเก็บรักษาที่ 90 วัน ในขณะที่เก็บรักษาไว้ที่ 25 องศาเซลเซียสจะมีปริมาณเชื้อที่ลดลง 3 log CFU ต่อมิลลิลิตรที่เวลาการเก็บรักษาที่ 28 วัน ส่วน ศันสนีย์ ชีระพันธ์ (2540) พบว่าการเก็บรักษายีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* S5 ที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งและเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องมีการรอดชีวิตของเชื้อที่สูงกว่าการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง นอกจากนั้น Saarela และคณะ (2006) พบว่า *Bifidobacterium* sp. ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิต่ำ จะมีการรอดชีวิตหลังการทำแห้งสูงกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

จากการทดลองพบว่าการรอดชีวิตของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 ในระหว่างการทำแห้งจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อ และระยะเวลาในการเจริญของเชื้อแต่ละชนิด และ การเติมตัวพยุงในระหว่างการเพาะเลี้ยงไม่ได้ช่วยให้เชื้อทั้ง 3 ชนิดมีการรอดชีวิตในระหว่างการทำแห้ง และ ระหว่างการเก็บรักษาสูงกว่าการเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีการเติมตัวพยุงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และ เมื่อนำมาบรรจุในถุงอะลูมิเนียมฟอยล์ในสภาวะสุญญากาศ และ บรรยากาศปกติ พบว่าไม่มีความแตกต่างของการรอดชีวิตของเชื้อทั้ง 3 ชนิด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่อุณหภูมิในการเก็บรักษามีอิทธิพลต่อการรอดชีวิตของเชื้อมากที่สุด โดยพบว่าการเก็บรักษาเชื้อไว้ที่อุณหภูมิต่ำจะทำให้เชื้อมีการรอดชีวิตที่สูงกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

นอกจากนั้นยังพบว่าการเก็บรักษาเชื้อที่อุณหภูมิห้องจะทำให้ผลิตภัณฑ์มีปริมาณความชื้นสูงกว่าการเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส และ ปริมาณความชื้นที่เพิ่มขึ้นจะส่งผลให้ปริมาณเชื้อลดลงเช่นกัน

เมื่อพิจารณาถึงความสัมพันธ์กันในแต่ละปัจจัย จะพบว่าอุณหภูมิ และ ปริมาณความชื้นเป็นปัจจัยที่ส่งผลโดยตรงต่อการรอดชีวิตของเชื้อในขณะที่สภาวะในการเก็บรักษาที่สุญญากาศ และบรรยากาศปกติไม่ส่งผลโดยตรงต่อการรอดชีวิตของเชื้อ

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองนำเชื้อแบคทีเรียแลกติกทั้งหมด 186 สายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากสัตว์ทะเลมาทดสอบความสามารถในการย่อยโปรตีน แป้ง และ ไขมัน ปรากฏว่ามีเพียงสายพันธุ์ ADa_3 ที่คัดแยกได้จากหอยแครงเท่านั้นที่สามารถย่อยไขมันได้ แต่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Vibrio harveyi* น้อยกว่า 25 AU ต่อมิลลิลิตรดังนั้นจึงเลือก *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Vibrio harveyi* สูงถึง 50 AU ต่อมิลลิลิตร ร่วมกับการใช้ยีสต์ *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 ที่มีความสามารถในการย่อยโปรตีน แป้ง และ ไขมัน มาทดลองในขั้นต่อไป

เมื่อนำ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 มาเลี้ยงร่วมกับ *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 เพื่อศึกษาผลของการยับยั้ง *Vibrio harveyi* ในชุดที่มีการเพาะเลี้ยงร่วมกันระหว่างเชื้อทั้ง 4 ชนิดนั้นจะส่งผลให้ *Vibrio harveyi* ถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์ภายในชั่วโมงที่ 18 ของการบ่ม โดยตรวจพบว่าปริมาณ *Vibrio harveyi* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ *($p<0.05$)* ในขณะที่ชุดควบคุมที่มีการเติม *Vibrio harveyi* เพียงอย่างเดียวมีจำนวนเชื้อเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ *($p<0.05$)* และจุลินทรีย์โปรไบโอติกทั้งสามชนิดสามารถเจริญแข่งขันกันได้โดยไม่มีชนิดใดที่ถูกยับยั้ง หลังจากนั้นได้นำ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 มาผสมในอาหารกุ้งและตรวจสอบการรอดชีวิตของเชื้อทั้ง 3 ชนิดเมื่อเก็บรักษาอาหารกุ้งไว้ในกล่องพลาสติกที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่า เมื่อเก็บรักษาครบ 3 วัน พบว่าปริมาณแบคทีเรียแลกติก และยีสต์ในแต่ละชุดการทดลองสูงกว่า 8 log CFU ต่อกรัมของอาหารกุ้ง และเมื่อนำอาหารกุ้งที่ผสม *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 ทั้งแบบเชื้อเดี่ยว และโปรไบโอติกผสมทั้ง 3 ชนิด ให้กุ้งขาวกินเป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่ากุ้งขาวที่ได้รับโปรไบโอติกที่มีการเจริญ และ อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (% FCR) สูงกว่ากุ้งขาวที่ไม่ได้รับโปรไบโอติกอย่างไม่มีนัยสำคัญ*($p>0.05$)* และพบว่าอัตราการรอดชีวิตของกุ้งขาวในชุดที่ได้รับโปรไบโอติกไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ *($p>0.05$)* แต่แตกต่างกับกุ้งขาวที่ไม่ได้รับโปรไบโอติกอย่างมีนัยสำคัญ *($p<0.05$)* เมื่อนับปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งขาวในแต่ละชุดการทดลองพบว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกทั้งชนิดเดียว และอาหารผสมโปรไบโอติกทั้ง 3 ชนิดมีปริมาณเม็ดเลือดรวมเพิ่มขึ้นจากก่อนการได้รับโปรไบโอติกอย่างมีนัยสำคัญ *($p<0.05$)* และมีปริมาณเม็ดเลือดรวมสูงกว่ากุ้งขาวที่ไม่ได้รับโปรไบโอติกอย่างมีนัยสำคัญ

($p<0.05$) ยกเว้นกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสม *Pseudozyma antarctica* TH9 ชนิดเดียว ที่มีปริมาณเม็ดเลือดไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ *($p>0.05$)* หลังจากครบ 6 สัปดาห์ ทำการตรวจนับปริมาณแบคทีเรียแลกติก ปริมาณยีสต์ ปริมาณ *Vibrio* sp. และ ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในระบบทางเดินอาหารของกุ้งขาว พบว่า กุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมเชื้อ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 ทั้งแบบชนิดเดียว และ ผสมโปรไบโอติกทั้ง 3 ชนิด มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลกติกสูงกว่ากุ้งขาวที่ไม่ได้รับ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 อย่างมีนัยสำคัญ *($p<0.05$)* ส่วนกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่ผสมยีสต์ *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9 เพียงชนิดเดียว และโปรไบโอติกผสมทั้ง 3 ชนิดจะทำให้กุ้งขาวมีปริมาณเชื้อยีสต์สูงกว่ากุ้งขาวที่ไม่ได้รับ *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9 อย่างมีนัยสำคัญ *($p<0.05$)* สำหรับผลการตรวจนับปริมาณ *Vibrio* sp. สามารถนับได้ 2 ลักษณะ คือ *Vibrio* sp. ที่มีลักษณะโคโลนีเป็นสีเหลือง และสีเขียว โดยกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสม *Candida tropicalis* TH112 เพียงชนิดเดียว มีปริมาณ *Vibrio* sp. สีเหลืองมากที่สุด ในขณะที่กุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกทั้ง 3 ชนิดมีปริมาณ *Vibrio* sp. สีเขียวมากที่สุด หลังจากนั้นได้ศึกษาความสามารถในการต้านทาน *Vibrio harveyi* ของกุ้งขาวโดยการฉีด *Vibrio harveyi* ที่มีความเข้มข้น 4.8-7.61x10^7CFU ต่อมิลลิลิตร เข้าสู่กล้ามเนื้อของกุ้งโดยตรง และพบว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกทั้ง 3 ชนิดจะมีอัตราการตายที่ต่ำที่สุดในทุกช่วงเวลา และเมื่อลดปริมาณความเข้มข้นของ *Vibrio harveyi* ลงเป็น 4.8-7.61x10^5CFU ต่อมิลลิลิตร และฉีดเข้าสู่กล้ามเนื้อของกุ้งโดยตรง พบว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่ผสมโปรไบโอติกทั้ง 3 ชนิด จะมีอัตราการตายที่ต่ำที่สุดหลังจากได้รับเชื้อผ่านไป 10 วัน และเมื่อทดสอบความต้านทานโรคโดยการใส่ *Vibrio harveyi* ลงไปในน้ำทะเลที่ใช้เลี้ยง โดยให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของเชื้อที่ 4.8-7.61x10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร พบว่ากุ้งขาวทุกชุดการทดลองมีอัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์เท่ากัน และเมื่อเพิ่มความเข้นข้นของ *Vibrio harveyi* เป็น 4.8-7.61x10^7 CFU ต่อมิลลิลิตร พบว่ากุ้งขาวแสดงอาการของการติดเชื้อภายใน 5 ชั่วโมงแรก โดยพบว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสม *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9 เพียงชนิดเดียว และ กุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่ไม่ผสมโปรไบโอติกมีอัตราการตายสูงที่สุดที่ 100 เปอร์เซ็นต์ และกุ้งขาวชุดที่ได้รับอาหารผสม *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 เพียงชนิดเดียว และ ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกทั้ง 3 ชนิด มีอัตราการตายที่ 80.00 และ 50.00 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และเมื่อเวลาผ่านไป 10 วันไม่พบว่ามีอัตราการตายเพิ่มขึ้น หลังจากนั้นได้ศึกษาผลของการใช้เชื้อผสม *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 ต่อความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียในเลือด พบว่า กุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีผสมโปรไบโอติกทั้ง 3 ชนิดมีความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียออกจากเลือดได้ดีที่สุด โดยมีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อ *Vibrio harveyi* ออกจากระบบไหลเวียนสูงที่สุดที่ 96.80 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเปลี่ยนอาหารกุ้งเป็นอาหารปกติที่ไม่มีการผสมโปรไบโอติก เพื่อทดสอบการคง

อยู่ของแบคทีเรียแลกติก และ ยีสต์ในระบบทางเดินอาหารพบว่า ปริมาณแบคทีเรียแลกติกในทางเดินอาหารของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสม *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 เพียงชนิดเดียว และ ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกทั้ง 3 ชนิด ลดปริมาณลงอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ภายในวันแรกของการหยุดให้อาหารผสมโปรไบโอติก ส่วนปริมาณยีสต์พบว่าปริมาณยีสต์ในทางเดินอาหารกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสม *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9 เพียงชนิดเดียว และโปรไบโอติกผสมทั้ง 3 ชนิด มีปริมาณยีสต์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 3 วันของการหยุดให้อาหารผสมโปรไบโอติก แต่อย่างไรก็ตามพบปริมาณแบคทีเรียแลกติก และยีสต์ในทางเดินอาหารของกุ้งขาวที่ได้รับโปรไบโอติกสูงกว่าชุดการทดลองที่ไม่ได้รับโปรไบโอติก

หลังจากการทดลองที่พบว่าการใช้เชื้อผสมทั้ง 3 ชนิดของ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 สามารถช่วยส่งเสริมการเจริญ การรอดชีวิต และ ภาวะภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวได้ จึงได้ทดสอบการผลิตเชื้อทั้ง 3 ชนิดในรูปแบบผงโดยการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง และพบว่าจากการทดลองที่ได้ใช้นมผงพร่องมันเนย 20 เปอร์เซ็นต์จะให้อัตราการรอดชีวิตของ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 สูงกว่าการใช้สารตัวกลางอื่น ๆ และเมื่อนำทัลคัม ซีโอไลท์ และแคลเซียมคาร์บอเนต มาทดลองใช้ เป็นสารพยุงเซลล์ในระหว่างการเลี้ยงเซลล์ พบว่าการเติมสารพยุงในระหว่างการเพาะเลี้ยงไม่ได้ช่วยให้เชื้อทั้ง 3 ชนิดมีการรอดชีวิตของเชื้อสูงกว่าชุดที่ไม่มีการเติมสารพยุงในระหว่างการเพาะเลี้ยงอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นได้ผลิตผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกผงภายใต้สภาวะที่คัดเลือกและทำการเก็บรักษาไว้ในถุงอะลูมิเนียมฟอยล์ที่บรรจุแบบสุญญากาศ และบรรยากาศปกติ ภายใต้การเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง และ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่า จากการทดลองพบว่าการรอดชีวิตของ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 ในระหว่างการทำแห้งจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อ และ การเติมสารพยุงในระหว่างการเพาะเลี้ยงไม่ได้ช่วยให้เชื้อทั้ง 3 ชนิดมีการรอดชีวิตในระหว่างการทำแห้ง และ ระหว่างการเก็บรักษาสูงกว่าการเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีการเติมสารพยุงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และ เมื่อนำมาบรรจุในถุงอะลูมิเนียมฟอยล์ในสภาวะสุญญากาศ และ บรรยากาศปกติ พบว่าไม่มีความแตกต่างของการรอดชีวิตของเชื้อทั้ง 3 ชนิด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่อุณหภูมิในการเก็บรักษามีอิทธิพลต่อการรอดชีวิตของเชื้อมากที่สุด โดยพบว่าการเก็บรักษาเชื้อไว้ที่อุณหภูมิต่ำจะทำให้เชื้อมีการรอดชีวิตที่สูงกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง นอกจากนั้นยังพบว่าการเก็บรักษาเชื้อที่อุณหภูมิห้องจะทำให้ผลิตภัณฑ์มีปริมาณความชื้นสูงกว่าการเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส และ ปริมาณความชื้นที่เพิ่มขึ้นจะส่งผลให้ปริมาณเชื้อลดลงเช่นกัน

เอกสารอ้างอิง

กิจการ ศุภมาตย์. 2544. การฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ เรื่อง จุลินทรีย์กับการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 51 หน้า.

