การศึกษาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในการเพาะเลี้ยงไรน้ำเค็ม (*Artemia salina* Linnaeus, 1778) และไรน้ำกร่อย (*Diaphanosoma* sp.) ด้วยน้ำหมักสารอินทรีย์

กัญญารัตน์ สุนทรา* ฤทธิกร ศรแก้ว สุทธิชัย ฤทธิธรรม ทัศน์พงษ์ กลมเกลียว และ ชาตรี ธาราแสง

ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลจังหวัดสมุทรสงคราม

บทคัดย่อ

การศึกษาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในการเพาะ เลี้ยงไรน้ำเค็ม และไรน้ำกร่อยได้ดำเนินการระหว่าง เดือนตุลาคม 2550 ถึง เดือนกรกฎาคม 2551 โดยเก็บตัวอย่างอาหารของไรน้ำเค็ม อาหารของไรน้ำกร่อย ตัวไรน้ำเค็มและตัวไรน้ำกร่อย นำมาเพาะเชื้อเพื่อหาปริมาณแบคทีเรียทุก 3 เดือน ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลจังหวัดสมุทรสงคราม อาหารของไรน้ำเค็มและไรน้ำกร่อยคือน้ำหมักสารอินทรีย์ที่เตรียมมาจากการหมัก สาหร่ายพวงองุ่น สาหร่ายกลวง สาหร่ายมงกุฎหนาม ขี้แดด หัวและเปลือกกุ้ง และกากผงชูรส โดยควบคุมความเค็มให้ได้ 70 พีพีทีสำหรับเป็นอาหารของไรน้ำเค็ม และ15 พีพีทีสำหรับเป็นอาหารของไรน้ำกร่อย สำหรับกระบวนการหมักสารอินทรีย์ดังกล่าวใช้เวลาประมาณ 3 เดือน

ผลการศึกษาพบ ว่า ตัวไรน้ำเค็ม มีปริมาณแบคทีเรียรวมเฉลี่ยทั้งปี 2. $16x10^8$ CFU/g ปริมาณวิบริโอรวมเฉลี่ย $3.70x10^6$ CFU/g อาหารของไรน้ำเค็มมีปริมาณแบคทีเรียรวมเฉลี่ยทั้งปี $2.12x10^5$ CFU /ml ปริมาณวิบริโอรวมเฉลี่ย 7.0 CFU /ml ตัวไรน้ำกร่อยมีปริมาณแบคทีเรียรวมเฉลี่ยทั้งปี $1.10x10^8$ CFU/g และปริมาณวิบริโอเฉลี่ย 8. $78x10^5$ CFU/g อาหารของไรน้ำ กร่อยมีปริมาณแบคทีเรียรวมเฉลี่ยทั้งปี $2.00x10^5$ CFU /ml ปริมาณวิบริโอรวมเฉลี่ย 14.50 CFU /ml ปริมาณโคลิฟอร์มทั้งหมด และฟีคอลโคลิฟอร์มในอาหารของไรน้ำเค็ม และไรน้ำกร่อย มีค่าเฉลี่ยทั้งปี 4.50, 2.00 และ 22.00, 13.80 MPN/100 ml

สรุปว่าไรน้ำเค็มและไรน้ำกร่อยที่ผลิตได้จากวิธีการนี้มีปริมาณแบคทีเรียที่ศึกษาไม่เกินเกณฑ์มาตรฐาน เป็นการใช้ประโยชน์จากสารอินทรีย์ที่มีอยู่ในระบบการเลี้ยงกุ้งให้เกิดประโยชน์ได้อีกทางหนึ่ง

คำสำคัญ: น้ำหมักสารอินทรีย์ ปริมาณแบคทีเรีย ไรน้ำเค็ม ไรน้ำกร่อย

*ผู้รับผิดชอบ: ๑๓๕ หมู่ ๑๑ ต. ลาดใหญ่ อ. เมือง จ. สมุทรสงคราม ๗๕๐๐๐ โทร ๐ ๓๔๗๑ ๖๑๑๕

Contamination of Bacteria in Artemia (*Artemia salina* Linnaeus, 1778) and Brackish water Flea (*Diaphanosoma* sp.) Culture Using Organic Waste Fermented Solution

Kunyarut Suntara* Ritthikorn Sornkaew Suttichai Rittitum Tuspong koomgew and Chatree Tarasang

Samutsongkram Marine Shrimp Research and Development Center

Abstract

Bacterial contamination in artemia and brackish water flea culture process were monitored from October 2008 to July 2009 at Samutsongkram Marine Shrimp Research and Development Center. Total count bacteria in artemia, brackish water flea and feed using in culture process were monitored every 3 months throughout the study. Feed using in this culture process was fermented organic matter solution which was prepared by fermenting the mixture of *Caulerpa racenmosa*, *Soliria robusta, Acantrophora spicifera,* rap-rap, shrimp by-product and monosodium glutamate processing residue. Feed using for artemia was produced at 70 part per thousand (ppt) salinity while feed using for brackish water flea was produced at 15 ppt salinity. Fermented organic matter solution was fermented for at least 3 months before being used. After one year of study, we found the average total count bacteria and average total *Vibrio sp.* in artemia was 2.16×10^8 CFU/g and 3.70×10^6 CFU/g of artemia respectively. Feed using for artemia had average total count bacteria and average total *Vribio sp*. at 2.12×10^5 CFU /ml and 7.0 CFU/ml, respectively. Average total count bacteria and *Vibrio sp*. in brackish water flea was 1.10×10^8 CFU/g and 8×10^5 CFU/g, respectively. For feed being used in this study, we found the average total count bacteria count and *Vibrio sp*. in feed solution was 2.00×10^5 CFU /ml and 14.50 CFU /ml respectively. Average total coliform and fecal coliform bacteria in artemia and brackish water flea feed was 4.50, 2.00 22.00 and 13.80 MPN/100 ml, respectively. From this study, it can be concluded that artemia and brackish water flea which were produced by feeding with fermented organic matter solution had bacterial contamination level lower than standard. This artemia and brackish water flea culture system should be promoted as an alternative way to efficiently utilize organic matter in shrimp farm.

Keywords: organic fermenter, bacteria, *Artemia salina* (Linnaeus, 1778) , *Diaphanosoma* sp.

