



ใบรับรองวิทยานิพนธ์  
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์คชภัฏบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพ

เทคโนโลยีชีวภาพ

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การคัดเลือกสายพันธุ์และการผลิตบациลัสต้านไวรัสสำหรับการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

Strain Selection and Production of *Bacillus* spp. against *Vibrio* spp. for  
Black Tiger Shrimp Cultivation

นามผู้วิจัย นายวิชัย ดำรงโกศลภณ

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

( รองศาสตราจารย์เพ็ญแข วันไชยธนวงศ์, Ph.D. )

กรรมการ

( รองศาสตราจารย์สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ, Ph.D. )

กรรมการ

( รองศาสตราจารย์วิเชียร กิจปรีชานิช, Ph.D. )

หัวหน้าภาควิชา

( รองศาสตราจารย์สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ, Ph.D. )

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

( รองศาสตราจารย์กัญจนา ชีระกุล, D.Agr. )

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ \_\_\_\_\_ เดือน \_\_\_\_\_ พ.ศ. \_\_\_\_\_

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การคัดเลือกสายพันธุ์และการผลิตบาซิลลัสต้านไวรัสสำหรับการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

**Strain Selection and Production of *Bacillus* spp. against *Vibrio* spp. for  
Black Tiger Shrimp Cultivation**

โดย

นายวิชัย ดำรงโภคภัณฑ์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์  
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

พ.ศ. 2552

วิชัย คำรงค์กันท์ 2552: การคัดเลือกสายพันธุ์และการผลิตบราซิลด้านชีววิทยาสำหรับการศึกษา  
เพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) สาขาวิชา  
เทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ประชานกรรมการที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์  
เพ็ญแข วันไชยธนวงศ์, Ph.D. 200 หน้า

คัดเลือก *Bacillus* spp. จำนวน 25 ไอโซเลทจากตับกุ้งกุลาดำ ที่มีกิจกรรมยับยั้งแบคทีเรีย *Vibrio* spp. จำนวน 10 สายพันธุ์ ด้วยวิธี agar well diffusion พบว่า *Bacillus* spp. จำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ B17, B19, B21 และ B25 ซึ่งจัดจำแนกเป็น *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens* และ *B. megaterium* ตามลำดับ สามารถยับยั้ง *Vibrio* spp. ได้ทุกสายพันธุ์ ซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเฉลี่ยอยู่ในช่วง  $1.03 \pm 0.04$  ถึง  $2.20 \pm 0.07$  cm และมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเท่ากับ  $5.0 \times 10^7$ ,  $5.0 \times 10^7$ ,  $5.0 \times 10^7$  และ  $5.0 \times 10^6$  cfu/ml ตามลำดับ นอกจากนี้ยังวัดค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งด้วยวิธี co-culture ใน nutrient broth พบว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ B17 และ B21 ที่ยับยั้งการเติบโตของ *Vibrio harveyi* VH05 เท่ากับ  $5.0 \times 10^6$  และ  $5.0 \times 10^7$  cfu/ml ตามลำดับ นอกจากนี้ยังศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเติบโตของ B17, B19, B21 และ B25 ในพลาสติกแบบแข็ง พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อตัดแปรโมลาสที่มีส่วนผสมของ Sandril salt และ 5% โมโนโซเดียมกลูตาเมต ร่วมกับการเติมโซเดียมคลอไรด์ปริมาณ 0 ถึง 15 g/l เหมาะสมกับการเติบโตของ *Bacillus* spp. ที่อุณหภูมิ 30 ถึง 37°C ส่วนผลของพีเอชต่อการเติบโต ของ B17, B21 และ B25 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร พบว่าพีเอช 6.0 เหมาะสมกับการเติบโตที่สุด โดยให้อัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.4985, 0.4387 และ 0.4938 h<sup>-1</sup> ตามลำดับ การศึกษาการทำแห้งแบบพ่นฝอยของ B17 ในอาหาร ระยะเวลาเพาะเลี้ยง และสารพาที่แตกต่างกัน พบว่าหลังการทำแห้งแบบพ่นฝอยเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร nutrient broth เป็นเวลา 36 ชั่วโมง มีอัตราการรอดชีวิตสูงสุด (9.28%) เมื่อใช้ 15% มอลโทเดกซ์ทรินผสม 5% โมโนโซเดียมกลูตาเมตเป็นสารพา พบว่าหลังการทำแห้งแบบพ่นฝอยเซลล์มีอัตราการรอดชีวิตสูงสุด (63.48%) ภายใต้การเก็บรักษาเชื้อผงที่อุณหภูมิ 4°C และ 30°C เป็นเวลา 6 เดือน พบว่าเซลล์รอดชีวิตสูงกว่าเมื่อเก็บที่อุณหภูมิต่ำ นอกจากนี้พบว่าการทำแห้งแบบพ่นฝอยและการเก็บรักษาไม่มีผลต่อความสามารถในการผลิตสารยับยั้ง การศึกษาในสัตว์ทดลอง ศึกษาผลของ B17, B21 และ B25 ต่อการรอดชีวิตของกุ้งกุลาดำ ใส่เซลล์ของแบคทีเรียทดสอบในอาหารกุ้งที่ความเข้มข้น  $10^8$  และ  $10^6$  cfu/g หลังจากการทดลองให้อาหารกุ้งที่มี *Bacillus* spp. และไม่มี (กลุ่มควบคุม) เป็นเวลา 28 วัน และทำให้ติดโรคด้วย *V. harveyi* VH05 พบว่ากลุ่มที่ได้รับเชื้อปริมาณ  $10^8$  cfu/g มีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่า กลุ่มที่ได้รับเชื้อปริมาณ  $10^6$  cfu/g อย่างไรก็ตาม B17 มีศักยภาพสูงสุดที่ยับยั้งเชื้อก่อโรค กลุ่มที่ได้รับ B17 ลดอัตราการตายเหลือ 23.08-42.86% ซึ่งขึ้นกับความเข้มข้นของเชื้อ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีอัตราการตายเท่ากับ 69.23% ผลการทดลองเป็นไปในทำนองเดียวกันกับการใช้ B17 ที่ผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอย พบว่ากุ้งกุลาดำมีการรอดชีวิตที่ไม่แตกต่างกัน (70.83-54.55%)

Vichai Domrongpokkaphan 2009: Strain Selection and Production of *Bacillus* spp. against *Vibrio* spp. for Black Tiger Shrimp Cultivation. Doctor of Philosophy (Biotechnology), Major Field: Biotechnology, Department of Biotechnology. Thesis Advisor: Associate Professor Penkhae Wanchaitanawong, Ph.D. 200 pages.