กรุงไทย. 2548. กุ้งขาว ออนไลน์ (สืบค้นจาก : http://nis.gsmfc.org/nis_factsheet.php?toc_id=141 (16 ธันวาคม 2549).

เกรียงศักดิ์ พูลสุข. 2535. ตัวเสริมชีวนะ. ว. สัตว์เศรษฐกิจ. 10: 79-82.

เกรียงศักดิ์ พูลสุข. 2545. การผลิตสินค้าเกษตรในยุคต้นคริสศตวรรษที่ 21. ประมวลผลงานการประชุมวิชาการเรื่อง เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการพัฒนาเกษตรกรรมไทย จัดโดยสถาบันราชมงคลวิทยาเขตกาฬสินธุ์ ณ.โรงแรมริมปาว 23-25 พฤษภาคม หน้า 10-19.

จิตรวี เชยชม. 2548. การคัดเลือกโปรไบโอติกยีสต์จากกุ้งกุลาดำ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ขนิษฐา คงนุ่ม. 2550. การใช้ *Candida tropicalis* และแบคทีเรียแลกติกเป็นโปรไบโอติกในการควบคุม *Vibrio harveyi* ในกุ้งขาว. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ชะลอ ลิ้มสุวรรณ. 2546. แนะเทคนิคบางจุดในการเพาะเลี้ยงวานาไมเพื่อความสำเร็จ. นิตยสารสัตว์น้ำ. 161: 75-78.

ดีพร้อม ไชยวงศ์เกรียติ. 2548. การใช้ปูนและซีโอไลท์ในบ่อเลี้ยงกุ้ง. ว. สัตว์น้ำ. 195: 103-106.

ทิพรัตน์ หงภัทรคีรี และ กิจการ ศุภมาตย์. 2549. การแยก การคัดเลือก และการผลิตยีสต์จากทะเลเพื่อนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. รายงานการวิจัยโครงการวิจัยและพัฒนาสาขาเทคโนโลยีชีวภาพและการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. สำนักงบประมาณแผ่นดิน.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. 2544. จุลชีววิทยาทั่วไป. สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์. กรุงเทพ.

นิติเนตร ขำทวี. 2544. การทำลายแบคทีเรียโดยแบคเทอริโอซิน *Lactobacillus casei* ssp. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

บุญกอบ วิริยพงศ์สุธี. 2549. การประยุกต์ใช้และการติดตามโปรไบโอติกในกุ้งขาว (*Penaeu vannamei*). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิตสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ปัณณธร ภัทรสถาพรกุล. 2547. เทคโนโลยีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (ตอนที่ 1). ว.สมาคมเครื่องทำความเย็นไทย. 11: 20-22.

เปรมสุดา สมาน. 2539. จุลินทรีย์สำหรับบำบัดน้ำเสียจาการเลี้ยงกุ้งทะเล. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์.จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พรเลิศ จันทร์รัชชกูล และ ชะลอ ลิ้มสุวรรณ. 2534. การตกค้างของยาปฏิชีวนะออกซี่เตตราซัยคลินในกุ้งกุลาดำ. ว.การประมง. 1: 31-33.

พวงพร โชติกไกร. 2536. ยีสต์ที่สำคัญในอุตสาหกรรมอาหารในจุลชีววิทยาของอาหารและนม.หน้า 43-57. แสงจันทร์การพิมพ์. กรุงเทพฯ.

ไพบูรณ์ ฟูวัฒนศิลป์. 2549. สรุปภาวะธุรกิจและแนวโน้ม. ฝ่ายวิจัยธุรกิจ สายงานบริหารความเสี่ยง บจม. ธนาคารกรุงไทย.

รัชฎา ขาวหนูนา. 2539. ยาปฏิชีวนะตกค้างในกุ้งกุลาดำจากแหล่งเพาะเลี้ยงจังหวัดสุราษฎร์ธานี. ว.การประมง 5: 407-412.

ลิลา เรืองแป้น. 2530. โรคกุ้งทะเลและการแก้ปัญหาโรค. กรุงเทพมหานค: คลินิกสัตว์น้ำกร่อย. กองประมงน้ำกร่อย. กรมประมง บางเขน.

ลิลา เรืองแป้น. 2545. ปัญหาสารปฏิชีวนะกับการเพาะเลี้ยงกุ้ง.ว.การประมง 3: 27-29.

มณฑกานต์ ทองสม. 2547. แบคทีเรียแลกติกในระบบทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

มณเฑียร ส่งเสริม, บัญญัติ สุขศรีงาน และ ปภาศิริ ศรีโสภาภรณ์. 2533. การศึกษาแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคเรืองแสงในกุ้งกุลาดำ. ว. ศรีนครินทรวิโรฒวิจัยและพัฒนา. 4: 15-23.

ยุพินท์ วิวัฒนชัยเศรษฐ์. 2543. รายงานเศรษฐกิจ. ปีที่ 53 ฉบับที่ 3. ธนาคารกรุงไทยจำกัด มหาชน.

วรณัฏฐ์ อนันตศิลป์. 2545. การศึกษาประสิทธิภาพของ Lactobacillus ในการควบคุมการเจริญ ข อ ง เชื้อ *Vibrio spp.* และความต้านทานโรคของกุ้งกุลาดำวัยอ่อน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วรรณี เมืองเจริญ. 2535. บทบาทสารเสริมชีวนะกับการเลี้ยงสัตว์. ว. สัตว์เศรษฐกิจ. 10: 79-82.

วรรณนิภา เพี้ยนภักตร์. 2539. การใช้แบคทีเรียเป็นโปรไบโอติกเสริมในอาหารกุ้ง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วัลลภ คงเพิ่มพูน. 2532. กุ้งกุลาดำ. กรุงเทพมหานคร: โครงการหนังสือเกษตรชุมชน. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน.

วาสนา กิตติกนกรัตน์. 2546. การศึกษาและอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ *Bacillus subtilis* TISTR001. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

ศันสนีย์ ชีระพันธ์. 2540. การศึกษาสารเติมแต่งเพื่อเพิ่มการรอดชีวิตของยีสต์ในระหว่างกระบวนการทำแห้ง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

ศิริพร ทวีโรจนการ. 2550. การคัดเลือกแบคทีเรียโปรไบโอติกที่ผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบจากสัตว์ทะเล. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์. 2539. จุลินทรีย์กับการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. ว.วาริชศาสตร์. 3: 42-51.

สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์. 2538. เอกสารประกอบการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่องการจำแนกและการใช้ประโยชน์จากแบคทีเรียผลิตกรดอะซิติกและกรดแลกติก: ภาควิชาจุลชีววิทยา. คณะเภสัชศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพมหานคร.

Ajitha, S., Sridhar, M., Sridhar, N., Singh, I. S. B. and Varghese, V. 2004. Probiotic effects of lactic acid bacteria against *V. alginolyticus* in *Penaeus* (Fenneropenaeus) *indicus* (H. Milne Edwards). Asian. Fisheries. Science. 17: 71-80.

Ali, A. 2002. Probiotics in fish farming. Evaluation of a bacterial mixture. Ph.D. Thesis, Swedish University of Agriculture Science. Umeda, Sweden

AOAC. 1990. Official Methords of Analysis of the Association of Office Analytical Chemists. 15th ed., Association of Official Analytical Chemists. Inc, Artination, Virginia.

Axelsson, L. T. 1993. Lactic acid bacteria: Classification and physiology in lactic acid bacteria.(ed. Saliminen, S. and Wright, A. V.). p. 1-64. Marcell Dekker. New York.

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

Balcazar, J. L., Blas, I., Zarzuela. I. R., Cunningham, D., Vendrell, D. and Muzquiz, J. L. 2006. The role of probiotics in aquaculture. J. Vet. Microbiol. 114: 173-186.

Baumann, P., Furniss, A. L. and Lee, J. V. 1984. Section 5 facultatively anaerobic gram–negative rod. genus I *Vibrio pacini* 1854, 411. Int. Bergey' s Manaul of Systemmatic Bacteriology. Vol.1 (Krieg, N. R. and Holt, J. G. ed.) p. 518-538, Baltimor: Williams and Wilkils. (eds. Krieg, N. R. and Holt, J. G.).

Beuchat, L.R. 1993. Selective media for detecting and emumerating foodborne yeasts. Int. J. Food. Microbiol. 19: 1-14.

Burgents, E. J., Burnett, G. K. and Burnett, E. L. 2004. Disease resistance of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, following the dietary administration of a yeast culture food supplement. Aquaculture. 231: 1-8.

Cahill, M. M. 1990. Bacteria flora on fish : a review. Microb. Ecol. 19: 21-41.

Carvalho, A. S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F. X. and Gibbs, P. 2004. Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. Int. Dairy. J. 14: 835-847.

Champagne, C. P., Gardner, N., Brochu, E. and Beaulieu, Y. 1991. The freeze-drying of lactic acid bacteria-a review. Can. Inst. Food. Sci. Tec. J. 24: 118-128.

Champomier-Verges, M. C., Maguin, E., Mistou, M. Y., Anglade, P. and Chich, J. F. 2002. Lactic acid bacteria and proteomics: current knowledge and perspectives. J. Chromotogr. B. 771: 329-342.

Chang, C. F., Su, M. S., Chen, H. Y., Liao, I. C. 2003. Dietary-1,3-glucan effectively improve immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. Fish. Shellfish. Immun. 15: 297-310.

Chen, S. N., Huang, S. L. and Kou, G. H. 1992. Studies on epzootiology and pathogenicity of bacterial infection in cultured giant tiger prawns, *Penaeus monodon*, in Taiwan. *In* Disease of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and The United State. (Fulks, W. and Main, K.L. ed.). p. 195-208. The Oceanic Institute. Hawai.

Chiu, C. H., Guu, Y. K., Lui, C. H. Pan, T. M. and Cheng, W. 2007. Immune response and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*. Fish. Shellfish. Immun. 23: 364-377.

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

Conway, P. L. 1996. Development of intestinal microbiota. *In* Gastrointestinal microbes and Host Interactions. (Mackie, R. I., White, B. A. and Isaacson, R. E. eds), p. 3-38. New York: Chapman & Hall.

Costa, E., Usall, J. Teixido, N., Garcia, N. And Vinas, I. 2000. Effect of protective agents, rehydration media and initial cell concentration on viabilty of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 subjected to freeze-drying. J. Appl. Microbiol. 89: 793-800.

Dasechel, M. A. and Klaenhammer, T. R. 1989. Association of a 13.6 megadalton plasmid in *Pediococcus pentosaceus* with bacteriocin activity. Appl. Environ. Microbiol. 50: 1538-1541.

Douillet, P. A. 1998. Bacterial probiotic for water quality and disease control. Prceedings of Aquaculture 1998, p: 152. World Aquaculture Society, Las Vegas, USA.

Farzanfar, A. 2006. The use of probiotic in shrimp aquaculture. FEMS Immunol. Med. Mic. 48: 149-158.

Ford, S. E, Kanaley, S. E. and Littlemood, D. T. J. 1993. Cellular responses of oyters infect with *Haplosporidium nelsoni*; change circulating and tissue-infiltrating hemocytes. J. Invertebr. Pathol. 61: 49-51.

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

Fuller, R. 1992. Probiotics: The Scirntific Basis. P. 1-8. London: Chapman and Hall.

Gatesoupe, F. J. 1991. The effect of three strains os lactic bacteria on the production rate of rotifers, *Brachionus plicatilis*, and their dietary value for larval turbot, *Scophthamus maximus*. Aquaculture. 96: 335-342.

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

Gardiner, G. E., Bouchier, P., O'Sullivan, E., Kelly, J., Collins, J. K., Fitzgerald, G. F., Ross, R. P. and Stanton, C. 2002. A spray-dried culture for probiotic cheddar cheese manufacture. Int. Dairy. J. 12: 749-756.

Garriques, D. and Wyban, J. 1993. Up to date advance on *Penaeus vannamei* maturation, nauplii and post larvae production. *In*: Associacao Brasilera de Aquicultura, p. 217-235.

Gildberg, A., Mikkelsen, H., Sandaker, E. and Ringo, E. 1997. Probotic effect of lactic acid bacteria in the feed on growth and survival of Atlantic cod (*Gadus morhua*). Hydrobiologia. 352: 23-24.

Gram, L., Melchiorsen, J., Spanggaard, B., Huber, I. and Nielson, T. F. 1999. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. Appl. Environ. Microbiol. 65: 969-973.

Gullian, M., Thompson, F. and Rodriguez, J. 2004. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Peanaeus vannamei*. Aquaculture. 233: 1-14.

Harries, L. J. and Owens, L. 1999. Production of exotoxins by two luminous *Vibrio harveyi* strains know to be primary pathogens of *Penaeus monodon* larvae. Dis. Aquat. Org. 38: 11-22.