* Corresponding author :135Moo11TambonLat Yai, Muang, Samut Songkhram 75000 Tel: 03471 6115

คำนำ

การเลี้ยงไรน้ำเค็มครั้งแรกในประเทศไทยเริ่มตั้งแต่ พ.ศ. 2522 โดยอนันต์ (2523) ได้ทดลองที่จังหวัดฉะเชิงเทราในบ่อดินขนาด 1.5 ไร่ คันบ่อสูง 50 เซนติเมตร สูบน้ำจากนาเกลือความเค็ม 70 พีพีที เติมให้มีความลึก 30 เซนติเมตร ใช้ไข่อาร์ทีเมียสายพันธุ์จากอ่าวซานฟรานซิสโก และ Aqua - fauna สายพันธุ์ละ 25 กรัม เพาะฟักให้เป็นตัว 2 วัน แล้วปล่อยลงเลี้ยงในบ่อที่เตรียมไว้ ให้มูลไก่แห้งเป็นอาหารสำหรับเลี้ยงอาร์ทีเมีย 200 กิโลกรัม /เดือน หลังการเลี้ยง 9 วัน อาร์ทีเมียเริ่มมีการจับคู่ผสมพันธุ์ เลี้ยงได้ 15 วันเริ่มออกลูกเป็น nauplii มีส่วนน้อยที่ออกเป็นไข่ (cyst) เมื่อเลี้ยงได้ 45 วันจึงเริ่มรวบรวมไข่ หลังจากนั้นรวบรวมไข่ได้อีก 45 วันโดยรวบรวมทุกๆ 2 - 4 วัน คิดเป็นน้ำหนักไข่ทั้งหมด 20 ,310 กรัม หลังจากนั้นได้ พัฒนาเทคนิคการเลี้ยงเรื่อยมา จนกระทั่งสามารถสร้างอาชีพที่มั่นคงให้กับเกษตรกรได้อีกอาชีพหนึ่งจากความต้องการใช้ตัวไรน้ำเค็มมีชีวิตเพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมากและตลอดปีเพื่อเป็นอาหารสัตว์น้ำวัยอ่อนในโรงเพาะฟักโดยเฉพาะอย่างยิ่งโรงเพาะฟักกุ้ง และโรงเพาะฟักปลา

ในขณะที่การเลี้ยงกุ้งทะเลได้พัฒนาจนถึงระดับอุตสาหกรรม มีวัสดุที่จัดเป็นสารอินทรีย์เกิดขึ้นมากมายในระบบการเลี้ยงกุ้ง อาทิเช่น ขี้แดด สาหร่ายชนิดต่างๆ และเมื่อส่งผลผลิตกุ้งเข้าสู่โรงงานห้องเย็น แปรรูปแล้วยังเหลือส่วนที่ไม่ได้ใช้เพื่อการบริโภคอีกคือ ส่วนหัวและเปลือกกุ้ง เพื่อไม่ให้สารอินทรีย์เหล่านี้ถูกทิ้งอย่างไร้คุณค่าและอาจสร้างมลภาวะในสิ่งแวดล้อม อนันต์และสุทธิชัย (2547) ได้ประยุกต์วิธีนำสารอินทรีย์เหล่านี้มาใช้ให้เกิดประโยชน์และกลับมาหมุนเวียนอยู่ในระบบนิเวศได้ใหม่ โดยการนำมาหมักรวมกับกากผงชูรสและควบคุมสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมได้แก่ การควบคุมความเค็ม ความเป็นกรดเป็นด่าง ปริมาณออกซิเจนละลาย ในที่สุดได้น้ำหมักสารอินทรีย์ซึ่งมีสีชมพู และไม่มีกลิ่นเหม็น เป็นการสร้างระบบนิเวศจำเพาะที่เหมาะกับการเจริญเติบโตของ แบคทีเรียสังเคราะห์แสง (Photosynthetic bacteria) ที่เพิ่มจำนวนขึ้นจากการได้รับสารอาหารจากสารอินทรีย์ที่ถูกย่อยสลาย น้ำหมักที่ได้นี้นำไปใช้เป็นอาหารเลี้ยงลูกไรน้ำเค็มให้เจริญเติบโตเป็นตัวโตในบ่อดินได้เป็นอย่างดี จัดเป็นการ ทำฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบสมดุลนิเวศ นอกจากช่วยรักษาสิ่งแวดล้อมแล้วยังช่วยลดต้นทุนค่าอาหารในการอนุบาลลูกพันธุ์สัตว์น้ำที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่นลูกกุ้ง ลูกปลา ลูกปูได้มาก ประเทศไทยต้องนำเข้าไข่ไรน้ำเค็มจากประเทศจีน สหรัฐอเมริกา รัสเซีย และประเทศอื่นๆ คิดเป็นมูลค่าปีละกว่า 500 ล้านบาท ซึ่งราคานำเข้าไข่ไรน้ำเค็ม แพงขึ้นทุกปี นอกจากนี้ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลจังหวัดสมุทรสงครามยังได้นำวิธีการดังกล่าวนี้มาประยุกต์ใช้ในการเลี้ยงไรน้ำกร่อย (*Diaphanosoma* sp.) เช่นกัน โดยใช้น้ำความเค็มต่ำประมาณ 10 – 15 พีพีที พบว่าสามารถผลิตไรน้ำกร่อยสำหรับใช้อนุบาลลูกพันธุ์สัตว์น้ำในโรงเพาะฟักได้

อย่างไรก็ตาม การนำน้ำหมัก สารอินทรีย์ที่ผลิตจากซากพืช ซากสัตว์ มาใช้เป็นอาหารของไรน้ำเค็มและไรน้ำกร่อยต้องระมัดระวังเรื่อง การปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียที่อาจเป็นอันตราย เช่น ปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวม วิบริโอรวม โคลิฟอร์มทั้งหมด และฟีคอลโคลิฟอร์ม ซึ่งอาจมีปริมาณมากหรือก่อให้เกิดปัญหาต่อสุขภาพของสัตว์น้ำและผู้บริโภคสัตว์น้ำได้