Twenty-five isolates of *Bacillus* spp. from hepatopancreas of black tiger shrimp were screened for their antimicrobial activity against ten strains of shrimp pathogenic *Vibrio* spp. by agar well diffusion assay. Four isolates of B17, B19, B21 and B25 which were identified as *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens* and *B. megaterium* were found to against all pathogenic strains with the average diameter of inhibition zones ranging from 1.03 to 2.20 cm and the minimum inhibitory concentration (MIC) was  $5.0 \times 10^7$ ,  $5.0 \times 10^7$ ,  $5.0 \times 10^7$  and  $5.0 \times 10^6$  cfu/ml, respectively. Moreover, the MIC was determined by co-culture method in nutrient broth. B17 and B21 exhibited the growth inhibition of *V. harveyi* VH05 with MIC of  $5.0 \times 10^6$  and  $5.0 \times 10^7$  cfu/ml, respectively. Furthermore, the optimal condition for the growth of B17, B19, B21 and B25 were investigated in shake flask. It was found that modified molass medium with Sandril salt and 5% monosodium glutamate with addition of 0 to 15 g/l NaCl was suitable for their growth at 30 °C to 37 °C. The effect of pH on growth of B17, B21 and B25 was also investigated in 2 litre fermentor. The pH 6.0 was found to be optimum for their growth with the maximum specific growth rate of 0.4985, 0.4387 and 0.4938 h<sup>-1</sup>, respectively. Spray drying of B17 with different growth media, growth phase and carriers were studied. After spray drying the highest survival rate of 9.28% was obtained from the cultivation of culture for 36 h in nutrient broth. Combination of 15% maltodextrin and 5% monosodium glutamate as carrier media showed the highest survival rate (63.48%) after spray drying. Under storage at 4 °C and 30 °C for 6 months, the results showed that the strain could survive better at lower storage temperature. Moreover, the spray drying and storage had no effect on the ability of the strain to produce antimicrobial substances. *In vivo* studies, the effect of B17, B21 and B25 on survival of black tiger shrimp was examined. Fresh cells of each strain were added to shrimp diets with 10<sup>8</sup> and 10<sup>6</sup> cfu/g. After a 28-day feeding trial with *Bacillus* supplemented and non-supplemented (control) feeds and challenging shrimps with *V. harveyi* VH05, the treatment group with 10<sup>8</sup> cfu/g exhibited higher survival than that with 10<sup>6</sup> cfu/g. However, B17 has the highest potential application for controlling the pathogen. The treatment with B17 decreased final mortality to 23.08-42.86% depending on cell concentration, compared with 69.23% in the control group. Similar results were observed when spray-dried B17 was used. Shrimp exhibited no difference in survival (70.83-54.55%).

---

Student's signature

---

Thesis Advisor's signature

\_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

## กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. เพ็ญแข วันไชยชนวงศ์ ประธานกรรมการที่ปรึกษาที่ได้ให้คำแนะนำและแก้ไขปัญหาในการทำวิทยานิพนธ์มาโดยตลอด ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ กรรมการวิชาเอก รองศาสตราจารย์ ดร. วิเชียร กิจปรีชาวิช กรรมการวิชารอง และรองศาสตราจารย์ ดร.อรพินท์ จินตสถาพร ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณอาจารย์และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ของภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์เป็นอย่างดี ขอขอบคุณภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และสถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อแบคทีเรียในการทำวิทยานิพนธ์

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อและคุณแม่ ที่สนับสนุนและให้กำลังใจในการศึกษาตลอดมา

วิชัย ดำรงโกกัณฑ์

กันยายน 2552

## สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	2
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	22
อุปกรณ์	22
วิธีการ	23
ผลและการวิจารณ์	33
สรุปผลการทดลอง	113
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	115
ภาคผนวก	140
ภาคผนวก ก   สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีวิเคราะห์	141
ภาคผนวก ข   ตารางผนวก	147
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	200

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	กิจกรรมการยับยั้ง <i>Vibrio</i> spp. ของ <i>Bacillus</i> spp. โดยวิธี agar well diffusion	34
2	ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ B17 ที่ยับยั้ง <i>Vibrio</i> spp. โดยวิธี agar well diffusion	40
3	ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ B19 ที่ยับยั้ง <i>Vibrio</i> spp. โดยวิธี agar well diffusion	41
4	ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ B21 ที่ยับยั้ง <i>Vibrio</i> spp. โดยวิธี agar well diffusion	42
5	ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ B25 ที่ยับยั้ง <i>Vibrio</i> spp. โดยวิธี agar well diffusion	43
6	เปรียบเทียบค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ B17, B19, B21 และ B25 ที่ยับยั้ง <i>Vibrio</i> spp. โดยวิธี agar well diffusion	44
7	ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ B17, B21 และ B25 ที่ยับยั้งการเติบโตของ VH05	56
8	อัตราการเติบโตจำเพาะและปริมาณเซลล์สูงสุดของ <i>Bacillus</i> spp. ในอาหารตัดแปร	66
9	ผลการใช้ผง B17 เป็นหัวเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างง่าย	83