Harzevili, A. R. S., Van Duffel, H., Dhert, P., Swings J. and Sorgeloos, P. 1998. Use of potential probiotic *Lactobacillus lactis* AR21 strain for the enhancement of growth in the rotifer *Brachionus plicatilis* (Muller). Aquaculture. Res. 29: 411-417.

Helander, I. M., Wrigth, A.V. and Mattila- Sandholm, T. M. 1997. Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobial against Gram-negative bacteria. Trends. Food .Sci. Tech. 8: 146-150.

Henke, J. M. and Bassler, B. L. 2004. Quorum sensing regulates type III secretion *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus*. J. Bacteriol. 186: 3794-3805.

Hjelm, M., Bergh, O., Riaza, A., Nielson, J., Melchiorsen,J., Jensen, S., Duncan, H., Ahrens, P., Birkbeck, H. and Gram, L. 2004. Selection and identification of autochthonous potential probiotic bacteria from turbot larvae (*Scophthalmus maximus*) rearing units. J. Appl. Microbiol. 27: 360-371.

Huba'lek, Z. 2003. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. Cryobiology. 46: 205-229.

Irianto, A. and Austin, B. 2002. Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J. Fish. Dis. 25: 333-342.

Ishibashi, N. and Shimamura, S. 1993. Bifidobacteria: research and development in Japan. J. Food. Technol. 47: 126-134.

Itami, T., Asano, M., Tokushige, K., Kubono, K., Nakagawa, A., Tekeno, N., Nishimura, H., Maeda, M., Kondo, M. and Takahasshi, Y. 1998. Enhancement of disease resistance of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, after oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. Aquaculture. 164: 277-288.

Jaborn, A., Olsson, C., Westerdahl, A., Conway, L. P. and Kjelleberg, S. 1997. Colonization in the fish intestinal tract and production of inhibitory substance in intestinal mucus and faccal extracts by *Canobacterium* sp. Strain KI. J. Fish. Dis. 20: 383-392.

Jacques, K. and Bastin, R. W. 1989. Waste Management and Odor Control : Comprehesine Planning Needs for Intensive Agricultune. In Proceeding Alltech's, fifth Ann. Symp. Biotechnology in the Feed Industy, Kentucky, USA. p. 13-33.

Johensson, M. W. and Soderhall, K. 1989. Cellular immunity in Crustaceans and the pre PO system. Parasitol. Today.5: 171–176.

Karunasgar, I., Pai, R. and Malathi, G. R. 1994. Mass mortility of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic resistance *Vibrio harveyi* infect. Aquaculture. 128: 203-209.

Kozaki, M., Uchimaru, T. and Okada, S. 1992. Experimental manual of lactic acid bacteria. p. 29-72. Tokyo: Asakurasyoten.

Larena, I., Melgarejo, P. and De Cal, A. 2003. Drying of conidia of *Penicillium oxalicum*, a biological control agent against fusarium wilt of tomato. J. Pytopathol. 151: 600-606.

Lee, K. K., Chen, F. R. and Liu, P. C. 1995. A haemocytolytic assay for tiger prawn, *Penaeus monodon*. Fish. Shellfish. Immun. 5: 385-387.

Li, K., Zheng, T., Tian, Y., Xi, F., Yuan, J., Zhang, G. and Hong, H. 2007. Benificial effects of *Bacillus licheniformis* on the intestinal microflora and immunity of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Biotechnol. Lett. 29: 525-530.

Lui, P. C., Lee, K. K. and Chen, S. N. 1996. Pathogenicity of different isolates of *Vibrio harveyi* in tiger prawn, *Penaeus monodon*. Lett. Appl. Microbiol. 22: 413-416.

Lui, P. C. and Lee, K. K. 1999. Cysteine proteinase is a major extoxin of pathogenic luminous *Vibrio harveyi* tn the tiger prown *Penaeus monodon*. Lett. Appl. Microbiol. 28: 428-430.

Madden, D. 2001. National center for Biotechnology Education, The University of Reading. Bioscience-explained (online). Available : http://www. bioscience-explained.org. (2007. January 13)

Manosroi, J., Todilokvech, U., Mashiko, A.and Manosrio, A. 1998. Preparation of embedded *Bacillus subtilis* in difference media and carriers in tablet formulations for weast elimination in ponds of Penaus *Monodom Fabricius*. The 24th Congress on Science and Technology of Thailand, Queen Sirikit Conversation center, Octorber 19-21, 1998, Bangkok, Thailand.

Martos, G. I., Minahk, C. J., De Valdez, F. and Morero, R. 2007. Effects of protective agents on menbrane fluidity of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus*. Lett. Appl. Microbiol. 45: 282-288.

Matsuo, K. and Miyazono, I., 1993. The influence of long term administration of peptidoglycan on diseasere sistanceand growth of juvenile rainbow trout. Nippon Suisan Gakk. 59: 1377–1379.

Montero, A. B. and Austin, B. 1999. Characterization of extracellular products from an isolate of *Vibrio harveyi* recovered from diseased post-larval *Penaeus vannamei* (Bonne). J. Fish. Dis. 22: 377-386.

Montgomery, M. T. and Kirchman, D. L. 1993. Role of chitin-binding proteins in the specific attachment of the marine bacterium *Vibrio harveyi* to chitin. Appl. Environ. Microbiol. 59: 373-379.

Morgan, C. A., Herman, N., White, P. A. and Vesey, G. 2006. Preservation of microorganisms by drying: a review. J. Microbiol. Meth. 66: 183-193.

Moriarty, D. J. W., Withyachmnarnkul, B., Pratanpipat, P. and Nitiethachoke, C. 1997. Managing microbial disease in aquaculture with probiotic bacteria : biotechnology of sustainable aquaculture. *In* 2 nd Asia–Pacific MarineBiotechnology Conference and 3rd Asia-Pacific Conference on Algal Biotechnology. PhuKet, Thailand. 7-10 May 1997.

Moullac, G. L., Soyez, C., Saulnier, D., Ansquer, D., Avarre, J. C. and Levy, P. 1998. Effect of hypoxia stress on the immune response and the resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris*. Fish. Shellfish. Immun. 8: 621-629.

Nakano, T., Kanmuri, T., Sato, M. and Takeuchi, M. 1999. Effect of astaxanthin rich red grat (*Phaffia rhodozyma*) on oxidative stress in rainbow trout. Biochim. Biophys. Acta. 1426: 119-125.

Naruhas, J. A. and Gadaga, T. H. 2001. The role of interaction between yeasts and lactic acid bacteria in African fermented milk: a review. Food. Microbiol. 86: 51-60.

Nikoskelainen, S., Ouwehand, A., Salminen, S. and Bylund, G. 2001. Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from furunculosis by *Lactobacillus rhamnosus*. Aquaculture. 198: 229-236.

Niku-Paavola, L. M., Laitila, A., Mattila-Sandholm, T. and Haikara, A. 1999. New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. J. Appl. Microbiol. 86: 29-35.

Ochoa-Solano, J. L. and Olmos-Soto, L. 2006. The functional property of *Bacillus* for shrimp feeding. Food. Microbiol. 23: 519-525.

Otero, M. C., Espeche, C. and Nader-Macias, M. E. 2007. Optimization of the freeze-drying media and survival throughout storage of freeze-dried *Lactobacillus gasseri* and *Lactobacillus*

delbureckii subsp. *delbrueckii* for veterinarian probiotic applications. Process. Biochem. Doi: 10.1016/j.procbio. 2007.07.008.

Pasharawipas, T., Sriurairatana, S., Direkbusarakom, S., Donayodol, Y., Thaikua, S. And Ruangpan, L. 1998. Luminious *Vibro harveyi* associated with tea brown gill syndrome in black tiger shrimp. *In* Advance in shrimp Biotechnology. (Flegel, T. W., ed.). National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok.

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

Prasad, S., Morris, P. C., Hansen, R., Meaden, P. C. and Austin, B. 2005. A novel bacteriocin-like substrance (BLIS) from a pathogenic strain of *Vibrio harveyi*. J. Microbiol. 151: 3051-3058.

Prieur, D., Mevel, G., Nicolas, J. L., Plusquellec, A. and Vigneulle, M. 1990. Interaction between bilarva molluscas and bacteria in the marine environment. Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev. 28: 277-352.

Rengpipat, S., Phianphak, W., Piyatiratitivorakul, S. and Menasveta, P. 1998. Effect of probiotic bacterium on black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) survival and growth. Aquaculture. 191: 271-288.

Ringo, E. and Gatesoupe, F. J. 1998. Lactic acid bacteria in fish: a review. Aquaculture. 160: 177-203.

Ruiz-Ponte, C., Samain, J. F., Sanchez, J. L. and Nicolas, J. L. 1999. The benefit of *Rosebacter* species on the survival of scallop larvae. J. Mar. Biotechnol. 1: 52-59.

Ruangsri, J., Wannades, M., Wanlem, S., Songnui, A., Arunrat, S., Tanmark, N., Pecharat, J. and Supamattaya, K. 2004. Pathogenesis and virulence of *Vibrio harveyi* from southern part of Thailand in black tiger shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius. Songklanakarin J. Sci. Technol. 26(1): 43-54.

Saarela, M., Virkajarvi, I., Alakomi, H. L., Sigvart-Mattila, P. and Matto, J. 2006. Stability and functionality of freeze-dried probiotic *Bifidobacterium* cells during storage in juice and milk. Int. Daily. J. 16: 1477-1482.

Sajeevan, T. P., Philip, R. and Singh, I. S. B. 2006. Immunostimulatory effect of a marine yeast *Candida sake* S165 in *Fenneropenaeus indicus*. Aquaculture. 257: 150-155.

Sakata. T. 1990. Microflora in the digestive tract of fish and shellfish. *In* Lesel, R. (Ed.), Microbiology in Poecilotherms. Elsevier, Amsterdam. p. 171-176.

Salminen, W. and Wright, A. V. 1993. Lactic Acid Bacteria. Marcel Dekker Inc. New york.

Santivarangkna, C., Kulozik, U. and Foerst, P. 2007. Alternative drying processes for the industrial preservation of lactic acid starter cultures. Biotechnol. Progr. 23: 302-315.

Scholnick, D. A., Burnett, K. G. and Burnett, L. E. 2006. Impact of exposure to bacteria on metabolism in the Penaeid shrimp *Litopenaeus vannamei*. Biol. Bull. 214: 44-49.

Scholz, U., Diaz, G. G., Ricque, D., Suarez, C. L. E., Albores, V. F. and Lathford, J. 1999. Enhancement of vibriosis resistance in juvennile *Penaeus vannamei* by supplementation of diets with different yeast product. Aquaculture. 176: 271-283.

Shariff, M., Yusoff, F. M., Devaraja, T. N. and Srinivasa Rao, P. S. 2001. The effectiveness of a commercial microbial product in poorly prepared tiger shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius), ponds. Aquac. Resh. 32: 181-187.

Silva, J., Carvalho, A. S., Teixeira, P.and Gibbs, P. A. 2001. Bacteriocin Production by Spray-dried Lactic Acid Bacteria. J. Appl Microbiol. 34: 77–81.

Smith, V. J. and Ratcliffe, N. A. 1980. Cellular defense reaction the shore crab *Carinus maenas*. J. Invertebr. Pathol. 35: 65–74 .

Soderhall, K. and Ceranius, L. 1992. Crustacean immunity. Annu. Rev. Fish. Dis. 2: 3-23.

Supamattaya, K. Ekpanithanpong, U., Itami, T. and Kasornchandra, J. 2000. The immune system in black tiger shrimps, *Penaeus monodon* Fabricius. :I. Techniques on immunological assessment and blood component in black tiger shrimps, *Penaeus monodon Fabricius*. Songklanakarin J. Sci.Technol. 22: 567-580.

Suphatharika, M., Khunrae, P., Thanardkit, P. and Verduyn, C. 2003. Preparation of spent brewer's yeast β-glucan with a potential application as an immunostimulant for black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. Bioresource. Technol. 88: 55-60.

To, B.C. S. and Etzel, M. R. Spray drying, freeze drying, or freezing of three different lactic acid bacteria. J. Food. Sci. 63(3): 576-585.

van de Braak, K. 2002. Haemocytic defence in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Ph.D. Thesis, Wageningen University. Wageningen, Natherlands.

Vaseeharan, B. and Ramasamy, P. 2003. Control of pathogenic *Vibrio spp.* by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. J. Appl. Microbiol. 36: 83-87.

Verschuere, L. Rombaut, G., Sorgeloos, P. and Verstraete, W. 2000. Probiotic bacteria as biological control agent in aquaculture. Mcrobiol. Mol. Biol. R. 64: 655-671.

Vilijoen, B. C. 2001. The interaction between yeast and bacteria in dairy environments. Food Microbiol. 69: 37-44.

Villamil, L. Figueras, A., Planas, M. and Novoa, B. 2002. Control of *Vibrio alginolyticus* in artemia culture by treatment with bacterial probiotics. Aquaculture. 62: 1-14.

Wang, X., Li, H., Zhang, X., Li, Y., Ji, W. and Xu, H. 2000. Microbial flora in the digestive tract of adult penaeid shrimp (*Penaeus chinensis*). J. Ocean. Univ. Qingdao. 30: 493-498.

Wang, Y. C., Yu, R. C. and Chou, C. C. 2004. Viability of lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented soymilk after drying, subsequent rehydration and storage. Food. Microbiol. 93: 209-217.

Wang, Y. B., Xu, Z. R. and Xia, M. S. 2005. The effectiveness of commercial probiotic in northern white shrimp *Penaeus vannamei* ponds. Fisheries. Sci. 71: 1036-1041.