การศึกษาครั้งนี้จึงเน้นการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในน้ำหมักสารอินทรีย์ที่ใช้เป็นอาหารของไรน้ำเค็มและไรน้ำกร่อย ตัวไรน้ำเค็ม และตัวไรน้ำกร่อย เพื่อความมั่นใจในความปลอดภัยของการใช้ไรน้ำเค็มและไรน้ำกร่อย ที่ได้จากฟาร์มผลิตที่ใช้วิธีหมักสารอินทรีย์ที่เกิดในระบบการเลี้ยงกุ้งเพื่อการอนุบาลลูกพันธุ์สัตว์น้ำที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาปริมาณแบคทีเรียรวมและปริมาณวิบริโอรวมในตัวไรน้ำเค็ม และตัวไรน้ำกร่อย อาหารของไรน้ำเค็ม และอาหารของไรน้ำกร่อย
2. จำแนกชนิดของวิบริโอที่พบในตัวไรน้ำเค็มและตัวไรน้ำกร่อย
3. ศึกษาปริมาณโคลิฟอร์มทั้งหมด และฟีคอลโคลิฟอร์มในอาหารของไรน้ำเค็ม และอาหารของไรน้ำกร่อย

วิธีดำเนินการ

ศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในการเพาะเลี้ยงไรน้ำเค็มและไรน้ำกร่อยด้วยน้ำหมักสารอินทรีย์อาหารของไรน้ำเค็ม และอาหารของไรน้ำกร่อยโดยเก็บและวิเคราะห์ตัวอย่างทุก 3 เดือน ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2550 ถึง เดือนกรกฎาคม 2551 ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลจังหวัดสมุทรสงคราม

1. การเตรียมไรน้ำเค็ม

โดยประยุกต์จากวิธีของอนันต์และสุทธิชัย (2547)

1.1 การเตรียมน้ำหมักสารอินทรีย์เพื่อใช้เป็นอาหารของไรน้ำเค็ม

บ่อที่ใช้ในการทดลองเป็นบ่อดินขนาด 0.5 ไร่ ลึก 1.5 เมตร จำนวน 1 บ่อ เตรียมบ่อโดยโรยปูนขาวเพื่อปรับสภาพบ่อและตากให้แห้งนาน 4 สัปดาห์ เติมน้ำจากนาเกลือที่มีความเค็ม 70 พีพีทีที่ผ่านการกรองให้มีความลึก 50 เซนติเมตร เติมกากผงชูรส 500 ลิตร เพื่อเป็นอาหารของจุลินทรีย์ และหมักโดยใช้สาหร่ายพวงองุ่นและสาหร่ายกลวงสด 83 กิโลกรัม สาหร่ายมงกุฎหนามสด 58 กิโลกรัม ขี้แดดจากบ่อเลี้ยงกุ้ง 83 กิโลกรัม หัวและเปลือกกุ้ง 25 กิโลกรัม และปรับ pH ด้วยปูนขาวให้อยู่ในช่วง 8.0 - 8.5 ตลอดการเลี้ยง บ่อหมักเป็นบ่อเปิดอยู่กลางแจ้ง ให้อากาศโดยการวางท่อลมที่พื้นบ่อ คราดโซ่ดินก้นบ่อ สัปดาห์ละ 1 ครั้ง เพื่อพลิกพื้นผิวดิน หลังจากการหมักนานประมาณ 2 สัปดาห์ ลักษณะน้ำหมักจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูและไม่มีกลิ่นเหม็น น้ำหมักที่จะใช้เป็นอาหารของไรน้ำเค็มจะต้องหมักนาน 3 เดือน และจะเพิ่มสารอินทรีย์ลงในบ่อน้ำหมักในอัตราส่วนเท่ากับการหมักครั้งแรก เดือนละ 1 ครั้ง เพื่อใช้เป็นอาหารของไรน้ำเค็มอย่างต่อเนื่อง

1.2 การเลี้ยงไรน้ำเค็ม

ใช้บ่อดินขนาด 1 ไร่ ลึก 1.5 เมตร จำนวน 3 บ่อ ลอกเลนและตากบ่อให้แห้งนาน 4 สัปดาห์ เติมน้ำ ความเค็มสูง 350 พีพีที ที่ผ่านการกรอง ทิ้งไว้ประมาณ 1 สัปดาห์ เพื่อกำจัดพาหะและศัตรูของไรน้ำเค็ม เติมน้ำทะเลที่ผ่านการกรอง เพื่อปรับความเค็มให้อยู่ระหว่าง 70 - 140 พีพีที ความ ลึกของน้ำประมาณ 50 เซนติเมตร ปรับ pH ด้วยปูนขาวให้อยู่ในช่วง 7.5 - 9.0 เติมพันธุ์ไรน้ำเค็มตัวเต็มวัย น้ำหนักเปียกรวม 6 กิโลกรัม ลงในบ่อและให้อาหารโดยใช้น้ำหมักที่เตรียมไว้ในข้อ 1.1 สูบเติมลงในบ่อเลี้ยง 40 - 100 ลิตร /วัน ปริมาณน้ำหมักที่เติมสังเกตจากสีของน้ำและสีตัวของไรน้ำเค็ม ถ้าสีน้ำและสีตัวของไรน้ำเค็มจางลงจะเติมประมาณ 100 ลิตร/ วัน ถ้าสีน้ำและสีตัวเข้มจะเติมประมาณ 40 ลิตร/วัน เลี้ยงไรน้ำเค็มเป็นเวลา 10-15 วัน จึงเก็บเกี่ยวผลผลิต โดยใช้ชุดดักจับแพลงก์ตอนแบบเปล กรองด้วยผ้ากรองขนาด 200 ไมครอน ซึ่งดักอยู่บริเวณหน้าเครื่องกังหันตีน้ำเพื่อรวบรวมผลผลิตไรน้ำเค็ม