## ตารางผนวกที่

ข1	ปริมาณ VH05 จากการใช้ B17 ยับยั้ง VH05 โดยวิธี co-culture	148
ข2	ปริมาณ VH05 จากการใช้ B21 ยับยั้ง VH05 โดยวิธี co-culture	149
ข3	ปริมาณ VH05 จากการใช้ B25 ยับยั้ง VH05 โดยวิธี co-culture	150
ข4	ปริมาณ B17 จากการใช้ B17 ยับยั้ง VH05 โดยวิธี co-culture	151
ข5	ปริมาณ B21 จากการใช้ B21 ยับยั้ง VH05 โดยวิธี co-culture	151
ข6	ปริมาณ B25 จากการใช้ B25 ยับยั้ง VH05 โดยวิธี co-culture	152
ข7	ผลการเพาะเลี้ยง B17 ใน M+NaCl	153
ข8	ผลการเพาะเลี้ยง B17 ใน M+S+Mo	154
ข9	ผลการเพาะเลี้ยง B17 ใน Su+S+Mo	155
ข10	ผลการเพาะเลี้ยง B17 ใน Su+S+diAm	156
ข11	ผลการเพาะเลี้ยง B19 ใน M+NaCl	157
ข12	ผลการเพาะเลี้ยง B19 ใน M+S+Mo	158
ข13	ผลการเพาะเลี้ยง B19 ใน Su+S+Mo	159

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
ข14 ผลการเพาะเลี้ยง B19 ใน Su+S+diAm	160
ข15 ผลการเพาะเลี้ยง B21 ใน M+NaCl	161
ข16 ผลการเพาะเลี้ยง B21 ใน M+S+Mo	162
ข17 ผลการเพาะเลี้ยง B21 ใน Su+S+Mo	163
ข18 ผลการเพาะเลี้ยง B21 ใน Su+S+diAm	164
ข19 ผลการเพาะเลี้ยง B25 ใน M+NaCl	165
ข20 ผลการเพาะเลี้ยง B25 ใน M+S+Mo	166
ข21 ผลการเพาะเลี้ยง B25 ใน Su+S+Mo	167
ข22 ผลการเพาะเลี้ยง B25 ใน Su+S+diAm	168
ข23 ผลการเพาะเลี้ยง B17 ในถังหมัก แบบควบคุมพีเอชที่ 5.0	169
ข24 ผลการเพาะเลี้ยง B17 ในถังหมัก แบบควบคุมพีเอชที่ 6.0	170
ข25 ผลการเพาะเลี้ยง B17 ในถังหมัก แบบควบคุมพีเอชที่ 7.0	171
ข26 ผลการเพาะเลี้ยง B21 ในถังหมัก แบบควบคุมพีเอชที่ 5.0	172
ข27 ผลการเพาะเลี้ยง B21 ในถังหมัก แบบควบคุมพีเอชที่ 6.0	173
ข28 ผลการเพาะเลี้ยง B21 ในถังหมัก แบบควบคุมพีเอชที่ 7.0	174
ข29 ผลการเพาะเลี้ยง B25 ในถังหมัก แบบควบคุมพีเอชที่ 5.0	175
ข30 ผลการเพาะเลี้ยง B25 ในถังหมัก แบบควบคุมพีเอชที่ 6.0	176
ข31 ผลการเพาะเลี้ยง B25 ในถังหมัก แบบควบคุมพีเอชที่ 7.0	177
ข32 ผลการเพาะเลี้ยง B17 ใน NB	178
ข33 ผลการเพาะเลี้ยง B19 ใน NB	179
ข34 ผลการเพาะเลี้ยง B21 ใน NB	180
ข35 ผลการเพาะเลี้ยง B25 ใน NB	181
ข36 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการทำแห้งแบบพ่นฝอยของ B17	182
ข37 ผลของระยะเวลาเติบโตต่อการทำแห้งแบบพ่นฝอยของ B17	182
ข38 ผลของสารพาและสารป้องกันเซลล์ต่อการทำแห้งแบบพ่นฝอยของ B17	183
ข39 ปริมาณ VH05 จากการใช้ผง B17 ยับยั้ง VH05 โดยวิธี co-culture	184

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
ข40 ปริมาณ B17 จากการใช้ผง B17 ยับยั้ง VH05 โดยวิธี co-culture	185
ข41 ผลของสารพา สารป้องกันเซลล์และอุณหภูมิต่อการรอดชีวิตของ B17 ในช่วงการเก็บรักษา	185
ข42 ผลของสารพา สารป้องกันเซลล์และอุณหภูมิต่อกิจกรรมการยับยั้งของ B17 ในช่วงการเก็บรักษา	186
ข43 ผลของสารพา สารป้องกันเซลล์และอุณหภูมิต่อปริมาณความชื้นของผง B17 ในช่วงการเก็บรักษา	186
ข44 ผลของ <i>Bacillus</i> spp. โดยวิธีเติมลงน้ำต่อปริมาณแบคทีเรียในตับของกึ่งกุลาดำ ที่รอดชีวิต	187
ข45 ผลของ <i>Bacillus</i> spp. โดยวิธีเติมลงน้ำต่อน้ำหนักกึ่งกุลาดำ	187
ข46 ผลของ <i>Bacillus</i> spp. โดยวิธีเติมลงน้ำต่อการรอดชีวิตของกึ่งกุลาดำ	187
ข47 ผลของ <i>Bacillus</i> spp. โดยวิธีผสมอาหารต่อปริมาณแบคทีเรียในตับของกึ่งกุลาดำ ที่ตาย	188
ข48 ผลของ <i>Bacillus</i> spp. โดยวิธีผสมอาหารต่อปริมาณแบคทีเรียในตับของกึ่งกุลาดำ ที่รอดชีวิต	188
ข49 ผลของ <i>Bacillus</i> spp. โดยวิธีผสมอาหารต่อน้ำหนักกึ่งกุลาดำ	189
ข50 ผลของ <i>Bacillus</i> spp. โดยวิธีผสมอาหารต่อการรอดชีวิตของกึ่งกุลาดำ	189
ข51 ผลของผง B17 ต่อปริมาณแบคทีเรียในตับของกึ่งกุลาดำที่ตาย	190
ข52 ผลของผง B17 ต่อปริมาณแบคทีเรียในตับของกึ่งกุลาดำที่รอดชีวิต	190
ข53 ผลของผง B17 ต่อน้ำหนักกึ่งกุลาดำ	190
ข54 ผลของผง B17 ต่อการรอดชีวิตของกึ่งกุลาดำ	191
ข55 ผลการจัดจำแนก B17 ด้วยระบบจัดจำแนกชนิดจุลินทรีย์ เอ พี ไอ	192
ข56 ผลการจัดจำแนก B19 ด้วยระบบจัดจำแนกชนิดจุลินทรีย์ เอ พี ไอ	194
ข57 ผลการจัดจำแนก B21 ด้วยระบบจัดจำแนกชนิดจุลินทรีย์ เอ พี ไอ	196
ข58 ผลการจัดจำแนก B25 ด้วยระบบจัดจำแนกชนิดจุลินทรีย์ เอ พี ไอ	198

## สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 ผลของ <i>Bacillus</i> spp. ที่ยับยั้ง <i>Vibrio</i> spp. โดยวิธี agar well diffusion	33
2 ผลของ B17 ปริมาณ $10^6$ (A), $10^7$ (B) และ $10^8$ cfu/ml (C) ต่อการยับยั้ง VH05 ( $10^2$ cfu/ml)	47
3 ผลของ B17 ปริมาณ $10^6$ (A), $10^7$ (B) และ $10^8$ cfu/ml (C) ต่อการยับยั้ง VH05 ( $10^4$ cfu/ml)	48
4 ผลของ B17 ปริมาณ $10^6$ (A), $10^7$ (B) และ $10^8$ cfu/ml (C) ต่อการยับยั้ง VH05 ( $10^6$ cfu/ml)	49
5 ผลของ B21 ปริมาณ $10^6$ (A), $10^7$ (B) และ $10^8$ cfu/ml (C) ต่อการยับยั้ง VH05 ( $10^2$ cfu/ml)	50
6 ผลของ B21 ปริมาณ $10^6$ (A), $10^7$ (B) และ $10^8$ cfu/ml (C) ต่อการยับยั้ง VH05 ( $10^4$ cfu/ml)	51
7 ผลของ B21 ปริมาณ $10^6$ (A), $10^7$ (B) และ $10^8$ cfu/ml (C) ต่อการยับยั้ง VH05 ( $10^6$ cfu/ml)	52
8 ผลของ B25 ปริมาณ $10^6$ (A), $10^7$ (B) และ $10^8$ cfu/ml (C) ต่อการยับยั้ง VH05 ( $10^2$ cfu/ml)	53
9 ผลของ B25 ปริมาณ $10^6$ (A), $10^7$ (B) และ $10^8$ cfu/ml (C) ต่อการยับยั้ง VH05 ( $10^4$ cfu/ml)	54
10 ผลของ B25 ปริมาณ $10^6$ (A), $10^7$ (B) และ $10^8$ cfu/ml (C) ต่อการยับยั้ง VH05 ( $10^6$ cfu/ml)	55
11 ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเติบโตของ <i>Bacillus</i> spp.	57
12 ผลของอุณหภูมิต่อการเติบโตของ <i>Bacillus</i> spp.	59
13 ผลของอาหารตัดแปรต่อการเติบโตของ B17	62
14 ผลของอาหารตัดแปรต่อการเติบโตของ B19	63
15 ผลของอาหารตัดแปรต่อการเติบโตของ B21	64
16 ผลของอาหารตัดแปรต่อการเติบโตของ B25	65
17 ผลของพีเอชต่อการเติบโตของ B17	68

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
18 ผลของพีเอชต่อการเติบโตของ B21	69
19 ผลของพีเอชต่อการเติบโตของ B25	70
20 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาณเซลล์มีชีวิตของ B17	73
21 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่ออัตราการรอดชีวิตของ B17 และความชื้นของเชื้อผง	73
22 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อกิจกรรมการยับยั้ง VH05	75
23 ผลของระยะเวลาเพาะเลี้ยงเชื้อต่อปริมาณเซลล์มีชีวิตของ B17	76
24 ผลของระยะเวลาเพาะเลี้ยงเชื้อต่ออัตราการรอดชีวิตของ B17 และความชื้นของเชื้อผง	77
25 ผลของระยะเวลาเพาะเลี้ยงเชื้อต่อกิจกรรมการยับยั้ง VH05	77
26 ผลของสารตัวพาและสารป้องกันเซลล์ต่อการทำแห้งแบบพ่นฝอยของ B17	79
27 ผลของสารตัวพาและสารป้องกันเซลล์ต่อกิจกรรมการยับยั้ง <i>V. harveyi</i> VH05	82
28 ผลของสารตัวพาและสารป้องกันเซลล์ต่ออัตราการรอดชีวิตของ B17 และความชื้นของเชื้อผง	82
29 ผลของผง B17 ปริมาณ $10^5$ (A), $10^6$ (B) และ $10^7$ cfu/ml (C) ต่อการยับยั้ง VH05 ( $10^2$ cfu/ml)	86
30 ผลของผง B17 ปริมาณ $10^5$ (A), $10^6$ (B) และ $10^7$ cfu/ml (C) ต่อการยับยั้ง VH05 ( $10^4$ cfu/ml)	87
31 ผลของผง B17 ปริมาณ $10^5$ (A), $10^6$ (B) และ $10^7$ cfu/ml (C) ต่อการยับยั้ง VH05 ( $10^6$ cfu/ml)	88
32 ผลของ 20% Maltodextrin (A), 20% milk powder (B), 15% maltodextrin ผสม 5% monosodium glutamate (C) และอุณหภูมิต่อปริมาณเซลล์มีชีวิตของ B17 ในช่วงการเก็บรักษา	90
33 ผลของสารพา สารป้องกันเซลล์และอุณหภูมิต่ออัตราการรอดชีวิตของ B17 ในช่วงการเก็บรักษา	91
34 ผลของ <i>Bacillus</i> spp. โดยวิธีเติมลงน้ำต่อน้ำหนักกึ่งกุกูลาค่า	94
35 ผลของ <i>Bacillus</i> spp. โดยวิธีเติมลงน้ำต่อการรอดชีวิตของกึ่งกุกูลาค่า	95