Westerdahl, A., Olsson, J., Kjelleberg, S.and Conway, P. 1991. Isolation and characterization of turbot (*Scophthalmus maximus*) associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*. Appl. Environ. Microbiol. 57: 2223-2228.

Zhao, G. and Zhang, G. 2005. Effect of protective agents, freezing temperature, rehydration media on viability of malolactic bacteria subjected to freeze-drying. J. Appl. Microbiol. 99: 333-338.

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

องค์ประกอบและการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Man Rogosa and Sharpe agar (MRS agar)

องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

Peptone	15 กรัม
Beef extract	10 กรัม
Yeast extract	8 กรัม
Dextrose	20 กรัม
Glucose	10 กรัม
Tween 80	1 กรัม
Ammonium citrate	2 กรัม
Sodium acetate	5 กรัม
Magnesium sulphate	0.1 กรัม
Manganess sulphate	0.05 กรัม
Dipotassium phosphate	2 กรัม
Agar	15 กรัม
Distilled water	1,000 มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ชั่งอาหารสำเร็จรูป 55.15 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร คนให้ส่วนผสมเข้ากันด้วย magnetic stirrer แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. Man Rogosa and Sharpe broth (MRS broth)

องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

Peptone	15 กรัม
Beef extract	10 กรัม
Yeast extract	8 กรัม
Dextrose	20 กรัม

Glucose	10	กรัม
Tween 80	1	กรัม
Ammonium citrate	2	กรัม
Sodium acetate	5	กรัม
Magnesium sulphate	0.1	กรัม
Manganess sulphate	0.05	กรัม
Dipotassium phosphate	2	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ชั่งอาหารสำเร็จรูป 55.15 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร คนให้ส่วนผสมเข้ากันด้วย magnetic stirrer แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. Yeast Mold Extract Agar (YM agar)

องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

Yeast extract	3	กรัม
Malt extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Glucose	10	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตร คนให้ส่วนผสมเข้ากันด้วย magnetic stirrer แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. Yeast Mold Extract Broth (YM broth)

องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

Yeast extract	3	กรัม
Malt extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Glucose	10	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตร คนให้ส่วนผสมเข้ากันด้วย magnetic stirrer แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5. Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose Agar (TCBS agar)

องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

Sucrose	20 กรัม
Sodium thiosulphate	10 กรัม
Sodium citrate	10 กรัม
Sodium chloride	10 กรัม
Yeast extract	5 กรัม
Casein peptone	5 กรัม
Malt peptone	5 กรัม
Ox bile	5 กรัม
Sodium cholate	3 กรัม
Ferric citrate	1 กรัม
Thymol blue	0.04 กรัม
Bromothymol blue	0.04 กรัม
Bacteriological agar	14 กรัม
Distilled water	1,000 มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ชั่งอาหารสำเร็จรูป 88 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร คนให้ส่วนผสมเข้ากันด้วย magnetic stirrer ต้มให้เดือดเป็นเวลา 15-30 นาที

6. Tryptic Soy Agar (TSA)

องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

Tryptone	15 กรัม
Soytone	50 กรัม
Sodium chloride	15 กรัม
Agar	15 กรัม
Distilled water	1,000 มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตร คนให้ส่วนผสมเข้ากันด้วย magnetic stirrer แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

7. Tryptic Soy Broth (TSB)

องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

Tryptone	15 กรัม
Soytone	50 กรัม
Sodium chloride	15 กรัม
Distilled water	1,000 มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตร คนให้ส่วนผสมเข้ากันด้วย magnetic stirrer แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

8. Plate Count Agar (PCA)

องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

Tryptone	5 กรัม
Yeast extract	2.5 กรัม
Glucose	1 กรัม
Agar	15 กรัม
Sodium chloride	15 กรัม
Distilled water	1,000 มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตร คนให้ส่วนผสมเข้ากันด้วย magnetic stirrer แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

9. Skim Milk agar

องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

สารละลาย Skim milk 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)	10 มิลลิลิตร
MRS agar (ที่ไม่เติม glucose)	990 มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

เตรียม MRS agar (โดยไม่ต้องเติม glucose) ที่มีส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร แต่เติมน้ำกลั่น 990 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที และเตรียมสารละลาย Skim milk 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 110 °C ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเทสารละลาย Skim milk ลงไปใน MRS agar ที่ปราศจากเชื้อ และผสมให้เข้ากัน และเทใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเชื้อ

10. Starch agar

องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

Peptone	15 กรัม
Beef extract	10 กรัม
Yeast extract	8 กรัม
Soluble starch	10 กรัม
Tween 80	1 กรัม
Ammonium citrate	2 กรัม
Sodium acetate	5 กรัม
Magnesium sulphate	0.1 กรัม
Manganess sulphate	0.05 กรัม
Dipotassium phosphate	2 กรัม
Agar	15 กรัม
Distilled water	1,000 มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตร คนให้ส่วนผสมเข้ากันด้วย magnetic stirrer แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

11. Tributyrine Agar

องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

Peptone	15 กรัม
Beef extract	10 กรัม
Yeast extract	8 กรัม

Tributyrine	10	กรัม
Tween 80	1	กรัม
Ammonium citrate	2	กรัม
Sodium acetate	5	กรัม
Magnesium sulphate	0.1	กรัม
Manganess sulphate	0.05	กรัม
Dipotassium phosphate	2	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตร คนให้ส่วนผสมเข้ากันด้วย magnetic stirrer แล้วนำไปผสมให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกันด้วย Homogenizer เป็นเวลา 10 นาที แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

วิธีวิเคราะห์

1. การเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์

1.1 เชื้อแบคทีเรียแลกติก

เขี่ยเชื้อจาก stock ที่เก็บในกลีเซอรอล 50 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส 1 loop streak ลงบนอาหาร MRS agar ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ แล้วบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อบริสุทธิ์ หลังจากนั้นเขี่ยเชื้อบริสุทธิ์จากอาหารแข็ง 1 loop ใส่ลงในอาหารเหลว MRS ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นถ่ายเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเหลว MRS ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร แล้วบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะเวลาที่เชื้อมีการเจริญถึงระยะปลาย exponential phase (ตารางที่ 10 ในภาคผนวก ค.) และดูดเชื้อจาก stock culture ปริมาตร 1เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเหลว MRS ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ แล้วบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งจะทำให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ 2.30-4.45x10^9 CFU ต่อมิลลิลิตร และนำเชื้อในระยะนี้มาใช้ในการทดลองต่อไป

1.2 เชื้อยีสต์ *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9

เขี่ยเชื้อจาก stock ที่เก็บในกลีเซอรอล 50 เปอร์เซ็นต์ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส 1 loop streak ลงบนอาหาร YM agar ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ แล้วบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อบริสุทธิ์ หลังจากนั้นเขี่ยเชื้อบริสุทธิ์จากอาหารแข็ง 1 loop ใส่ลงในอาหารเหลว YM ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที) หลังจากนั้นถ่ายเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ในอาหารเหลว YM ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร แล้วบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที) ซึ่งเป็นระยะเวลาที่เชื้อมีการเจริญถึงระยะ Stationary phase (ตารางที่ 11 และ 12 ในภาคผนวก ค.) และดูดเชื้อจาก stock culture ปริมาตร 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเหลว YM ที่มีโซเดียมคลอไรด์1.5 เปอร์เซ็นต์ แล้วบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที) ซึ่งจะทำให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ 1.25-3.50x10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร และนำเชื้อในระยะนี้มาใช้ในการทดลองต่อไป

1.3 เชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi*

เขี่ยเชื้อจาก stock ที่เก็บในกลีเซอรอล 50 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส 1 loop streak ลงบนอาหาร TSA agar ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ แล้วบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อบริสุทธิ์ หลังจากนั้นเขี่ยเชื้อบริสุทธิ์จากอาหารแข็ง 1 loop ใส่ลงในอาหารเหลว TSB ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง หลังจากนั้นถ่ายเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ในอาหารเหลว TSB ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร แล้วบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะเวลาที่เชื้อมีการเจริญถึงระยะ exponential phase (ตารางที่ 13 ภาคผนวก ค.) และดูดเชื้อจาก stock culture ปริมาตร 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเหลว TSA ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ แล้วบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ซึ่งจะทำให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ 1.10-1.51x10^8 CFU ต่อมิลลิลิตรและนำเชื้อในระยะนี้มาใช้ในการทดลองต่อไป

2. การตรวจนับเชื้อจุลินทรีย์

2.1 เชื้อแบคทีเรียแลกติก

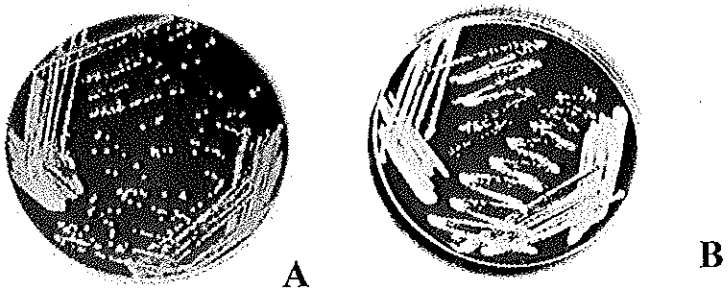
นำตัวอย่างมาเจือจางจนได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วย โซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ที่ปลอดเชื้อ แล้ว spread plate ลงบนอาหาร MRS agar ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ และ bromocresol purple 0.02 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนับโคโลนีทั้งหมดที่เปลี่ยนสีอาหาร MRS agar จากสีม่วงเป็นสีเหลือง ซึ่งเป็นลักษณะของแบคทีเรียแลกติก (ภาพที่ 26 ภาคผนวก ข.)

ภาพที่ 26 ลักษณะของ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 บนอาหาร MRS agar ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็น และ bromocresol purple 0.02 เปอร์เซ็นต์

Figure 26 Colony appearance of *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 on 0.02 % bromocresol purple and 1.5 % NaCl

2.2 เชื้อยีสต์ *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9

นำตัวอย่างมาเจือจางจนได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วย โซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ที่ปลอดเชื้อ แล้ว spread plate ลงบนอาหาร YM agar ที่มีโซเดียมคลอไรด์1.5 เปอร์เซ็นต์และ คลอแรมฟีนิคอล 0.001 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนับโคโลนีทั้งหมดที่มีลักษณะโคโลนีสีขาวด้าน ๆ ผิวหน้าด้าน ขอบหยักและมีขนาดประมาณ 0.2 มิลลิเมตร ซึ่งเป็นลักษณะของ *Candida tropicalis* TH112 ส่วนยีสต์ *Pseudozyma antarctica* TH9 จะมีลักษณะโคโลนีสีขาวขุ่น ๆ ผิวหน้าด้าน ขอบเรียบ และมีขนาดประมาณ 0.3 มิลลิเมตร (ภาพที่ 27 ภาคผนวก ข.)



ภาพที่ 27 ลักษณะของ *Pseudozyma antarctica* TH9 (A) และ *Candida tropicalis* TH112 (B) บนอาหาร YM agar ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ และ คลอแรมฟีนิคอล 0.001 เปอร์เซ็นต์

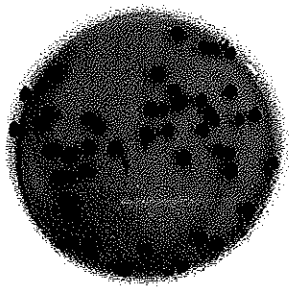
Figure 27 Colony appearances of *Pseudozyma antarctica* TH9 (A) and *Candida tropicalis* TH112 (B) on 0.001% chloramphinical and 1.5 % NaCl containing YM agar.

2.3 เชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi*

นำตัวอย่างมาเจือจางจนได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วย โซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ที่ปลอดเชื้อ แล้ว spread plate ลงบนอาหาร TCBS agar ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์แล้วนำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนับโคโลนีทั้งหมดที่มีลักษณะโคโลนีสีเขียวและมีขนาดประมาณ 0.3 มิลลิเมตร ซึ่งเป็นลักษณะของ *Vibrio harveyi* (ภาพที่ 8 ภาคผนวก ข.)