2. การเตรียมไรน้ำกร่อย

2.1 การเตรียมน้ำหมักสารอินทรีย์เพื่อใช้เป็นอาหารของไรน้ำกร่อย

ใช้ถังไฟเบอร์กลาส ขนาด 1 ตัน จำนวน 1 ถัง วางไว้ในอาคารที่มีแสงส่องถึง เติมน้ำที่ผ่านการกรองด้วยผ้าโอล่อนแก้วขนาด 20 ไมครอน เพื่อกำจัดโคพีพอด ความเค็ม 15 พีพีที ปริมาตร 500 ลิตร แล้วเติมกากผงชูรส 2 ลิตร สาหร่ายพวงองุ่นและสาหร่ายกลวงสด 8 กิโลกรัม สาหร่ายมงกุฎหนาม 5 กิโลกรัม ขี้แดดจากบ่อเลี้ยงกุ้ง 8 กิโลกรัม หัวและเปลือกกุ้ง 3 กิโลกรัม ควบคุม pH ให้อยู่ในช่วง 8.0 – 8.5 ด้วยการใส่ปูนขาวเติมอากาศโดยใช้หัวทราย และกวนตะกอนสัปดาห์ละ 1 ครั้ง เมื่อเวลาผ่านไป 2 สัปดาห์ ลักษณะน้ำหมักจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูและไม่มีกลิ่นเหม็น น้ำหมักที่จะใช้เป็นอาหารของไรน้ำกร่อยจะต้องหมักนาน 3 เดือน และจะเพิ่มสารอินทรีย์ลงในบ่อน้ำหมักในอัตราส่วนเท่ากับการหมักครั้งแรก เดือนละ 1 ครั้ง เพื่อใช้เป็นอาหารของไรน้ำกร่อยอย่างต่อเนื่อง

2.2 การเลี้ยงไรน้ำกร่อย

ใช้ถังไฟเบอร์กลาส ขนาด 1 ตัน จำนวน 3 ถัง วางไว้ในอาคารที่มีแสงส่องถึง เติมน้ำที่ผ่านการกรองด้วยผ้าโอล่อนแก้วขนาด 20ไมครอนเพื่อป้องกันโคพีพอด ความเค็ม 10-15 พีพีที ปริมาตร 500 ลิตร ใส่ปูนขาวควบคุม pH ให้อยู่ในช่วง 8.0 - 8.5 แล้วเติมพันธุ์ไรน้ำกร่อยตัวเต็มวัยน้ำหนักเปียกรวม 100 กรัม ลงในถัง เติมอากาศผ่านหัวทรายให้กระจายทั่วถัง ใส่น้ำหมักสารอินทรีย์ (ข้อ 2.1) เป็นอาหาร ในช่วง 2 วันแรก ใส่ครั้งละ 3 ลิตรวันละ 3 ครั้ง วันที่ 3 เติมน้ำให้เต็มบ่อและเพิ่มปริมาณอาหารเป็นครั้งละ 5 ลิตร วันที่ 5 -7 จึงเก็บเกี่ยวผลผลิตโดยใช้ถุงกรองขนาดตา 70 ไมครอน กรองวันละ 25 เปอร์เซนต์ของปริมาตรน้ำเลี้ยง ใช้เวลา 4 วัน จึงเก็บเกี่ยวผลผลิตหมด แล้วล้างทำความสะอาดถังและอุปกรณ์การเลี้ยง เพื่อเลี้ยงรุ่นใหม่หมุนเวียนกันไป

3. วิธีการเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย

เก็บตัวอย่างตัวไรน้ำเค็ม ตัวไรน้ำกร่อย อาหารของไรน้ำเค็ม และอาหารของไรน้ำกร่อย ทุกๆ 3 เดือน ระหว่างเดือนตุลาคม 2550 ถึงเดือนกรกฎาคม 2551 เพื่อตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย รายละเอียดวิธีการเก็บตัวอย่าง ดังนี้

3.1 สุ่มเก็บตัวอย่างตัวไรน้ำเค็ม ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อจากบ่อเลี้ยงบ่อละ 5 จุดๆ ละ 3 กรัมด้วยสวิงขนาดตา 200 ไมครอน นำไปเพาะเชื้อแบคทีเรียเพื่อศึกษาในขั้นตอนต่อไป

3.2 สุ่มเก็บตัวอย่างตัวไรน้ำกร่อย ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อจากถังไฟเบอร์กลาส 3 ถังๆ ละ 5 จุดๆ ละ 3 กรัม ด้วยสวิงขนาดตา 125 ไมครอน นำไปเพาะเชื้อแบคทีเรียเพื่อศึกษาในขั้นตอนต่อไป

3.3 สุ่มเก็บตัวอย่างน้ำจากบ่อหมักและถังหมักสารอินทรีย์ที่ใช้เป็นอาหารของไรน้ำเค็มและไรน้ำกร่อยด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ จำนวน 5 จุดๆ ละ 1 ลิตร นำไปเพาะเชื้อแบคทีเรียเพื่อศึกษาในขั้นตอนต่อไป

4. วิธีการตรวจเชื้อแบคทีเรีย

ปริมาณแบคทีเรียที่ศึกษาในครั้งนี้ คือ แบคทีเรียรวม วิบริโอรวม โคลิฟอร์มทั้งหมด และฟีคอลโคลิฟอร์ม รวมทั้งการจำแนกชนิดของวิบริโอในตัวไรน้ำเค็ม และตัวไรน้ำกร่อย มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

4.1 การตรวจนับปริมาณแบคทีเรียรวม และวิบริโอรวม

ล้างตัวอย่างไรน้ำเค็มและไรน้ำกร่อยที่เก็บรวบรวมได้จากการเพาะเลี้ยงในข้อ 1.2 และ 2.2 ด้วยน้ำเกลือ 0.85% ปลอดเชื้อ 3 ครั้ง แล้วชั่งน้ำหนักตัวอย่างละ 1 กรัมใส่ในหลอดทดลองขนาด 3 มิลลิลิตร ที่บรรจุ 1 % Alkaline peptone water (APW) 1 มิลลิลิตร บดตัวอย่างให้ละเอียด แล้วนำมาตรวจนับปริมาณแบคทีเรียรวมและวิบริโอรวมโดยใช้วิธี Spread Plate ดูดตัวอย่างที่เตรียมไว้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในน้ำเกลือ 1.5% ปลอดเชื้อ 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex mixer แล้วเจือจางครั้งละ 10 เท่า ดูดตัวอย่างความเจือจางละ 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Agar (TSA, Difco) ที่เพิ่มเกลือ 1.5 % จำนวน 3 ซ้ำ และเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose (TCBS, Difco) Agar จำนวน 3 ซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปริมาณแบคทีเรียรวมนับจากจำนวนโคโลนีที่เจริญบนTSA ส่วนปริมาณวิบริโอนับจากจำนวนโคโลนีที่เจริญบน TCBS Agar รายงานหน่วยเป็น colony forming unit/ml (CFU/ml)