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
36 ผลของ <i>Bacillus</i> spp. โดยวิธีเติมลงน้ำต่อปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด ในต๊ับกุ้งกุลาดำที่รอด	96
37 ผลของ <i>Bacillus</i> spp. โดยวิธีเติมลงน้ำต่อปริมาณ <i>Vibrio</i> spp. ในต๊ับของกุ้งกุลาดำที่รอด	97
38 ผลของ <i>Bacillus</i> spp. โดยวิธีผสมอาหาร ต่อน้ำหนักกุ้งกุลาดำ	99
39 ผลของ <i>Bacillus</i> spp. โดยวิธีผสมอาหาร ต่อการรอดชีวิตของกุ้งกุลาดำ	101
40 ผลของ <i>Bacillus</i> spp. โดยวิธีผสมอาหาร ต่อปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด ในต๊ับของกุ้งกุลาดำ	102
41 ผลของ <i>Bacillus</i> spp. โดยวิธีผสมอาหาร ต่อปริมาณ <i>Vibrio</i> spp. ในต๊ับของกุ้งกุลาดำที่รอดชีวิตหลังจากการทำให้กุ้งกุลาดำติดโรค	103
42 ผลของ <i>Bacillus</i> spp. โดยวิธีผสมอาหาร ต่อปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด ในต๊ับของกุ้งกุลาดำที่ตายหลังจากการทำให้กุ้งกุลาดำติดโรค	105
43 ผลของ <i>Bacillus</i> spp. โดยวิธีผสมอาหาร ต่อปริมาณ <i>Vibrio</i> spp. ในต๊ับของกุ้งกุลาดำที่ตายหลังจากการทำให้กุ้งกุลาดำติดโรค	105
44 ผลของผง B17 ต่อน้ำหนักกุ้งกุลาดำ	107
45 ผลของผง B17 ต่อการรอดชีวิตของกุ้งกุลาดำ	107
46 ผลของผง B17 ต่อปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในต๊ับของกุ้งกุลาดำที่ตาย หลังจากการทำให้กุ้งกุลาดำติดโรค	108
47 ผลของผง B17 ต่อปริมาณ <i>Vibrio</i> spp. ในต๊ับของกุ้งกุลาดำที่ตายหลัง จากการทำให้กุ้งกุลาดำติดโรค	109
48 ผลของผง B17 ต่อปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในต๊ับของกุ้งกุลาดำที่รอดชีวิต จากการทำให้กุ้งกุลาดำติดโรค	110
49 ผลของผง B17 ต่อปริมาณ <i>Vibrio</i> spp. ในต๊ับของกุ้งกุลาดำที่รอดชีวิต จากการทำให้กุ้งกุลาดำติดโรค	111

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า	
ก1	ถึงหมักขนาด 2 ลิตร (New Brunswick Scientific, NJ, USA)	146
ก2	เครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอยระดับนำร่อง (Niro A/S, Denmark)	146
ข1	ผลการเพาะเลี้ยง B17 ใน M+NaCl	153
ข2	ผลการเพาะเลี้ยง B17 ใน M+S+Mo	154
ข3	ผลการเพาะเลี้ยง B17 ใน Su+S+Mo	155
ข4	ผลการเพาะเลี้ยง B17 ใน Su+S+diAm	156
ข5	ผลการเพาะเลี้ยง B19 ใน M+NaCl	157
ข6	การเพาะเลี้ยง B19 ใน M+S+Mo	158
ข7	ผลการเพาะเลี้ยง B19 ใน Su+S+Mo	159
ข8	ผลการเพาะเลี้ยง B19 ใน Su+S+diAm	160
ข9	ผลการเพาะเลี้ยง ใน M+NaCl	161
ข10	ผลการเพาะเลี้ยง B21 ใน M+S+Mo	162
ข11	ผลการเพาะเลี้ยง B21 ใน Su+S+Mo	163
ข12	ผลการเพาะเลี้ยง B21 ใน Su+S+diAm	164
ข13	ผลการเพาะเลี้ยง B25 ใน M+NaCl	165
ข14	ผลการเพาะเลี้ยง B25 ใน M+S+Mo	166
ข15	ผลการเพาะเลี้ยง B25 ใน Su+S+Mo	167
ข16	ผลการเพาะเลี้ยง B25 ใน Su+S+diAm	168
ข17	ผลการเพาะเลี้ยง B17 ในถึงหมัก แบบควบคุมพีเอชที่ 5.0	169
ข18	ผลการเพาะเลี้ยง B17 ในถึงหมัก แบบควบคุมพีเอชที่ 6.0	170
ข19	ผลการเพาะเลี้ยง B17 ในถึงหมัก แบบควบคุมพีเอชที่ 7.0	171
ข20	ผลการเพาะเลี้ยง B21 ในถึงหมัก แบบควบคุมพีเอชที่ 5.0	172
ข21	ผลการเพาะเลี้ยง B21 ในถึงหมัก แบบควบคุมพีเอชที่ 6.0	173
ข22	ผลการเพาะเลี้ยง B21 ในถึงหมัก แบบควบคุมพีเอชที่ 7.0	174
ข23	ผลการเพาะเลี้ยง B25 ในถึงหมัก แบบควบคุมพีเอชที่ 5.0	175
ข24	ผลการเพาะเลี้ยง B25 ในถึงหมัก แบบควบคุมพีเอชที่ 6.0	176

## สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
ข25 ผลการเพาะเลี้ยง B25 ในถังหมัก แบบควบคุมพีเอชที่ 7.0	177
ข26 ผลการเพาะเลี้ยง B17 ใน NB	178
ข27 ผลการเพาะเลี้ยง B19 ใน NB	179
ข28 ผลการเพาะเลี้ยง B21 ใน NB	180
ข29 ผลการเพาะเลี้ยง B25 ใน NB	181