2.4 เชื้อแบคทีเรียทั้งหมด

นำตัวอย่างมาเจือจางจนได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยโซเดียมคลอไรด์0.85 เปอร์เซ็นต์ที่ปลอดเชื้อ แล้ว spread plate ลงบนอาหาร PCA agar ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนับโคโลนีทั้งหมดที่มีเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ



ภาพที่ 28 ลักษณะของ *Vibrio harveyi* บนอาหาร TCBS agar ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์

Figure 28 Colony appearance of *Vibrio harveyi* on 1.5 % NaCl containing TCBS agar

3. การทดสอบการเจริญของ *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9 และ *Vibrio harveyi* บนอาหาร MRS agar

เตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นของ *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9 และ *Vibrio harveyi* ตามวิธีวิเคราะห์ในข้อ 1.2 และ 1.3 ตามลำดับ หลังจากนั้นนำเชื้อแต่ละชนิดมาเจือจางจนได้ความเข้มข้นที่ 10^{-4}, 10^{-5} และ 10^{-6} ด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ที่ปลอดเชื้อ หลังจากนั้น spread เชื้อทั้ง 3 ชนิด บนอาหาร MRS agar ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ และ bromocresol purple 0.02 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ ตรวจสอบการเจริญของเชื้อทั้ง 3 ชนิดบนอาหาร MRS agar

4. การทดสอบการเจริญของ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 และ *Vibrio harveyi* บนอาหาร YM agar

เตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นของ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 และ *Vibrio harveyi* ตามวิธีวิเคราะห์ในข้อ 1.1 และ 1.3 ตามลำดับ หลังจากนั้นนำเชื้อแต่ละชนิดมาเจือจางจนได้ความเข้มข้นที่ 10^{-4}, 10^{-5} และ 10^{-6} ด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ที่ปลอดเชื้อ หลังจากนั้น spread เชื้อทั้ง 2 ชนิดบนอาหาร YM agar ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ และ คลอแรมฟินิคอล 0.001 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้น บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตามลำดับ ตรวจสอบการเจริญของ เชื้อทั้ง 2 ชนิดบนอาหาร YM agar

5. การทดสอบการเจริญของ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 บนอาหาร TCBS agar

เตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นของ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 ตามวิธีวิเคราะห์ในข้อ 1.1 และ 1.2 ตามลำดับ หลังจากนั้นนำเชื้อแต่ละชนิดมาเจือจางจนได้ความเข้มข้นที่ 10^{-4}, 10^{-5} และ 10^{-6} ด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ที่ปลอดเชื้อ หลังจากนั้น spread เชื้อทั้ง 3 ชนิด บนอาหาร TCBS agar ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตามลำดับ ตรวจสอบการเจริญของ เชื้อทั้ง 3 ชนิดบนอาหาร TCBS agar

6. การคำนวณหาอัตราการรอดชีวิตและการเจริญเติบโตของกุ้งขาว

$$\text{อัตราการรอดชีวิต (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{จำนวนกุ้งที่รอดชีวิตเมื่อสิ้นสุดการทดลอง}}{\text{จำนวนกุ้งทั้งหมดเมื่อเริ่มต้นการทดลอง}} \times 100$$

$$\text{น้ำหนักกุ้งเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{(\text{น้ำหนักกุ้งสุดท้าย} - \text{น้ำหนักกุ้งเริ่มต้น})}{\text{น้ำหนักกุ้งเริ่มต้น}} \times 100$$

$$\text{อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (feed conversion ratio)} = \frac{\text{น้ำหนักอาหารที่กุ้งกินทั้งหมด}}{\text{น้ำหนักกุ้งที่เพิ่มขึ้น}}$$

$$\text{น้ำหนักเฉลี่ย} = \frac{\text{น้ำหนักรวมทั้งหมดของกุ้งขาว}}{\text{จำนวนกุ้งทั้งหมด}}$$

7. การนับปริมาณเม็ดเลือดทั้งหมด (Total haemocyte count)

7.1 สารเคมี

Trypan blue 0.15 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดย ละลาย Trypan blue 0.15 กรัม ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ คนให้ละลายเข้ากัน (ใช้ magnetic stirrer) นาน 6-12 ชั่วโมง และกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 แบ่งใส่ในหลอดไมโครเซ็นติฟิวก์ (microcentrifuge tube) หลอดละ 0.45 มิลลิลิตร

7.2 วิธีการ

เก็บตัวอย่างเลือดกุ้ง (ใช้กุ้งขาวจำนวน 15 ตัว ชุดการทดลองละ 3 ตัวอย่าง) โดยใช้เข็มฉีดยาขนาด 1 ซีซี และหัวเข็มขนาด 25 G ความยาว 12 มิลลิเมตร เจาะเลือดจากโคนขาเดินคู่ที่ 3 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร นำเลือดกุ้งมาเจือจางในอัตราส่วน 1:10 ด้วยสารละลายไตรแพนบลู 1 เปอร์เซ็นต์ ที่เตรียมในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ นับจำนวนเม็ดเลือดโดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ คำนวณปริมาณเม็ดเลือดที่นับได้เป็นจำนวนเซลล์ ต่อลบ.มม. (Supamattaya *et al.*, 2000)

7.3 วิธีการนับเซลล์เม็ดเลือดโดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์

ปริมาตรของฮีมาไซโตมิเตอร์ = กว้าง x ยาว x สูง

= 1 mm x 1 mm x 0.1 mm

= 0.1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร (mm^3)

จำนวนเซลล์เม็ดเลือดต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร = เซลล์เม็ดเลือดที่นับได้

จำนวนเซลล์เม็ดเลือดต่อมิลลิลิตร = เซลล์เม็ดเลือดที่นับได้ x 10^4

8. การคำนวณอัตราการรอดชีวิตของเชื้อที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

การหาอัตราการรอดชีวิตของเชื้อหลังการทำแห้งทำได้โดยการตรวจนับปริมาณเชื้อก่อนและหลังการทำแห้ง ด้วยวิธีการตรวจนับเชื้อตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 2.1 และ 2.2 สำหรับ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 และ *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 ตามลำดับ หลังจากนั้นนำมาคำนวณหาอัตราการรอดชีวิตตามสมการข้างล่าง

$$\text{อัตราการรอดชีวิตของเชื้อหลังการทำแห้ง (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{(\text{ปริมาณเชื้อก่อนการทำแห้ง} - \text{ปริมาณเชื้อหลังการทำแห้ง})}{\text{ปริมาณเชื้อก่อนการทำแห้ง}} \times 100$$

9. การวิเคราะห์หาปริมาณความชื้น (AOAC, 1990)

9.1 วิธีการ

1. อบภาชนะสำหรับหาความชื้นในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบใส่ไว้ในโถดูดความชื้น ปล่อยทิ้งไว้จนอุณหภูมิของภาชนะเท่ากับอุณหภูมิห้องแล้วชั่งน้ำหนัก

2. ทำซ้ำข้อ 1 จนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัมและจดบันทึก

3. ชั่งตัวอย่างใส่ภาชนะหาความชื้นซึ่งทราบน้ำหนักและบันทึกน้ำหนักที่แน่นอนของภาชนะและตัวอย่าง

4. นำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-5 ชั่วโมงนำออกจากตู้อบใส่ไว้ในโถดูดความชื้น ปล่อยทิ้งไว้จนอุณหภูมิของภาชนะเท่ากับอุณหภูมิห้องแล้วชั่งน้ำหนัก

5. ชั่งน้ำหนักภาชนะและตัวอย่างหลังจากนั้นนำกลับไปอบในตู้อบและทำซ้ำเช่นเดิมจนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัมและจดบันทึก

9.2 วิธีการคำนวณ

$$\text{ปริมาณความชื้น (ร้อยละ)} = \frac{(\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ-น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ})}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ}} \times 100$$

ภาคผนวก ค

ผลการทดลอง

ตารางที่ 10 การเจริญของ *Lactobacillus plantarum* MRO 3.12 ที่ชั่วโมงต่าง ๆ

Table 10 Growth curve of *Lactobacillus plantarum* MRO 3.12

Hours	Log CFU/ml
0	5.27 ± 0.01
6	7.20 ± 0.01
12	8.63 ± 0.03
18	9.31 ± 0.01
24	9.75 ± 0.03
30	9.61 ± 0.07
36	9.46 ± 0.01
48	9.44 ± 0.01
72	8.38 ± 0.02

ตารางที่ 11 การเจริญของ *Candida tropicalis* TH112 ที่ชั่วโมงต่าง ๆ

Table 11 Growth curve of *Candida tropicalis* TH112

Hours	Log CFU/ml
0	5.74 ± 0.02
6	5.90 ± 0.02
12	5.93 ± 0.02
18	6.01 ± 0.03
24	6.40 ± 0.01
30	7.06 ± 0.02
36	8.22 ± 0.02
48	8.56 ± 0.07
72	8.68 ± 0.04

ตารางที่ 12 การเจริญของ *Pseudozyma antarctica* TH9 ที่ชั่วโมงต่าง ๆ

Table 12 Growth curve of *Pseudozyma antarctica* TH9

Hours	Log CFU/ml
0	5.21 ± 0.04
6	5.47 ± 0.01
12	5.68 ± 0.05
18	6.17 ± 0.02
24	6.42 ± 0.02
30	7.76 ± 0.01
36	8.38 ± 0.01
48	8.52 ± 0.04
72	8.64 ± 0.05

ตารางที่ 13 การเจริญของ *Vibrio harveyi* ที่ชั่วโมงต่าง ๆ

Table 13 Growth curve of *Vibrio harveyi*

Hours	Log CFU/ml
0	5.85 ± 0.04
6	5.95 ± 0.03
12	6.72 ± 0.03
18	8.36 ± 0.01
24	8.33 ± 0.02
30	6.58 ± 0.05
36	3.77 ± 0.03
48	2.84 ± 0.03
72	2.36 ± 0.05

ตารางที่ 14 ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเลี้ยงเชื้อร่วมกันของ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9 และ *Vibrio harveyi* เปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อเพียงชนิดเดียวของ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *C. tropicalis* TH112, *Pseudozyma Antarctica* TH9 และ *Vibrio harveyi*

Table 14 pH value of medium containing MRS, YM and TSB broth (1:1:1) during cultured with mixed culture of *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9 and *Vibrio harveyi* compared to control treatment (*Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9 and *Vibrio harveyi* alone).

	Time (hours)					
Treatments	0	6	12	18	24	48
Mixed culture	6.19	6.19	4.26	4.15	4.02	4.11
Vibrio harveyi alone	6.19	6.2	6.27	6.32	6.01	5.77
MRO3.12 alone	6.19	6.19	4.65	4.47	4.32	4.35
TH112 alone	6.19	6.19	5.08	4.89	4.55	4.38
TH9 alone	6.19	6.19	5.15	4.96	4.64	4.47

ตารางที่ 15 การเจริญของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9 และ *Vibrio harveyi* ที่เพาะเลี้ยงแบบเชื้อเดี่ยว และเพาะเลี้ยงร่วมกันในอาหารที่เป็นส่วนผสมของ MRS, YM และ TSB broth ในอัตราส่วน 1:1:1 และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีอากาศ

Table 15 Growth of *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 *Pseudozyma antarctica* TH9 and *Vibrio harveyi* in mixed-culture system compared to control treatment (*Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112, and *Pseudozyma antarctica* TH9 alone) in mixed medium containing MRS, YM and TSB broth (1:1:1) and incubated under aerobic condition at 30 degree celsius.

Isolates	**Microbial count (log CFU/ml)**					
	Time (hours)					
	0	**6**	**12**	**18**	**24**	**48**
Lactobacillus plantarum MRO3.12 alone	5.31 ± 0.03	7.32 ± 0.02	8.40 ± 0.01	9.49 ± 0.01	9.72 ± 0.05	9.38 ± 0.01
Candida tropicalis TH112 alone	5.72 ± 0.04	5.83 ± 0.02	5.88 ± 0.02	6.05 ± 0.04	6.37 ± 0.04	6.37 ± 0.01
Pseudozyma antarctica TH9 alone	5.19 ± 0.03	5.44 ± 0.02	5.72 ± 0.06	6.20 ± 0.02	6.36 ± 0.02	7.51 ± 0.02
Vibrio harveyi alone	5.82 ± 0.04	4.83 ± 0.23	6.78 ± 0.09	7.11 ± 0.07	6.39 ± 0.05	1.81 ± 0.07
Lactobacillus plantarum MRO3.12 in mixed culture	5.28 ± 0.04	7.76 ± 0.03	8.91 ± 0.18	9.66 ± 0.03	9.78 ± 0.03	9.40 ± 0.07
Candida tropicalis TH112 in mixed culture	5.70 ± 0.08	5.88 ± 0.02	5.75 ± 0.03	6.45 ± 0.04	5.92 ± 0.02	7.68 ± 0.03
Pseudozyma antarctica TH9 in mixed culture	5.18 ± 0.07	5.43 ± 0.05	5.72 ± 0.10	6.09 ± 0.09	5.79 ± 0.12	7.18 ± 0.02
Vibrio harveyi in mixed culture	5.17 ± 0.08	4.68 ± 0.06	4.87 ± 0.07	0	0	0

ตารางที่ 16 ปริมาณเชื้อ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH1112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 ในอาหารเลี้ยงกุ้งที่มีเชื้อ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ*Pseudozyma antarctica* TH9 เพียงอย่างเดียว และอาหารเลี้ยงกุ้งที่ผสมโปรไบโอติกของเชื้อทั้ง 3 ชนิด เมื่อเก็บรักษาไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

Table 16 Population of *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 and *Pseudozyma antarctica* TH9 in shrimp diet contained *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 and *Pseudozyma antarctica* TH9 alone and shrimp diet contained mixed probiotics of *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 *Candida tropicalis* TH112 and *Pseudozyma antarctica* TH9 when storage at 4 degree celsius for 3 days.

Isolates	**Microbial count (log CFU/ml)**			
	Time (days)			
	0	**1**	**2**	**3**
Lactobacillus plantarum MRO3.12 alone	8.46 ± 0.04	8.43 ± 0.03	8.39 ± 0.03	8.31 ± 0.03
Candida tropicalis TH112 alone	8.37 ± 0.06	8.34 ± 0.05	8.3 ± 0.06	8.16 ± 0.04
Pseudozyma antarctica TH9 alone	8.54 ± 0.06	8.50 ± 0.05	8.46 ± 0.04	8.33 ± 0.05
Lactobacillus plantarum MRO3.12 in mixed probiotics	8.56 ± 0.04	8.54 ± 0.03	8.51 ± 0.06	8.42 ± 0.05
Candida tropicalis TH112 in mixed probiotics	8.33 ± 0.06	8.3 ± 0.05	8.27 ± 0.06	8.1 ± 0.05
Pseudozyma antarctica TH9 in mixed probiotics	8.33 ± 0.04	8.28 ± 0.06	8.22 ± 0.05	8.07 ± 0.06

ตารางที่ 17 น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาวก่อนการทดลอง เปรียบเทียบกับกุ้งขาวหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ ด้วยอาหารที่ผสมและไม่ผสมโปรไบโอติก

Table 17 Mean weight of white shrimp before feeding trial (0 week) compared to after feeding trial (6 weeks) with shrimp diets contained probiotics and without probiotics.