สำหรับตัวอย่างน้ำหมักสารอินทรีย์อาหารของไรน้ำเค็ม และน้ำหมักสารอินทรีย์อาหารของไรน้ำกร่อยสุ่มเก็บตัวอย่างครั้งละ 100 มิลลิลิตร วิธีการเพาะเชื้อเพื่อหาปริมาณแบคทีเรียรวมและวิบริโอรวมโดยใช้วิธี Spread Plate เช่นเดียวกับที่กล่าวมาแล้ว

4.2 การจำแนกชนิดของวิบริโอในไรน้ำเค็มและไรน้ำกร่อย

เลือกโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกันบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS ถ่ายเชื้อลักษณะละ 2-3 โคโลนี ลงบนอาหาร TSA ปลูกเชื้อต่อ (Sub culture) เพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์แล้วเก็บในอาหารวุ้น (TSA Slant) แยกชนิดเชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธีการทดสอบทางชีวเคมีตามวิธีการของ Colwell (1984) ได้แก่ การย้อมสีแกรม, ทดสอบการสร้างเอนไซม์ไซโตโครมออกซิเดส (Cytochrome oxidase), ทดสอบ O/F test, ทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาลซูโครส (Decarboxylation of amino acids) และความไวต่อ O/129, ทดสอบการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียในระดับความเข้มข้นของ NaCl 0, 3, 6, 8 และ 10% และที่ระดับอุณหภูมิ 4, 20, 35, และ 42 องศาเซลซียส ร่วมกับการใช้ชุดทดสอบ API 20 E ในการจำแนกชนิดวิบริโอโดยใช้โปรแกรม API web software

4.3 การหาปริมาณโคลิฟอร์มทั้งหมด และฟีคอลโคลิฟอร์มในอาหารไรน้ำเค็ม และไรน้ำกร่อย ตามวิธี APHA (1970)

ดูดตัวอย่าง อาหารของไรน้ำเค็มและไรน้ำกร่อย นำมาเจือจางด้วย น้ำเกลือ 1.5 % ปลอดเชื้อให้ได้ความเข้มข้น 10^{-1}, 10^{-2} และ 10^{-3} แล้วดูดน้ำที่ความเข้มข้น 10^{-1} ปริมาตร 10 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดที่มีอาหาร Double Lauryl Tryptose Broth (DLTB) หลอดละ 10 มิลลิลิตร จำนวน 5 หลอด และ ดูดน้ำตัวอย่างที่ความเข้มข้น 10^{-1}, 10^{-2} และ 10^{-3} ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหาร Single Lauryl Tryptose Broth (SLTB) จำนวนความเข้มข้นละ 5 หลอด นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 ±1 องศาเซลซียส นาน 24-48 ชั่วโมง บันทึกจำนวนหลอดที่มีแก๊สเกิดขึ้นใน Durham's tube ถ่ายเชื้อจากหลอดที่เกิดแก๊ส หลอดละ 0.1 มิลลิลิตร ลงในอาหาร 2 % Brilliant Green Bile Broth (BGLB) ที่มีหลอด Durham's tube นำไปบ่มเพาะเชื้อที่ 35 ± 1 องศาเซลซียส นาน 48 ชั่วโมง และ ถ่ายเชื้อต่อไปโดยใส่ลงในหลอดอาหาร Escherichia coli (EC, Difco) medium หลอดละ 0.1 มิลลิลิตรเช่นกัน บ่มที่อุณหภูมิ 45 ±0.2 องศาเซลซียสนาน 24 ชั่วโมง ผล positive จากหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ 2% BGLB คือหลอดที่เปลี่ยนสีจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงินและเกิดแก๊ส ปริมาณโคลิฟอร์มทั้งหมดหาได้จากการนับจำนวนหลอดที่ให้ผล positive ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2% BGLB สำหรับปริมาณฟีคอลโคลิฟอร์ม หาได้จากการนับจำนวนหลอดที่ให้ผล positive ในอาหารเลี้ยงเชื้อ EC medium แล้วเทียบกับตาราง Most Probable Number (MPN)

5. การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์หาค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของปริมาณ แบคทีเรียรวม ปริมาณวิบริโอรวม โคลิฟอร์มทั้งหมด และฟีคอลโคลิฟอร์ม ในน้ำหมักสารอินทรีย์ รวมทั้งตัวไรน้ำเค็มและตัวไรน้ำ กร่อย และวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์

ผลการศึกษา

1. ปริมาณแบคทีเรียรวมในตัวไรน้ำเค็ม ตัวไรน้ำกร่อยอาหารของไรน้ำเค็มและอาหารของไรน้ำกร่อย

ผลการศึกษาปริมาณแบคทีเรียรวมในตัวไรน้ำเค็ม พบว่า มีค่าเฉลี่ย 3.84×10^7, 1.32×10^6, 1.34×10^8, 3.50×10^8 CFU/ml ตามลำดับโดยมีค่าเฉลี่ยทั้งปี 2.16×10^8 CFU/ml อาหารของไรน้ำเค็ม มีค่าเฉลี่ย 2.10×10^4, 2.10×10^5, 2.00×10^5 และ 2.40×10^5 CFU/ml ตามลำดับ โดยมีค่าเฉลี่ยทั้งปี 2.12×10^5 CFU/ml

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณแบคทีเรียรวมในตัวไรน้ำเค็ม พบว่ามีค่าเฉลี่ยแต่ละเดือนและค่าเฉลี่ยทั้งปีสูงกว่าในอาหารของไรน้ำเค็ม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ผลการศึกษาปริมาณแบคทีเรียรวมในตัวไรน้ำกร่อย พบว่า มีค่าเฉลี่ย 5.00×10^5, 4.03×10^8, 1.32×10^6, 4.90×10^7 CFU/ml ตามลำดับ โดยมีค่าเฉลี่ยทั้งปี 1.10×10^8 CFU/ml ในอาหารของไรน้ำกร่อย มีค่าเฉลี่ย 2.00×10^5, 2.21×10^5, 2.00×10^5, 1.80×10^5 CFU/ml ตามลำดับโดยมีค่าเฉลี่ยทั้งปี 2.00×10^5 CFU/ml เมื่อเปรียบเทียบ ปริมาณแบคทีเรียรวมในตัวไรน้ำกร่อยพบว่ามีค่าเฉลี่ยแต่ละเดือนและค่าเฉลี่ยทั้งปีสูงกว่าในอาหารของไรน้ำกร่อย อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ตารางที่1