## การคัดเลือกสายพันธุ์และการผลิตบาซิลลัสต้านไวรัสสำหรับการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

### Strain Selection and Production of *Bacillus* spp. against *Vibrio* spp. for Black Tiger Shrimp Cultivation

#### คำนำ

ประเทศไทยเป็นผู้นำด้านการผลิตและการส่งออกกุ้งทะเลโดยเฉพาะกุ้งกุลาดำ ในรูปของ กุ้งแช่แข็งและผลิตภัณฑ์แปรรูปมากกว่า 20 ปี ทำรายได้เป็นอันดับต้นๆ ของสินค้าส่งออกของประเทศตั้งแต่ปี 2536 เป็นต้นมา ในแต่ละปีมีการผลิตและส่งออกกุ้งแช่แข็งและผลิตภัณฑ์แปรรูปไม่ต่ำกว่า 200,000 ตัน (สำนักเศรษฐกิจการเกษตร, 2545) โดยมีประเทศที่นำเข้ากุ้งเป็นอันดับหนึ่งคือ สหรัฐอเมริกา รองลงมาคือญี่ปุ่น และประเทศในกลุ่มสหภาพยุโรป (EU) (Leung and Engle, 2006) การพัฒนาเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำก้าวหน้าไปอย่างรวดเร็ว เปลี่ยนแปลงจากการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบธรรมชาติซึ่งให้ผลผลิตต่ำ ไปเป็นแบบกึ่งพัฒนาและแบบพัฒนา ซึ่งให้ผลผลิตและผลตอบแทนสูงกว่า (Smith, 1999; Huitric *et al.*, 2002) การเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบพัฒนาเป็นการเพาะเลี้ยงแบบหนาแน่น มีปริมาณกุ้งกุลาดำในบ่อเพาะเลี้ยงมาก ทำให้มีปัญหาของมลภาวะทางน้ำทั้งทางด้านสิ่งแวดล้อมและโรคระบาด โดยเฉพาะโรคที่เกิดจาก *Vibrio* ซึ่งโรคที่สำคัญที่สุดคือโรคเรืองแสงหรือโรคเพชรพลอยที่เกิดจาก *Vibrio harveyi* การแก้ปัญหาเกษตรกรจะใช้คลอรีนผงหรือใช้สารปฏิชีวนะ ได้แก่ คลอแรมฟินิคอล ซัลฟา ฟลูออโรควิโนโลน ไนโตรฟูแรน นอร์ฟล็อกซาซิน เป็นต้น ทำให้เกิดการดื้อยาและสารตกค้างในกุ้งกุลาดำ ส่งผลเสียหายตามมามากมายทั้งต่อผู้บริโภคและการส่งออก (พรเลิศและคณะ, 2537; ชลอ, 2543; Zanetti *et al.*, 2001) มีการวิจัยเพื่อศึกษาการใช้สมุนไพรและสารชีวภาพอื่นๆ เพื่อทดแทนสารปฏิชีวนะและสร้างเสริมความแข็งแรงของกุ้งกุลาดำ โดยเฉพาะโปรไบโอติกซึ่งมีรายงานว่าสามารถควบคุมโรคและส่งเสริมการเติบโตของกุ้งกุลาดำได้ดี (Rengpipat *et al.*, 1998; Vasecharan and Ramasamy, 2003)

งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาการคัดเลือก *Bacillus* ที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้ง *Vibrio* ก่อโรคในกุ้งกุลาดำ ผลิต *Bacillus* ในอาหารต้นทุนต่ำ และทำเป็นสูตรสำเร็จโดยการทำแห้งแบบพ่นฝอยเพื่อสะดวกในการนำไปใช้ควบคุมโรคเรืองแสงในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ แทนการใช้สารเคมีหรือสารปฏิชีวนะ

## วัตถุประสงค์

1. ศึกษาการคัดเลือก *Bacillus* จากคับกุ้งกุลาดำที่ยับยั้งการเติบโตของ *Vibrio*
2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต *Bacillus*
3. ศึกษาการทำแห้งแบบพ่นฝอยและศึกษาเสถียรภาพของผง *Bacillus*
4. ศึกษาประสิทธิภาพของผง *Bacillus* ยับยั้งการเติบโตของ *Vibrio* ก่อโรคในกุ้งกุลาดำ

## การตรวจเอกสาร

### 1. บทบาทของโปรไบโอติก ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

โปรไบโอติก คือจุลินทรีย์มีชีวิต เมื่อได้รับโดยการกินในจำนวนที่เหมาะสม จะเป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ (FAO/WHO, 2001) หรือ คือ จุลินทรีย์มีชีวิต เมื่อกินเป็นอาหารเสริมจะเป็นประโยชน์ต่อสุขภาพของสัตว์ โดยช่วยรักษาหรือปรับปรุงให้มีความสมดุลของจุลินทรีย์ในทางเดินอาหาร (Fuller, 1989) โปรไบโอติกมีบทบาทอย่างมากต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ช่วยควบคุมปริมาณเชื้อก่อโรคด้วยการแข่งขันแย่งจับผนังทางเดินอาหาร และแย่งสารอาหารหรือสร้างสารยับยั้งเชื้อก่อโรค ช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันโรค ช่วยในการเติบโตของสัตว์น้ำโดยสร้างเอนไซม์ช่วยย่อยอาหารและสารช่วยในการเติบโต รวมทั้งช่วยปรับปรุงคุณภาพน้ำ (Balcazar *et al.*, 2006; Gomez-Gil *et al.*, 2000; Verschuere *et al.*, 2000)

#### 1.1 การแข่งขันและยับยั้งเชื้อก่อโรค

โปรไบโอติกแข่งขันแย่งจับผนังทางเดินอาหารของสัตว์น้ำ เพื่อป้องกันหรือลดปริมาณเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหาร รวมทั้งแย่งสารอาหารเชื้อก่อโรคทั้งจากแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน Balcazar *et al.* (2007a) ศึกษาการยึดเกาะผนังลำไส้ของแบคทีเรียกรดแลคติกและแบคทีเรียก่อโรคในปลาปลาเทราท์สายรุ้ง (rainbow trout: *Oncorhynchus mykiss*) โดยตรึงสารเมือกจากลำไส้ปลาในจานหลุม (microtiter plate wells) แล้วเติมแบคทีเรียกรดแลคติกหรือแบคทีเรียก่อโรคที่ติดฉลากด้วยรังสี พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติก 3 ชนิด คือ *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* CLFP100, *L. lactis* subsp. *Cremoris* CLFP102 และ *Lb. curvatus* CLFP150) สามารถยึดเกาะได้ 16.2–19.5% ในขณะที่แบคทีเรียก่อโรค *Yersinia ruckeri* ATCC 29473, *Carnobacterium piscicola* CLFP 601, *Aeromonas salmonicida* และ *L. garvieae* CLFP LG1 สามารถยึดเกาะได้ 0.5-12.2% ซึ่งการยึดติดของเชื้อก่อโรคที่สารเมือกของลำไส้ปลาได้นี้เอง ทำให้เกิดการติดเชื้อในปลาได้