Feed treatments	**Weight of white shrimp (g/ shrimp)**	
	Before feeding trial	**After 6 weeks feeding trial**
Lactobacillus plantarum MRO3.12	5.52 ± 0.35	9.84 ± 0.44
Candida tropicalis TH112	5.04 ± 0.11	9.52 ± 0.30
Pseudozyma antarctica TH9	5.04 ± 0.10	9.42 ± 0.38
Mixed probiotics	5.36 ± 0.20	10.08 ± 0.65
Without probiotic	5.42 ± 0.44	10.09 ± 0.84

ตารางที่ 18 ปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม *Lactobacillus plantalum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9, ชุดของเชื้อผสมทั้ง 3 ชนิด เปรียบเทียบกับกุ้งขาวชุดควบคุมที่ได้รับอาหารที่ไม่มีการเติมโปรไบโอติก

Table 18 Total haemocyte count of white shrimps before and after fed on diets contained *Lactobacillus plantalum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozym antarctica* TH9, mixed probiotics compared to control treatment (without porbiotic) at 6 week feeding trial.

Feed treatments	**Total heamocyte counts (log cells/ml)**	
	Time (weeks)	
	0	**6**
Lactobacillus plantarum MRO3.12	6.97 ± 0.23	$7.34 \pm 0.09^{ab*}$
Candida tropicalis TH112	6.97 ± 0.23	$7.22 \pm 0.06^{bc*}$
Pseudozyma antarctica TH9	6.97 ± 0.23	7.08 ± 0.06^{cd}
Mixed probiotics	6.97 ± 0.23	$7.40 \pm 0.07^{a*}$
Without probiotic	6.97 ± 0.23	6.91 ± 0.18^{d}

* mean Total heamocyte counts of white shrimps before and after trial in the same treatments are significantly different *($p<0.05$)*.

ตารางที่ 19 จำนวนแบคทีเรียแลกติก ยีสต์ *Vibrio* sp. และ แบคทีเรียทั้งหมด ในระบบทางเดินอาหารของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสม *Lactobacillus plantalum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9, โปรไบโอติกผสมทั้ง 3 ชนิด และ กุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่ไม่ผสมโปรไบโอติกที่ระยะเวลาการเลี้ยงที่ 6 สัปดาห์เปรียบเทียบกับกุ้งขาวชุดก่อนการทดลอง ตัวเลขที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ*(p<0.05)*

Table 19 Microbial counts in gastrointestinal tract of white shrimp fed on diets contained *Lactobacillus plantalum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9, mixed probiotics and control treatment (without porbiotic) at 6 week feeding trial compared to white shrimp before experimental (Samples were taken at the beginning of feed trial). Data (mean±SD.) with different letters in same column are significantly different *(p<0.05)* among treatments.

Feed treatments	**Microbial counts (log CFU/g gastrointestinal tract)**				
	Lactic acid bacteria	**Yeast**	***Vibrio* sp. (Yellow)**	***Vibrio* sp. (Green)**	**Total bacteria**
Before trial (0 week)	3.87 ± 0.12^{d}	3.68 ± 0.18^{d}	4.05 ± 0.12^{d}	3.65 ± 0.20^{d}	$8.26 \pm 0.05a^{b}$
Lactobacillus plantarum MRO3.12	5.82 ± 0.13^{b}	4.52 ± 0.16^{c}	5.49 ± 0.16^{b}	4.34 ± 0.09^{c}	7.72 ± 0.01^{c}
*Candida tropicalis*TH112	4.78 ± 0.10^{c}	7.12 ± 0.22^{a}	6.10 ± 0.05^{a}	4.17 ± 0.06^{c}	8.38 ± 0.21^{a}
Pseudozyma antarctica TH9	4.08 ± 0.24^{cd}	7.05 ± 0.05^{a}	5.50 ± 0.18^{b}	5.39 ± 0.16^{a}	7.47 ± 0.14^{d}
Mixed probiotics	7.07 ± 0.03^{a}	7.07 ± 0.14^{a}	5.37 ± 0.09^{b}	5.42 ± 0.08^{a}	8.41 ± 0.05^{a}
Without probiotic	4.16 ± 0.21^{cd}	5.22 ± 0.10^{b}	4.95 ± 0.06^{c}	4.73 ± 0.03^{b}	8.09 ± 0.02^{b}

ตารางที่ 20 อัตราการตายของกุ้งขาวเมื่อทดสอบการต้านทานเชื้อ *Vibrio harveyi* ที่ความเข้มข้น 4.8-7.61x10^7 CFU ต่อมิลลิลิตรด้วยการฉีด หลังจากการเลี้ยงด้วยอาหารผสม *Lactobacillus plantalum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9 และชุด โปรไบโอติกผสมทั้ง 3 ชนิด เปรียบเทียบ กับกุ้งขาวชุดควบคุมที่ได้รับอาหารที่ไม่ผสมโปรไบโอติก ที่ระยะเวลา การเลี้ยงที่ 6 สัปดาห์

Table 20 % mortality of white shrimp fed on diets contained *Lactobacillus plantalum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9, mixed probiotics compared to control treatment (without porbiotics) at 6 week feeding trial after challenged test by injected with cell suspension of *Vibrio harveyi* at the concentration 4.8-7.61 x10^7CFU/ml.

Feed treatments	**Mortality (%)**							
	Time (hours)							
	0	**3**	**6**	**9**	**12**	**15**	**18**	**21**
Lactobacillus plantarum MRO3.12	0	0	0	20 ± 0	20 ± 0	36.67 ± 5.77	36.67 ± 5.77	100
Candida tropicalis TH112	0	0	0	16.67 ± 11.50	16.67 ± 11.50	36.67 ± 11.50	36.67 ± 11.50	100
Pseudozyma antarctica TH9	0	0	0	23.33 ± 5.77	23.33 ± 5.77	43.33 ± 5.77	43.33 ± 5.77	100
Mixed probiotics	0	0	0	6.67 ± 5.77	6.67 ± 5.77	23.33 ± 5.77	23.33 ± 5.77	97.67 ± 5.77
Without probiotic	0	0	0	36.67 ± 5.77	36.67 ± 5.77	56.67 ± 5.77	56.67 ± 5.77	100
0.85 % NaCl	0	0	0	0	0	0	0	0

ตารางที่ 21 อัตราการตายของกุ้งขาวเมื่อทดสอบการต้านทานเชื้อ *Vibrio harveyi* ที่ความเข้มข้น 4.8-7.61x10^5 CFU ต่อมิลลิลิตรด้วยการฉีด หลังจากการเลี้ยงด้วยอาหารผสม *Lactobacillus plantalum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9 และโปรไบโอติกผสมทั้ง 3 ชนิด เปรียบเทียบกับกุ้งขาวชุดควบคุมที่ได้รับอาหารที่ไม่ผสมโปรไบโอติก ที่ระยะเวลาการเลี้ยงที่ 6 สัปดาห์

Table 21 % mortality of white shrimp fed on diets contained *Lactobacillus plantalum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9, mixed probiotics compared to control treatment (without porbiotic) at 6 week feeding trial after challenged test by injected with cell suspension of *Vibrio harveyi* at the concentration 4.8-7.61 x10^5CFU/ml.

Feed treatments	**Mortality (%)**									
	Time (days)									
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
MRO3.12	3.33	6.67	6.67	16.67 ± 5.77	16.67 ± 5.77	20	20	23.33 ± 5.77	26.67 ± 11.50	26.67 ± 11.50
TH112	10	20	30	40	43.33 ± 5.77	43.33 ± 5.77	50	56.67 ± 5.77	56.67 ± 5.77	56.67 ± 5.77
TH9	13.33 ± 5.77	30	33.23 ± 5.77	46.67 ± 11.50	46.67 ± 11.50	46.67 ± 11.50	46.67 ± 11.50	66.67 ± 11.50	66.67 ± 11.50	66.67 ± 11.50
Mixed probiotics	3.33	6.67	13.33 ± 5.77	16.67 ± 5.77	16.67 ± 5.77	16.67 ± 5.77	16.67 ± 5.77	16.67 ± 5.77	16.67 ± 5.77	16.67 ± 5.77
Without probiotic	13.33 ± 5.77	13.33 ± 5.77	13.33 ± 5.77	23.33 ± 5.77	26.67 ± 5.77	26.67 ± 5.77	30	33.23 ± 5.77	33.23 ± 5.77	33.23 ± 5.77
0.85 % NaCl	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

ตารางที่ 22 อัตราการตายของกุ้งขาวเมื่อทดสอบการต้านทานเชื้อ *Vibrio harveyi* ที่ความเข้มข้น 4.8-7.61x10^7 CFU ต่อมิลลิลิตร ด้วยการแช่ หลังจากการเลี้ยงด้วย อาหารผสม *Lactobacillus plantalum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9 และ โปรไบโอติกผสมทั้ง 3 ชนิด เปรียบเทียบกับกุ้งขาวชุดควบคุมที่ได้รับอาหารที่ไม่มีการเติมโปรไบโอติก ที่ระยะเวลาการเลี้ยงที่ 6 สัปดาห์

Table 22 % mortality of white shrimp fed on diets contained *Lactobacillus plantalum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9, mixed probiotics compared to control treatment (without porbiotic) at 6 week feeding trial after challenged test by immersed with cell suspension of *Vibrio harveyi* at the concentration 4.8-7.61 x10^7CFU/ml.

Feed treatments	**Mortality (%)**										
	Time (days)										
	0	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
Lactobacillus plantarum MRO3.12	0	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80
Candida tropicalis TH112	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Pseudozyma antarctica TH9	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Mixed probiotics	0	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Without probiotic	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
0.85 % NaCl	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

ตารางที่ 23 การคงอยู่ของแบคทีเรียแลกติก และ ยีสต์ ในระบบทางเดินอาหารของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสม *Lactobacillus plantalum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9, โปรไบโอติกผสมทั้ง 3 ชนิด และ กุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่ไม่ผสมโปรไบโอติก แล้วหยุดให้และเปลี่ยนเป็นอาหารเม็ดธรรมดาที่ไม่ผสมโปรไบโอติกเป็นเวลา 0, 1, 3 และ 7 วัน ตัวเลขที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *($p<0.05$)*

Table 23 Population of lactic acid bacteria and yeast in white shrimp fed on diets contained *Lactobacillus plantalum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112, *Pseudozyma antarctica* TH9, mixed probiotics and control treatment (without probiotic) after fed with ordinary commercial feed at 0, 1, 3 and 7 day. Data (mean±SD.) with different letters are significantly different *($p<0.05$)* among treatments.

Feed treatments	Bacterial Groups (log CFU/g)							
	Lactic acid bacteria				Yeast			
	0 day	1 day	3 day	7 day	0 day	1 day	3 day	7 day
Lactobacillus plantarum MRO3.12	8.34 ± 0.04^{a}	5.68 ± 0.11^{b}	5.47 ± 0.09^{c}	4.69 ± 0.02^{d}	4.28 ± 0.30^{a}	4.45 ± 0.10^{a}	4.18 ± 0.05^{a}	3.75 ± 0.28^{b}
*Candida tropicalis*TH112	2.92 ± 0.17^{a}	2.98 ± 0.28^{a}	3.26 ± 0.38^{a}	2.82^{a}	6.5 ± 0.77^{a}	6.9 ± 0.05^{a}	6.2 ± 0.03^{ab}	5.58 ± 0.02^{b}
Pseudozyma antarctica TH9	3.26 ± 0.43^{a}	3.02 ± 0.17^{a}	3.59 ± 0.43^{a}	2.92 ± 0.28^{a}	5.93 ± 0.05^{a}	6.88 ± 0.06^{a}	5.82 ± 0.05^{b}	5.36 ± 0.10^{c}
Mixed probiotics	6.49 ± 0.03^{a}	4.82 ± 0.11^{b}	4.34 ± 0.08^{c}	3.72 ± 0.19^{d}	7.07 ± 0.14^{a}	6.88 ± 0.06^{b}	5.13 ± 0.03^{c}	5.04 ± 0.07^{c}
Without probiotic	4.03 ± 0.11^{a}	3.81 ± 0.20^{a}	3.48 ± 0.12^{b}	2.92 ± 0.17^{c}	4.79 ± 0.08^{a}	4.43 ± 0.02^{b}	4.35 ± 0.05^{b}	4.08 ± 0.26^{c}

ตารางที่ 24 ผลของการใช้สารตัวกลางต่อการรอดชีวิตของ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 จากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ตัวเลขที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

Table 24 Effects of protective agents on survival of *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 and *Pseudozyma antarctica* TH9 after freeze-drying. Data (mean±SD.) with different letters are significantly differ among treatments.