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยปริมาณแบคทีเรียรวมในตัวไรน้ำเค็ม ตัวไรน้ำกร่อย อาหารของไรน้ำเค็ม และอาหารของไรน้ำกร่อย

	ค่าเฉลี่ยปริมาณ แบคทีเรียรวม				
ชนิด	ต.ค.-50	ม.ค.-51	เม.ย.-51	ก.ค.-51	เฉลี่ยทั้งปี
ไรน้ำเค็ม (CFU/g)	$3.84\times10^{7}\pm1.89\times10^{2cd}$	$1.32\times10^{6}\pm2.62\times10^{2c}$	$1.34\times10^{8}\pm5.71\times10^{2d}$	$3.50\times10^{8}\pm5.40\times10^{2d}$	$2.16\times10^{8}\pm3.90\times10^{2d}$
อาหารไรน้ำเค็ม (CFU/ml)	$2.10\times10^{4}\pm6.24\times10^{2a}$	$2.10\times10^{5}\pm3.0\times10^{2ab}$	$2.00\times10^{5}\pm5.74\times10^{2ab}$	$2.40\times10^{5}\pm6.15\times10^{2ab}$	$2.12\times10^{5}\pm5.20\times10^{2ab}$
ไรน้ำกร่อย (CFU/g)	$5.00\times10^{5}\pm2.72\times10^{2b}$	$4.03\times10^{8}\pm1.02\times10^{3d}$	$1.32\times10^{6}\pm1.01\times10^{2c}$	$4.90\times10^{7}\pm6.69\times10^{3cd}$	$1.10\times10^{8}\pm2.00\times10^{3d}$
อาหารไรน้ำกร่อย (CFU/ml)	$2.00\times10^{5}\pm3.01\times10^{2ab}$	$2.21\times10^{5}\pm2.50\times10^{2ab}$	$2.00\times10^{5}\pm7.66\times10^{2ab}$	$1.80\times10^{5}\pm4.70\times10^{2ab}$	$2.00\times10^{5}\pm4.40\times10^{2ab}$

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ (colum) เดียวกัน ถ้ามีตัวอักษรกำกับต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

2. ปริมาณวิบริโอรวมในตัวไรน้ำเค็ม ตัวไรน้ำกร่อยอาหารของไรน้ำเค็ม และอาหารของไรน้ำกร่อย

ผลการศึกษาปริมาณวิบริโอรวมในตัวไรน้ำเค็ม พบว่า ปริมาณของวิบริโอรวม มีค่าเฉลี่ย 5.50×10^6, 8.60×10^2, 8.80×10^6 และ 5.35×10^5 CFU/ml ตามลำดับ โดยมีค่าเฉลี่ยทั้งปี 3.70×10^6 CFU/ml อาหาร

ของไรน้ำเค็มมีค่าเฉลี่ย 8.00, 5.00, 8.00 และ 7.00 CFU/ml ตามลำดับ โดยมีค่าเฉลี่ยทั้งปี 7.00 CFU/ml เมื่อเปรียบเทียบปริมาณวิบริโอรวมในตัวไรน้ำเค็ม พบว่ามีค่าเฉลี่ยแต่ละเดือนและค่าเฉลี่ยทั้งปีสูงกว่าในอาหารของไรน้ำเค็ม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ผลการศึกษาปริมาณวิบริโอรวมในตัวไรน้ำกร่อย พบว่า มีค่าเฉลี่ย 5.40 $x10^3$, 6.20 $x10^3$, 8.60 $x10^2$, 3.50 $x10^6$ CFU/ml ตามลำดับ โดยมีค่าเฉลี่ยทั้งปี 8.82 $x10^5$ CFU/ml ในอาหารของไรน้ำกร่อย มีค่าเฉลี่ย 9.00, 17.00, 15.00 , 17.00 CFU/ml ตามลำดับโดยมีค่าเฉลี่ยทั้งปี 14.50 CFU/ml เมื่อเปรียบเทียบปริมาณวิบริโอรวมในตัวไรน้ำกร่อยพบว่ามีค่าเฉลี่ยแต่ละเดือนและค่าเฉลี่ยทั้งปีสูงกว่าใน อาหารของไรน้ำกร่อย อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่2)

ตารางที่2 ค่าเฉลี่ยปริมาณวิบริโอรวมในตัวไรน้ำเค็มตัวไรน้ำกร่อย อาหารของไรน้ำเค็ม และอาหารของไรน้ำกร่อย

	ค่าเฉลี่ยปริมาณวิบริโอรวม				
ชนิด	ต.ค.-50	ม.ค.-51	เม.ย.-51	ก.ค.-51	เฉลี่ยทั้งปี
ไรน้ำเค็ม (CFU/g)	$5.50x10^6 \pm 1.54x10^{2d}$	$8.60x10^2 \pm 1.21^b$	$8.80x10^6 \pm 1.78x10^{2d}$	$5.35x10^5 \pm 2.29x10^{2cd}$	$3.70x10^6 \pm 1.42x10^{2d}$
อาหารไรน้ำเค็ม (CFU/ml)	8.00 ± 1.00^a	5.00 ± 0.50^a	8.00 ± 1.00^a	7.00 ± 0.50^a	7.00 ± 0.75^a
ไรน้ำกร่อย (CFU/g)	$5.40x10^3 \pm 1.20^{bc}$	$6.20x10^3 \pm 2.9^{bc}$	$8.60x10^2 \pm 3.14^b$	$3.50x10^6 \pm 7.03^d$	$8.82x10^5 \pm 3.56^{cd}$
อาหารไรน้ำกร่อย (CFU/ml)	9.00 ± 0.20^a	17.00 ± 0.20^a	15.00 ± 0.70^a	17.00 ± 0.50^a	14.50 ± 0.40^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ (colum) เดียวกัน ถ้ามีตัวอักษรกำกับต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