Strains	Protective agents	Population (CFU/ml)		Survival (%)
		Before freeze dry	After freeze dry	
Lactobacillus plantarum MRO3.12	20% Skim milk powder (SKM)	$1.30x10^8$	$8.32x10^7$	63.81 ± 6.29^a
	20% Talcum (Tal)	$5.64x10^8$	$6.00x10^7$	10.64 ± 3.43^c
	20% Zeolite (Zeo)	$4.00x10^8$	$2.97x10^7$	7.42 ± 1.07^{cd}
	20% Calcium carbonate ($CaCO_3$)	$3.97x10^8$	$7.98x10^7$	20.13 ± 2.20^c
	10% SKM + 10% Tal	$9.15x10^8$	$3.99x10^7$	4.36 ± 1.15^d
	10% SKM + 10% Zeo	$2.76x10^8$	$1.08x10^8$	39.11 ± 13.68^b
	10% SKM + 10% $CaCo_3$	$8.20x10^8$	$3.18x10^7$	3.88 ± 1.64^d
Candida tropicalis TH112	20% Skim milk powder (SKM)	$1.47x10^8$	$1.08x10^8$	73.13 ± 9.06^a
	20% Talcum (Tal)	$1.85x10^8$	$8.00x10^7$	43.32 ± 6.47^{bc}
	20% Zeolite (Zeo)	$4.26x10^8$	$6.38x10^7$	14.98 ± 0.82^d
	20% Calcium carbonate ($CaCO_3$)	$1.80x10^8$	$1.25x10^8$	69.29 ± 11.77^a
	10% SKM + 10% Tal	$5.25x10^8$	$1.47x10^8$	27.92 ± 8.18^c
	10% SKM + 10% Zeo	$4.43x10^8$	$2.23x10^8$	50.30 ± 13.18^b
	10% SKM + 10% $CaCo_3$	$2.18x10^8$	$1.07x10^8$	49.08 ± 12.71^b
Pseudozyma antarctica TH9	20% Skim milk powder (SKM)	$4.47x10^8$	$1.61x10^8$	36.04 ± 2.81a
	20% Talcum (Tal)	$2.25x10^8$	$7.27x10^7$	32.30 ± 13.31^a
	20% Zeolite (Zeo)	$4.87x10^8$	$1.75x10^8$	35.93 ± 12.03^a
	20% Calcium carbonate ($CaCO_3$)	$2.13x10^8$	$6.73x10^7$	31.61 ± 10.85^a
	10% SKM + 10% Tal	$2.85x10^8$	$5.38x10^7$	18.89 ± 4.60^b
	10% SKM + 10% Zeo	$6.85x10^8$	$5.38x10^7$	7.86 ± 1.21^c
	10% SKM + 10% $CaCo_3$	$4.30x10^8$	$9.28x10^7$	21.61 ± 6.19^{abc}

ตารางที่ 25 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งโดยใช้ นมผงพร่องมันเนย 20 เปอร์เซ็นต์เป็นสารตัวกลางในการป้องกันเซลล์ของ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 และ *Pseudozyma antarctica* TH9 ที่เจริญในอาหารที่มีสารพยุงชนิดต่าง ๆ ตัวเลขที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *($p<0.05$)*

Table 25 Effects of different protective agents which mixed 2% (w/v) into media broth on survival of *Lactobacillus plantarum* MRO3.12, *Candida tropicalis* TH112 and *Pseudozyma antarctica* TH9 after freeze-drying. Data (mean±SD.) with different letters are significantly different *($p<0.05$)* among treatments.

Treatments	**Survival (%)**		
	***Lactobacillus plantarum* MRO3.12**	***Candida tropicalis* TH112**	***Pseudozyma antarctica* TH9**
Control	64.06 ± 6.16^{a}	60.75 ± 4.35^{a}	56.96 ± 4.89^{a}
Talcum	52.42 ± 1.82^{b}	61.84 ± 3.98^{a}	36.59 ± 2.03^{c}
Zeolite	60.95 ± 2.29^{ab}	50.94 ± 5.91^{b}	45.52 ± 3.90^{b}
Calcium carbonate	39.41 ± 1.31^{c}	51.75 ± 2.41^{b}	38.59 ± 2.30^{c}

ตารางที่ 26 ปริมาณ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 ที่เจริญในอาหารที่มีซีโอไลท์เป็นสารพยุงและไม่มีสารพยุง จากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งโดยมีนมผงพร่องมันเนย 20 เปอร์เซ็นต์เป็นสารตัวกลาง และ การเก็บรักษาที่สภาวะต่าง ๆ

Table 26 Viable population of freeze drying *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 grown in zeolite containing MRS broth and without zeolite stored in vacuum and no vacuum packages under 4°C and room temperature for 8 weeks.

Storage Conditions	Storage Time (weeks)	Viable population (log CFU/g)	
		With 2% zeolite	Without 2% zeolite
No Vacuum, Room temp	After freeze drying	8.80 ± 0.04	8.78 ± 0.16
	2	8.22 ± 0.11	8.07 ± 0.22
	4	7.94 ± 0.30	8.08 ± 0.10
	6	7.99 ± 0.17	7.99 ± 0.04
	8	7.33 ± 0.16	7.62 ± 0.33
Vacuum, Room temp	After freeze drying	8.80 ± 0.04	8.78 ± 0.16
	2	8.55 ± 0.19	8.53 ± 0.07
	4	7.97 ± 0.30	8.14 ± 0.44
	6	7.75 ± 0.40	8.22 ± 0.06
	8	7.57 ± 0.33	8.19 ± 0.03
No Vacuum, 4 °C	After freeze drying	8.80 ± 0.04	8.78 ± 0.16
	2	8.66 ± 0.03	8.71 ± 0.23
	4	8.44 ± 0.28	8.57 ± 0.03
	6	8.49 ± 0.18	8.29 ± 0.16
	8	8.22 ± 0.11	8.16 ± 0.03
Vacuum, 4 °C	After freeze drying	8.80 ± 0.04	8.78 ± 0.16
	2	8.68 ± 0.23	8.65 ± 0.10
	4	8.63 ± 0.12	8.48 ± 0.25
	6	8.55 ± 0.16	8.49 ± 0.11
	8	8.55 ± 0.03	8.52 ± 0.10

ตารางที่ 27 ปริมาณเชื้อที่ลดลงของ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 ที่เจริญในอาหารที่มีซีโอไลท์เป็นสารพยุง และไม่มีสารพยุง จากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งโดยมีนมผงพร่องมันเนย 20 เปอร์เซ็นต์เป็นสารตัวกลาง และ การเก็บรักษาที่สภาวะต่าง ๆ

Table 27 Decrease in viable population of freeze drying *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 grown in zeolite containing MRS broth and without zeolite stored in vacuum and no vacuum packages under 4°C and room temperature for 8 weeks.

Storage Conditions	Storage Time (weeks)	Decrease in viable population (log CFU/g)		Sig.(2-tailed)
		With 2% zeolite	Without 2% zeolite	
No Vacuum, Room temp	2	0.58 ± 0.05^{Aa}	0.71 ± 0.23^{Aa}	0.503
	4	0.86 ± 0.27^{Aa}	0.69 ± 0.13^{Aa}	0.375
	6	0.81 ± 0.15^{Aa}	0.79 ± 0.12^{ABa}	0.681
	8	1.47 ± 0.14^{Ba}	1.16 ± 0.33^{Ba}	0.336
Vacuum, Room temp	2	0.23 ± 0.02^{Ab}	0.25 ± 0.05^{Ab}	1.000
	4	0.83 ± 0.32^{Ba}	0.63 ± 0.27^{Bab}	0.491
	6	1.05 ± 0.38^{Ba}	0.56 ± 0.15^{ABab}	0.124
	8	1.23 ± 0.37^{Ba}	0.59 ± 0.19^{ABb}	0.183
No Vacuum, 4 °C	2	0.14 ± 0.03^{Ac}	$0.07 \pm 0.02^{*Ab}$	0.026
	4	0.19 ± 0.06^{ABb}	$0.21 \pm 0.06^{*Ac}$	0.027
	6	0.31 ± 0.17^{Bb}	0.48 ± 0.15^{Bc}	0.109
	8	0.58 ± 0.08^{Cb}	0.62 ± 0.14^{Bb}	0.731
Vacuum, 4 °C	2	0.12 ± 0.02^{Ac}	0.08 ± 0.01^{Ab}	0.039
	4	0.17 ± 0.08^{ABb}	0.39 ± 0.18^{Abc}	0.502
	6	0.25 ± 0.03^{Bb}	0.21 ± 0.06^{Abc}	0.774
	8	0.25 ± 0.03^{Bb}	0.26 ± 0.03^{Ab}	0.816

* significantly different between zeolite containing MRS broth and without zeolite, *t*- test *($p<0.05$)*

Different uppercase letters are significantly different *($p<0.05$)* during storage time.

Different lowercase letters are significantly different *($p<0.05$)* among storage conditions.

ตารางที่ 28 ปริมาณความชื้นของ *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 ในอาหารที่มีซีโอไลท์เป็นสารพยุง และไม่มีสารพยุง จากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งโดยมีนมผงพร่องมันเนย 20 เปอร์เซ็นต์เป็นสารตัวกลาง และ การเก็บรักษาที่สภาวะต่าง ๆ ที่ 8 สัปดาห์

Table 28 Moisture content of freeze drying *Lactobacillus plantarum* MRO3.12 grown in zeolite containing MRS broth and without zeolite stored in vacuum and no vacuum packages under 4°C and room temperature for 8 weeks.

Storage Conditions	Storage Time (weeks)	Moisture content (%)		Sig.(2-tailed)
		With 2% zeolite	Without 2% zeolite	
No Vacuum Room temp	2	4.74 ± 0.41^{Ba}	4.94 ± 0.73^{Aa}	0.632
	4	6.30 ± 0.56^{Bb}	7.68 ± 0.86^{Bb}	0.016
	6	10.26 ± 1.70^{Bc}	$12.85 \pm 1.47^{*Bc}$	0.012
	8	14.00 ± 0.54^{Ad}	14.11 ± 1.32^{Bc}	0.924
Vacuum Room temp	2	4.25 ± 0.48^{Ba}	$4.85 \pm 0.47^{*Aa}$	0.001
	4	5.87 ± 0.44^{Bb}	6.83 ± 0.74^{Bb}	0.268
	6	9.44 ± 0.85^{Bc}	12.01 ± 1.00^{Bc}	0.131
	8	11.50 ± 0.32^{Bd}	$12.09 \pm 1.05^{*Ac}$	0.015
No Vacuum 4 degree Celsius	2	3.12 ± 0.37^{Aa}	4.22 ± 0.52^{Aa}	0.106
	4	4.05 ± 0.58^{Ab}	$4.98 \pm 0.41^{*Aa}$	0.011
	6	5.33 ± 0.38^{Ab}	8.96 ± 1.74^{Ab}	0.083
	8	6.22 ± 0.11^{Ad}	11.34 ± 1.01^{Ac}	0.297
Vacuum 4 degree Celsius	2	3.08 ± 0.44^{Aa}	$4.17 \pm 0.73^{*Aa}$	0.024
	4	3.78 ± 0.33^{Aab}	4.63 ± 0.49^{Aa}	0.095
	6	4.50 ± 0.36^{Ab}	$8.26 \pm 0.91^{*Ab}$	0.023
	8	5.20 ± 0.91^{Abc}	$10.25 \pm 0.26^{*Ac}$	0.017

* significantly different between zeolite containing MRS broth and without zeolite, *t*- test *($p<0.05$)*

Different uppercase letters are significantly different *($p<0.05$)* during storage time.

Ddifferent lowercase letters are significantly different *($p<0.05$)* among storage conditions.

ตารางที่ 29 ปริมาณ *Candida tropicalis* TH112 ที่เจริญในอาหารที่มีทัลคัมเป็นสารพยุง และไม่มีสารพยุงจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งโดยมีนมผงพร่องมันเนย 20 เปอร์เซ็นต์เป็นสารตัวกลาง และ การเก็บรักษาที่สภาวะต่าง ๆ

Table 29 Viable population of freeze drying *Candida tropicalis* TH112 grown in zeolite containing MRS broth and without talcum stored in vacuum and no vacuum packages under 4°C and room temperature for 8 weeks.

Storage Conditions	Storage Time (weeks)	Viable population (log CFU/g)	
		With 2% talcum	Without 2% talcum
No Vacuum, Room temp	After freeze drying	8.63 ± 0.12	9.00 ± 0.19
	2	7.37 ± 0.16	7.58 ± 0.05
	4	6.82 ± 0.33	7.43 ± 0.01
	6	6.55 ± 0.20	7.00 ± 0.38
	8	6.26 ± 0.39	6.35 ± 0.12
Vacuum, Room temp	After freeze drying	8.63 ± 0.12	9.00 ± 0.19
	2	7.59 ± 0.10	8.00 ± 0.11
	4	7.17 ± 0.04	7.58 ± 0.20
	6	6.80 ± 0.42	6.98 ± 0.13
	8	6.24 ± 0.51	6.60 ± 0.26
No Vacuum, 4 °C	After freeze drying	8.63 ± 0.12	9.00 ± 0.19
	2	8.47 ± 0.14	8.67 ± 0.13
	4	8.45 ± 0.16	8.56 ± 0.07
	6	8.14 ± 0.26	8.42 ± 0.08
	8	8.14 ± 0.11	8.47 ± 0.08
Vacuum, 4 °C	After freeze drying	8.63 ± 0.12	9.00 ± 0.19
	2	8.36 ± 0.26	8.69 ± 0.04
	4	8.28 ± 0.10	8.41 ± 0.15
	6	8.23 ± 0.18	8.47 ± 0.06
	8	8.10 ± 0.21	8.39 ± 0.15

ตารางที่ 30 ปริมาณเชื้อที่ลดลงของ *Candida tropicalis* TH112 ที่เจริญในอาหารที่มีทัลคัมเป็นสารพยุง และไม่มีสารพยุง จากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งโดยมีนมผงพร่องมันเนย 20 เปอร์เซ็นต์เป็นสารตัวกลาง และ การเก็บรักษาที่สภาวะต่าง ๆ

Table 30 Decrease in viable population of freeze drying *Candida tropicalis* TH112 grown in zeolite containing MRS broth and without talcum stored in vacuum and no vacuum packages under 4°C and room temperature for 8 weeks.