3. การจำแนกชนิดวิบริโอ

จากการคัดเลือกโคโลนีวิบริโอในไรน้ำเค็มระยะตัวเต็มวัย จำนวน 60 ไอโซเลต จำแนกได้เป็น *Vibrio alginolyticus* 56 ไอโซเลต คิดเป็น 93.33 % *V. parahaemolyticus* 3 ไอโซเลต คิดเป็น 5.00 % และ *Vibrio* sp. 1 ไอโซเลต คิดเป็น 1.67 % สำหรับไรน้ำกร่อยระยะตัวเต็มวัย จำนวน 60 ไอโซเลต จำแนกได้เป็น *V. alginolyticus* จำนวน 52 ไอโซเลต คิดเป็น 86.66 % *Vibrio* spp. จำนวน 8 ไอโซเลต คิดเป็น 13.34 % (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ชนิดของวิบริโอแบคทีเรียที่พบในระยะตัวเต็มวัยของไรน้ำเค็มและไรน้ำกร่อย

ชนิดตัวอย่าง	ระยะ	ชนิด *Vibrio*	% ที่พบ	% Identification
ไรน้ำเค็ม	ตัวเต็มวัย	*V. alginolyticus*	93.33	96 - 99 %
		V. parahaemolyticus	5.00	91%
		Vibrio sp.	1.67	92-99%
ไรน้ำกร่อย	ตัวเต็มวัย	*V. alginolyticus*	86.66	99%
		Vibrio spp.	13.34	85 - 90%

4. ปริมาณ โคลิฟอร์มทั้งหมด และฟีคอลโคลิฟอร์ม ในอาหารของไรน้ำเค็ม และอาหารของไรน้ำกร่อย

ผลการศึกษาพบว่า ปริมาณโคลิฟอร์มทั้งหมดในอาหารของไรน้ำเค็มมีค่าเฉลี่ย 2.00, 7.00, 21.00, 2.00 MPN/100 ml ตามลำดับ โดยมีค่าเฉลี่ยทั้งปี 4.50 MPN/100ml ส่วนปริมาณฟีคอลโคลิฟอร์ม มีค่าเฉลี่ย 2.00, 2.00, 2.00, 2.00 MPN/100 ml ตามลำดับ โดยมีค่าเฉลี่ยทั้งปี 2.00 MPN/100 ml

ผลการศึกษาพบว่า ปริมาณโคลิฟอร์มทั้งหมดในอาหารของไรน้ำกร่อย มีค่าเฉลี่ย 79.00, 5.00, 2.00 และ 2.00 MPN/100ml ตามลำดับ โดยมีค่าเฉลี่ยทั้งปี 22 .00 MPN/100ml ส่วนปริมาณฟีคอลโคลิฟอร์ม มีค่าเฉลี่ย 49.00, 2.00, 2.00, 2.00 MPN/100 ml ตามลำดับ โดยมีค่าเฉลี่ยทั้งปี 13.80 MPN/100 ml

สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

จากผลการศึกษา ปริมาณแบคทีเรียรวมในตัวไรน้ำเค็ม พบว่า มีค่าเฉลี่ยทั้งปี $2.16x10^8$ CFU/ml อาหารของไรน้ำเค็ม มีค่าเฉลี่ยทั้งปี $2.12\ x10^5$ CFU/ml ปริมาณวิบริโอรวมในตัวไรน้ำเค็ม มีค่าเฉลี่ยทั้งปี $3.70x10^6$ CFU/ml และในอาหารของไรน้ำเค็ม มีค่าเฉลี่ยทั้งปี 7.00 CFU/ml ขณะที่เถลิงเกียรติ และคณะ (2549) ได้ศึกษาการปนเปื้อนและการลดปริมาณแบคทีเรียจากไข่ไรน้ำเค็ม พบว่าปริมาณแบคทีเรียรวมและวิบริโอรวมที่ปนเปื้อนในไข่ไรน้ำเค็มมีค่าอยู่ระหว่าง $1.45\ x10^8 – 2.75\ x10^8$ CFU/ml และ $5.58\ x10^8 – 15.36\ x10^8$ CFU/ml ตามลำดับ นับว่าในไข่ไรน้ำเค็ม มีปริมาณแบคทีเรียมากกว่าในตัวไรน้ำเค็มและอาหารของไรน้ำเค็ม ในการศึกษาครั้งนี้พบวิบริโอ3 ชนิดคือ *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* และ *Vibrio* sp. อนุชา และคณะ (2549) พบว่า *V. alginolyticus* ที่จำแนกได้จากไรน้ำเค็มระยะนอเพลียสและตัวเต็มวัย จากฟาร์มเลี้ยงในจังหวัดฉะเชิงเทรา ที่เลี้ยงด้วยน้ำหมักสารอินทรีย์โดยใช้เทคนิคโมโนโคลนอล แอนติบอดี VAL 165/2-1

เป็นชนิดที่ไม่ก่อโรคในสัตว์น้ำ นอกจากนี้ *V. alginolyticus* บางสายพันธุ์เป็นชนิดที่มีประโยชน์ใช้เป็นโปรไบโอติค ในกุ้งขาวแปซิฟิค (*Litopenaeus vannamei*) (Balcazar *et al*., 2007)

สำหรับ ปริมาณแบคทีเรียในไรน้ำกร่อยยังไม่เคยมีรายงานของผู้ใดมาก่อน การศึกษาครั้งนี้พบว่ามีปริมาณแบคทีเรียรวมในตัวไรน้ำกร่อย ค่าเฉลี่ยในรอบปี $1.10x10^8$ CFU/ml ในอาหารของไรน้ำกร่อยมีค่าเฉลี่ย $2.0\ 0x10^5$ CFU/ml ปริมาณวิบริโอรวมในรอบปีมีค่าเฉลี่ย $8.80x10^5$ CFU/ml ในอาหารของไรน้ำกร่อย มีค่าเฉลี่ย 14.50 CFU/ml เมื่อจำแนกชนิดของวิบริโอพบ *V. alginolyticus* เป็นชนิดที่เด่นเช่นเดียวกับไรน้ำเค็ม ลิลา และคณะ (2540)ได้ศึกษาปริมาณแบคทีเรียในกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในบ่อระบบพัฒนาพบว่าปริมาณแบคทีเรียรวมไม่เกิน 10^4 CFU/ml ปริมาณวิบริโอรวมไม่เกิน 10^3 CFU/ml เป็นปริมาณที่เหมาะสมไม่ก่อให้เกิดโรคในสัตว์น้ำ ซึ่งจากผลการทดลองในครั้งนี้เมื่อนำมาคำนวนความเจือจางแล้วพบว่าปริมาณแบคทีเรียรวม และวิบริโอรวมไม่เกินค่ามาตรฐานและเมื่อจำแนกชนิดแล้วพบเป็นชนิดที่ไม่ก่อให้เกิดโรคในสัตว์น้ำ