Storage Conditions	Storage Time (weeks)	Viable population (logCFU/ml)		Sig.(2-tailed)
		With 2% talcum	Without 2% talcum	
No Vacuum, Room temp	2	1.25 ± 0.05^{Aa}	1.41 ± 0.15^{Aa}	0.291
	4	1.81 ± 0.22^{ABa}	1.57 ± 0.20^{ABa}	0.390
	6	2.08 ± 0.32^{Ba}	1.99 ± 0.49^{Ba}	0.515
	8	2.37 ± 0.45^{Ba}	2.65 ± 0.07^{Ca}	0.336
Vacuum, Room temp	2	1.03 ± 0.12^{Ab}	1.00 ± 0.26^{Ab}	0.758
	4	1.46 ± 0.16^{Ab}	1.41 ± 0.33^{ABa}	0.844
	6	1.82 ± 0.54^{ABa}	2.02 ± 0.20^{BCb}	0.470
	8	2.39 ± 0.58^{Ba}	2.40 ± 0.45^{Cb}	0.851
No Vacuum, 4 °C	2	0.09 ± 0.01^{Ad}	$0.32 \pm 0.09^{*Ac}$	0.048
	4	0.18 ± 0.06^{Ac}	$0.43 \pm 0.06^{*ABb}$	0.011
	6	0.49 ± 0.08^{Bb}	0.58 ± 0.07^{BCb}	0.065
	8	0.49 ± 0.08^{Bb}	0.53 ± 0.05^{Cb}	0.339
Vacuum, 4 °C	2	0.26 ± 0.09^{Ac}	0.29 ± 0.04^{Ac}	0.108
	4	0.35 ± 0.13^{Ac}	$0.58 \pm 0.07^{*Bb}$	0.037
	6	0.40 ± 0.08^{ABb}	0.48 ± 0.11^{Bb}	0.318
	8	0.53 ± 0.05^{Bb}	0.61 ± 0.22^{Bb}	0.527

* significantly different between talcum containing YM broth and without talcum, *t*- test *($p<0.05$)*

Different uppercase letters are significantly different *($p<0.05$)* during storage time.

Different lowercase letters are significantly different *($p<0.05$)* among storage conditions.

ตารางที่ 31 ปริมาณความชื้นของ *Candida tropicalis* TH112 ในอาหารที่มีทัลคัมเป็นสารพยุง และไม่มีสารพยุง จากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งโดยมีนมผงพร่องมันเนย 20 เปอร์เซ็นต์เป็นสารตัวกลาง และ การเก็บรักษาที่สภาวะต่าง ๆ ที่ 8 สัปดาห์

Table 31 Moisture content of freeze drying *Candida tropicalis* TH112 grown in talcum containing YM broth and without talcum stored in vacuum and no vacuum packages under 4°C and room temperature for 8 weeks.

Storage Conditions	Storage Time (weeks)	Moisture content (%)		Sig.(2-tailed)
		With 2% talcum	Without 2% talcum	
No Vacuum Room temp	2	4.61 ± 0.57^{Ba}	6.38 ± 0.97^{Ca}	0.176
	4	5.92 ± 0.3^{Cb}	6.22 ± 0.44^{Ba}	0.513
	6	8.33 ± 0.18^{Dc}	$10.32 \pm 0.34^{*Cb}$	0.015
	8	10.30 ± 0.24^{Cd}	$12.74 \pm 0.20^{*Cb}$	0.011
Vacuum Room temp	2	3.34 ± 0.7^{Aa}	$4.88 \pm 0.54^{*Ba}$	0.030
	4	4.69 ± 0.89^{Bb}	6.00 ± 0.61^{Bb}	0.158
	6	7.44 ± 0.35^{Cc}	$9.46 \pm 0.36^{*Cc}$	0.035
	8	9.91 ± 0.33^{Cd}	$11.52 \pm 0.33^{*Bd}$	0.003
No Vacuum 4 degree Celsius	2	2.56 ± 0.78^{Aa}	3.6 ± 0.37^{Aa}	0.192
	4	3.2 ± 0.16^{Aa}	$4.48 \pm 0.48^{*Aa}$	0.026
	6	4.61 ± 0.47^{Bb}	7.62 ± 0.83^{Bb}	0.056
	8	6.31 ± 0.52^{Bc}	7.96 ± 0.49^{Ab}	1.000
Vacuum 4 degree Celsius	2	2.74 ± 0.43^{Aa}	$3.25 \pm 0.45^{*Aa}$	0.025
	4	2.80 ± 0.93^{Aa}	3.88 ± 0.33^{Ab}	0.246
	6	3.25 ± 0.32^{Aa}	$5.25 \pm 0.14^{*Ac}$	0.012
	8	5.52 ± 0.37^{Ab}	$7.47 \pm 0.19^{*Ad}$	0.026

* significantly different between zeolite containing YM broth and without zeolite, *t*- test *($p<0.05$)*

Different uppercase letters are significantly different *($p<0.05$)* during storage time.

Ddifferent lowercase letters are significantly different *($p<0.05$)* among storage conditions.

ตารางที่ 32 ปริมาณ *Pseudozyma antarctica* TH9 ที่เจริญในอาหารที่มีซีโอไลท์เป็นสารพยุง และไม่มีสารพยุงจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งโดยมีนมผงพร่องมันเนย 20 เปอร์เซ็นต์เป็น สารตัวกลาง และ การเก็บรักษาที่สภาวะต่าง ๆ

Table 32 Viable population of freeze drying *Pseudozyma antarctica* TH9 grown in zeolite containing YM broth and without zeolite stored in vacuum and no vacuum packages under 4°C and room temperature for 8 weeks.

Storage Conditions	Storage Time (weeks)	Viable population (log CFU/g)	
		With 2% zeolite	Without 2% zeolite
No Vacuum, Room temp	After freeze drying	8.49 ± 0.38	8.46 ± 0.13
	2	7.61 ± 0.23	7.85 ± 0.09
	4	6.92 ± 0.12	7.07 ± 0.03
	6	6.34 ± 0.25	6.61 ± 0.04
	8	5.94 ± 0.18	6.55 ± 0.10
Vacuum, Room temp	After freeze drying	8.49 ± 0.38	8.46 ± 0.13
	2	7.51 ± 0.63	8.25 ± 0.12
	4	6.44 ± 0.02	7.64 ± 0.12
	6	6.63 ± 0.12	7.05 ± 0.98
	8	5.80 ± 0.42	7.10 ± 0.07
No Vacuum, 4 °C	After freeze drying	8.49 ± 0.38	8.46 ± 0.13
	2	7.91 ± 0.04	8.22 ± 0.28
	4	7.83 ± 0.10	8.12 ± 0.16
	6	7.81 ± 0.08	8.05 ± 0.30
	8	7.62 ± 0.15	8.12 ± 0.21
Vacuum, 4 °C	After freeze drying	8.49 ± 0.38	8.46 ± 0.13
	2	8.23 ± 0.18	8.25 ± 0.55
	4	8.17 ± 0.23	7.97 ± 0.15
	6	8.13 ± 0.05	7.99 ± 0.15
	8	8.08 ± 0.10	7.52 ± 0.07

ตารางที่ 33 ปริมาณเชื้อที่ลดลงของ *Pseudozyma antarctica* TH9 ที่เจริญในอาหารที่มีซีโอไลท์เป็นสารพยุง และไม่มีสารพยุง จากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งโดยมีนมผงพร่องมันเนย 20 เปอร์เซ็นต์เป็นสารตัวกลาง และ การเก็บรักษาที่สภาวะต่าง ๆ

Table 33 Decrease in viable population of freeze drying *Pseudozyma antarctica* TH9 grown in zeolite containing YM broth and without zeolite stored in vacuum and no vacuum packages under 4°C and room temperature for 8 weeks.

Storage Conditions	Storage Time (weeks)	Viable population (logCFU/ml)		Sig.(2-tailed)
		With 2% Zeolite	Without 2% zeolite	
No Vacuum, Room temp	2	0.88 ± 0.09^{Aa}	0.61 ± 0.18^{Aa}	0.080
	4	1.58 ± 0.31^{ABa}	1.39 ± 0.16^{ABa}	0.506
	6	2.15 ± 0.60^{Ba}	1.85 ± 0.09^{Ba}	0.516
	8	2.55 ± 0.22^{Ba}	1.91 ± 0.23^{Ca}	0.112
Vacuum, Room temp	2	0.99 ± 0.16^{Ab}	$0.21 \pm 0.09^{*Ab}$	0.004
	4	2.06 ± 0.39^{Ab}	$0.82 \pm 0.02^{*ABa}$	0.035
	6	1.86 ± 0.47^{ABa}	1.41 ± 0.31^{BCa}	0.237
	8	2.69 ± 0.80^{Bb}	1.36 ± 0.11^{Ca}	0.126
No Vacuum, 4 °C	2	0.58 ± 0.08^{Ad}	0.22 ± 0.16^{Ac}	0.053
	4	0.66 ± 0.11^{Ac}	$0.34 \pm 0.08^{*ABb}$	0.018
	6	0.68 ± 0.16^{Bb}	0.41 ± 0.03^{BCb}	0.077
	8	0.87 ± 0.12^{Bb}	0.34 ± 0.15^{Bc}	0.081
Vacuum, 4 °C	2	0.26 ± 0.09^{Ac}	0.35 ± 0.17^{Ac}	0.539
	4	0.32 ± 0.14^{Ac}	$0.49 \pm 0.16^{*Bb}$	0.005
	6	0.36 ± 0.06^{ABb}	0.47 ± 0.08^{Bb}	0.050
	8	0.41 ± 0.12^{Bb}	0.94 ± 0.10^{Bb}	0.055

* significantly different between zeolite containing YM broth and without zeolite, *t*- test *($p<0.05$)*

Different uppercase letters are significantly different *($p<0.05$)* during storage time.

Ddifferent lowercase letters are significantly different *($p<0.05$)* among storage conditions.

ตารางที่ 34 ปริมาณความชื้นของ *Pseudozyma antarctica* TH112 ในอาหารที่มีซีโอไลท์เป็นสารพยุง และไม่มีสารพยุง จากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งโดยมีนมผงพร่องมันเนย 20 เปอร์เซ็นต์เป็นสารตัวกลาง และ การเก็บรักษาที่สภาวะต่าง ๆ ที่ 8 สัปดาห์

Table 34 Moisture content of freeze drying *Pseudozyma antarctica* TH112 grown in talcum containing YM broth and without zeolite stored in vacuum and no vacuum packages under 4°C and room temperature for 8 weeks.

Storage Conditions	Storage Time (weeks)	Moisture content (%)		Sig.(2-tailed)
		With 2% zeolite	Without 2% zeolite	
No Vacuum Room temp	2	5.23 ± 0.98^{Ba}	6.65 ± 0.80^{Ca}	0.268
	4	5.32 ± 0.66^{Ba}	$8.98 \pm 0.72^{*Cb}$	0.044
	6	6.31 ± 1.06^{Cab}	$9.30 \pm 0.38^{*Bb}$	0.030
	8	7.25 ± 0.60^{Cb}	$9.43 \pm 0.26^{*Cb}$	0.047
Vacuum Room temp	2	4.62 ± 0.26^{Ba}	$5.76 \pm 0.47^{*BCa}$	0.020
	4	4.70 ± 0.79^{Ba}	5.96 ± 0.59^{Ba}	0.256
	6	4.93 ± 0.26^{Ba}	$8.98 \pm 0.30^{*Bb}$	0.014
	8	5.44 ± 0.33^{Ba}	7.71 ± 0.89^{Bc}	0.138
No Vacuum 4 degree Celsius	2	2.86 ± 0.39^{Aa}	$4.93 \pm 0.37^{*ABb}$	0.037
	4	2.99 ± 0.17^{Aa}	$4.96 \pm 0.28^{*ABa}$	0.001
	6	3.57 ± 0.12^{Ab}	$4.73 \pm 0.24^{*Ab}$	0.005
	8	4.66 ± 0.48^{Bb}	$5.66 \pm 0.33^{*Ac}$	0.021
Vacuum 4 degree Celsius	2	2.72 ± 0.23^{Aa}	4.15 ± 0.48^{Aa}	0.0875
	4	2.89 ± 0.43^{Aa}	4.70 ± 0.56^{Aa}	0.077
	6	3.14 ± 0.33^{Aa}	$4.62 \pm 0.40^{*Aa}$	0.039
	8	3.80 ± 0.37^{Ab}	4.89 ± 0.35^{Aa}	0.089

* significantly different between zeolite containing YM broth and without zeolite, *t*- test *($p<0.05$)*

Different uppercase letters are significantly different *($p<0.05$)* during storage time.

Ddifferent lowercase letters are significantly different *($p<0.05$)* among storage conditions.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวเลขา ไสลเพชร

รหัสประจำตัวนักศึกษา 4911020070

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การอาหารและโภชนาการ)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2541

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

- ทุนอุตสาหกรรมสู่ความเป็นเลิศ จากคณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ปีการศึกษา 2549

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Lakha Salaipeth, Kidchakan Supamattaya and Tipparat Hongpattarakere. 2007. Effects of shrimp Probiotics on Survival and Growth of White Shrimp (*Litopenaues vannamei*). The 19th Annual Meeting of Thai Society for Biotechnology "TSB 2007: Biotechnology for Gross National Happiness". Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University, Pathumthani, Thailand. 9-12 October 2007.pp. 50.