ในอาหารของไรน้ำเค็ม พบปริมาณโคลิฟอร์มทั้งหมดและฟีคอลโคลิฟอร์ม ในรอบปีมีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 4.50 และ 2.00 MPN/ 100ml ตามลำดับ ส่วนอาหารของไรน้ำกร่อยพบปริมาณโคลิฟอร์มทั้งหมดและฟีคอลโคลิฟอร์ม ในรอบปีมีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 22.00 และ 13.8 0 MPN/ 100 ml ตามลำดับ ซึ่งปริมาณโคลิฟอร์มทั้งหมด และปริมาณฟีคอลโคลิฟอร์มพบในปริมาณน้อยกว่าค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำทะเลชายฝั่งที่กรมมลพิษกำหนดให้โคลิฟอร์มทั้งหมด มีค่าไม่เกิน 1,000 MPN/100 ml และยังต่ำกว่าค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้งของกรมควบคุมมลพิษ ซึ่งกำหนดค่าฟีคอลโคลิฟอร์มไม่ควรเกิน 100 MPN/100 ml ตามประกาศคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติฉบับที่ 7 (พ.ศ. 2537)

จากการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่าการใช้สารอินทรีย์ที่มีอยู่ในระบบการเลี้ยงกุ้งมาทำเป็นน้ำหมักสารอินทรีย์เพื่อใช้เลี้ยงไรน้ำเค็มและไรน้ำกร่อยนั้นมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ และเป็นการนำสารอินทรีย์มาหมุนเวียนใช้ประโยชน์อย่างคุ้มค่า ช่วยลดต้นทุนการผลิตสัตว์น้ำอีกทั้งยังช่วยให้การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีความยั่งยืน

เอกสารอ้างอิง

เฉลิงเกียรติ สมนึก, นนทวิทย์ อารีย์ชน, สุนทราภรณ์ ลิ่มสกุล และส่งศรี มหาสวัสดิ์. 2549. การปนเปื้อนและการลดปริมาณแบคทีเรียจากไข่ไรน้ำเค็ม. **ใน:**รายงานการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สาขาประมง ครั้งที่ 44 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 161 – 171.

ราชกิจจานุเบกษา. 2537. ประกาศคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติฉบับที่ 7 (พ.ศ. 2537) ออกตามความในพระราชบัญญัติส่งเสริมและรักษาคุณภาพสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ พ.ศ. 2535 เรื่อง กำหนดมาตรฐานคุณภาพน้ำทะเลชายฝั่ง. **ใน:** ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 111 ตอนที่ 11 ง ลงวันที่ 24 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2537. http://www.onep.go.th/content/pra/committee_announcement07.htm.

ลิลา เรืองแป้น, วารินทร์ ธนาสมหวัง และกุลวรา แสงรุ่งเรือง. 2540. แบคทีเรียในกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในบ่อระบบพัฒนา. **ใน:** รายงานการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สาขาประมง ครั้งที่ 35. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. หน้า 3-10.

อนุชา ค้าผล, ปภาศิริ บาร์เนท และ ไพศาล สิทธิกรกุล. 2549. การปนเปื้อนและจำแนกเชื้อของแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ในตัวไรน้ำเค็มโตเต็มวัยที่เลี้ยงในบ่อดิน. ปริญญานิพนธ์ มหาวิทยาลัยบูรพา. 107 หน้า

อนันต์ ตันสุตะพานิช. 2523. การเพาะเลี้ยงอาร์ทีเมียในนาเกลือ. **ใน:** เรื่องย่อการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สาขาสัตว์ ครั้งที่ 18. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. หน้า 48-48ก.

อนันต์ ตันสุตะพานิช และ สุทธิชัย ฤทธิธรรม. 2547. วิธีมีนเกษตรคืนดุล พลิกฟื้นการเลี้ยงสัตว์สองน้ำ กุ้งทะเลระบบรีไซเคิล. ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งฉะเชิงเทรา. กรมประมง. 42 หน้า.

APHA. 1970. American Public Health Association: Recommended procedures for the examination of sea water and shellfish (4th ed.). The American Public Health Association Inc., Washington, D. C. 105 pp.

Balcázar, J. L., R. L. Tyrone and D. P. Cunningham. 2007. Effect of the addition of four potential Probiotic strains on the survival of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following immersion challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 96(2) : 147-150.

Colwell, R. R. 1984. Vibrio in the environment. NewYork , John Wiley and Sons. 239 pp.

ตารางผนวกที่ 1 ค่าคุณภาพน้ำเฉลี่ยในบ่อน้ำหมักสารอินทรีย์อาหารของไรน้ำเค็ม และไรน้ำกร่อย

น้ำตัวอย่าง	เดือน	อุณหภูมิ (C^{o})	พีเอช	อัลคาไลด์ (มก./ล.)	ความเค็ม (พีพีที)	แอมโมเนีย (มก./ล.)	ไนไตรท์ (มก./ล.)
น้ำหมักสารอินทรีย์	ต.ค. 51	27.50	8.06	160	69	3.361	0.029
อาหารของไรน้ำเค็ม	ม.ค. 52	22.60	8.05	236	75	3.361	0.024
	เม.ย. 52	30.00	8.05	196	138	2.181	0.034
	ก.ค. 52	29.50	8.33	91	75	2.499	0.045
	เฉลี่ย	27.40	8.12	170.75	89.25	2.851	0.033
น้ำหมักสารอินทรีย์	ต.ค. 51	28.00	7.66	125	10	2.645	0.520
อาหารของไรน้ำกร่อย	ม.ค. 52	21.80	7.84	135	15	0.843	0.712
	เม.ย. 52	31.00	8.60	170	15	0.093	0.001
	ก.ค. 52	29.00	8.51	165	15	0.074	0.001
	เฉลี่ย	27.45	8.15	148.75	13.75	0.914	0.309