นอกจากนี้ยังทดสอบการแย่งจับผนังลำไส้โดยแบคทีเรียกรดแลคติก พบว่าการยึดติดผนังลำไส้ของแบคทีเรียก่อโรคลดลงเท่ากับ 68.80-35.54%, 51.82-45.11%, 74.03- 65.28% และ 52.98-48.57% ตามลำดับ ดังนั้นจะเห็นว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่ใช้เป็นโปรไบโอติก สามารถช่วยลดการยึดเกาะของแบคทีเรียก่อโรคในลำไส้ปลาได้

นอกจากนี้โปรไบโอติกยังสร้างสารยับยั้งเพื่อป้องกันไม่ให้เชื้อก่อโรคเพิ่มจำนวน เช่น แบคทีเรียโอซิน เอนไซม์โปรติเอส ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และกรดอินทรีย์ เป็นต้น (Moriarty, 1998; Gomez *et al.*, 2007) ตัวอย่างเช่น Chythanya *et al.* (2002) พบว่า *Pseudomonas* I-2 ผลิตสารยับยั้งที่มีมวลโมเลกุลต่ำ ทนความร้อน ละลายได้ใน chloroform และทนต่อ proteolytic enzymes สามารถยับยั้ง *Vibrio harveyi*, *V. fluvialis*, *V. parahaemolyticus*, *V. damsela* และ *V. vulnificus* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในกุ้งกุลาดำได้ Sugita *et al.* (1998) พบว่า *Bacillus* sp. strain NM12 ที่คัดแยกจากลำไส้ปลา สามารถผลิตสารที่ยับยั้งการเติบโตของเชื้อ *V. vulnificus* ได้ สารดังกล่าวมีสมบัติไม่ทนความร้อน มีมวลโมเลกุลน้อยกว่า 5 kDa

Villamil *et al.* (2003) พบว่ากรดแลคติกที่ผลิตโดย *Lb. casei* (CECT 4043), *Lb. brevis* (CECT 815), *Lb. helveticus* (CECT 514), *L. lactis* spp. *lactis* (CECT 539), *Leuconostoc mesenteroides* spp. *mesenteroides* (CECT 4046) และ *Pediococcus acidilactici* (NRRL B-5627) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *V. alginolyticus* ได้ และให้ผลการยับยั้งได้ใกล้เคียงกับการใช้กรดแลคติกปริมาณ 0.05-0.1 g/l และ Vijayan *et al.* (2006) พบว่าโปรไบโอติก *Pseudomonas* sp PS-102 สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในกุ้ง ได้แก่ *Aeromonas* spp., *V. harveyi*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* และ *V. fluvialis* โดยสารยับยั้งมีสมบัติทนความร้อนและทนต่อ proteolytic enzymes

## 1.2 ส่งเสริมการสร้างภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำ

ปลา กุ้งและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังมีระบบภูมิคุ้มกัน แต่ไม่พัฒนาเหมือนในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง ระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำส่วนใหญ่จึงเป็นแบบ nonspecific immune responses หรือภูมิคุ้มกันตอบสนองแบบไม่เจาะจง ตัวอย่างเช่น ปลาเทราท์สายรุ้งที่ได้รับโปรไบโอติก *Lb. rhamnosus* เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จากการตรวจเลือดพบว่า ปลามีระดับภูมิคุ้มกันที่เพิ่มสูงขึ้น เมื่อเทียบกับปลาที่ไม่ได้รับโปรไบโอติก (Nikoskelainen *et al.*, 2003) ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Nikoskelainen *et al.* (2003) ที่ให้ปลาเทราท์สายรุ้ง กิน *Lb. rhamnosus* (ATCC 53103) ที่ผสมในอาหารเป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่าปลามี immunoglobulin ในน้ำเหลืองเพิ่มสูงขึ้น การทดลองในกุ้งกุลาดำ พบว่ากุ้งที่ได้รับ *Pseudomonas* sp. PM11 ปริมาณ  $10^3$  cfu/ml เป็นเวลา 45 วัน กุ้งกุลาดำมีระดับภูมิคุ้มกันแบบไม่เจาะจงสูงขึ้น โดยดูจากปริมาณ hemocytes, phenoloxidase และ haemolymph antibacterial (Alavandi *et al.*, 2004)

Salinas *et al.* (2005) ให้ปลาถิ่น *L. delbrueckii* ssp. *lactis* ( $10^7$  cfu/g), *B. subtilis* ( $10^7$  cfu/g) และเชื้อผสม *L. delbrueckii* ssp. *lactis* ( $5 \times 10^6$  cfu/g) กับ *B. subtilis* ( $5 \times 10^6$  cfu/g) เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่าปลามีระดับภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้นในทุกกลุ่มที่ให้โปรไบโอติก โดยมี leucocy (leucocyte peroxidase content) เพิ่มขึ้นตั้งแต่สัปดาห์แรกจนถึงสัปดาห์ที่สามและหลังจากนั้นยังคงอยู่ต่อไป ส่วน phagocyte (phagocytosis) เพิ่มขึ้นมากในช่วงที่ให้โปรไบโอติกตั้งแต่สัปดาห์แรกจนถึงสัปดาห์ที่สาม แต่หลังจากหยุดให้โปรไบโอติกปลาที่มี phagocyte ลดลง ในทำนองเดียวกันการทดลองในกุ้ง Rengpipat *et al.* (2000) เลี้ยงกุ้งกุลาดำโดยให้ *Bacillus* S11 ผสมกับอาหารเป็นระยะเวลา 90 วัน วัดระดับภูมิคุ้มกันในกุ้ง พบว่ากุ้งมีค่า phagocytic index (PI) สูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับโปรไบโอติก

### 1.3 เอนไซม์ช่วยย่อยอาหารและสารที่ช่วยในการเติบโต

โปรไบโอติกบางชนิดสามารถสร้างเอนไซม์ช่วยย่อยอาหาร เช่น โปรติเอส ไลเปส และอะไมเลส เป็นต้น และสร้างสารที่ช่วยในการเติบโตประเภทวิตามินและกรดอะมิโน ที่จำเป็นต่อการเติบโตของสัตว์น้ำ (Balcazar *et al.*, 2006) ตัวอย่างเช่น ดอกรักและคณะ (2547) พบว่า *Bacillus* spp. STG16B, SB22, SB11 และ SB12 ที่คัดแยกได้จากลำไส้กุ้งกุลาดำและตะกอนดินในบ่อเลี้ยงสามารถผลิตโปรติเอสและอะไมเลสได้ เช่นเดียวกับ Ziaei-Nejad *et al.* (2006) พบว่าภายในทางเดินอาหารของ *Fenneropenaeus indicus* ที่ได้รับโปรไบโอติก *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. polymyxa*, *B. laterosporus* และ *B. circulans* มีเอนไซม์โปรติเอส ไลเปสและอะไมเลส เพิ่มมากขึ้นกว่ากุ้งที่ไม่ได้รับโปรไบโอติก นอกจากนี้ *Litopenaeus stylirostris* ที่ได้รับแบคทีเรียกรดแลคติก *Pediococcus acidilactici* เป็นเวลา 10 สัปดาห์ พบว่ามีกิจกรรมของอะไมเลสเพิ่มขึ้น 35% (Castex *et al.*, 2008)

### 1.4 ปรับปรุงคุณภาพน้ำ

โปรไบโอติกหลายชนิดสามารถช่วยปรับปรุงคุณภาพน้ำได้ โดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวกสามารถเปลี่ยนสารอินทรีย์ไปเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ ช่วยป้องกันไม่ให้เกิดการสะสมของสารอินทรีย์มากเกินไปในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำ ซึ่งเป็นสาเหตุให้น้ำเน่าเสียและอาจทำให้เกิดการบูมของ phytoplankton ส่งผลให้เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในน้ำสูง (Verschuere *et al.*, 2000) นอกจากนี้ Li *et al.* (2006) พบว่า *Arthrobacter* XE-7 ที่ใช้เป็นโปรไบโอ

ติกในบ่อเลี้ยง *Penaeus chinensis* สามารถเปลี่ยนแอมโมเนียเป็นไนโตร และไนเตรตได้คล้ายกับแบคทีเรียในกลุ่ม nitrifying bacteria เช่นเดียวกับ Wang and He (2009) ที่รายงานว่าหลังจากเติมโปรไบโอติกที่ประกอบด้วย *Bacillus* spp., *Nitrosomonas* spp., *Nitrobacter* spp. และ *Lactobacillus* spp. ในบ่อเลี้ยงกุ้ง *Penaeus vannamei* เป็นเวลา 60 วัน พบว่า inorganic phosphorus, organic phosphorus, total organic carbon (TOC) และ total nitrogen (TN) ในบ่อเลี้ยงกุ้งลดลง

## 2. โปรไบโอติกที่มีการใช้ในสัตว์น้ำ

โปรไบโอติกที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ได้แก่แบคทีเรียในกลุ่ม lactic acid bacteria, *Vibrio* spp., *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. และ *Alteromonas* spp. โดยมีการใช้ทั้งในกุ้ง หอย นู และปลา (Gatesoupe, 1999; Moriarty, 1997; Vijayan *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008) ตัวอย่างการใช้โปรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้แก่ การเพาะเลี้ยงปลาใช้ *Lb. splantarum* เป็นโปรไบโอติกป้องกันโรคที่เกิดจาก *V. anguillarum* ใช้ *Carnobacterium* spp. ยับยั้ง *Aeromonas hydrophila*, *A. salmonicida*, *V. anguillarum* และ *V. ordalii* การใช้ *Pseudomonas fluorescens* ยับยั้งโรคที่เกิดจาก *A. salmonicida*

การเพาะเลี้ยง *Litopenaeus vannamei* ใช้ *V. alginolyticus* ยับยั้งเชื้อ *V. parahaemolyticus* การเพาะเลี้ยง *P. monodon* ใช้ *Bacillus* spp. ยับยั้งเชื้อ *V. harveyi* การเพาะเลี้ยงปูใช้ *Thalassobacter utilis* ยับยั้งโรคที่เกิดจาก *V. anguillarum* และการเพาะเลี้ยงหอยใช้ *A. media* ยับยั้งโรคที่เกิดจาก *V. tubiashii* (Gomez *et al.*, 2007; Gomez-Gil *et al.*, 2000; Robertson *et al.*, 2000)

## 3. ผลของโปรไบโอติกต่อการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล

มีรายงานการใช้แบคทีเรียโปรไบโอติกหลายชนิดในกุ้งทะเล นอกจากโปรไบโอติกจะสามารถช่วยปกป้องกุ้งทะเลจากเชื้อก่อโรคแล้ว ยังช่วยส่งเสริมการเติบโตของกุ้งทะเลอีกด้วย ตัวอย่างเช่น *Penaeus vannamei* ที่ได้รับโปรไบโอติกผสมระหว่าง photosynthetic bacteria และ *Bacillus* spp. ปริมาณ 10 g/kg เป็นเวลา 28 วัน พบว่ากุ้งที่ได้รับโปรไบโอติกมีการเติบโตที่ดีมีน้ำหนักเพิ่มขึ้นเฉลี่ย 1.71 g เมื่อเทียบกับกุ้งที่ไม่ได้รับโปรไบโอติกที่มีน้ำหนักเฉลี่ยเพียง 1.57 g (Wang, 2007) เช่นเดียวกับ Devaraja *et al.* (2002) เพาะเลี้ยงกุ้งโดยใช้โปรไบโอติกที่ประกอบด้วย

*Bacillus* และ *Saccharomyces* sp. เป็นเวลา 110 วัน พบว่าน้ำหมักกึ่งที่ได้ต่อบ่อที่ใช้โปรไบโอติกสูงกว่ากลุ่มควบคุม

*Fenneropenaeus indicus* ที่ได้รับโปรไบโอติกที่ประกอบด้วย *Bacillus* spp. 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. polymyxa*, *B. laterosporus* และ *B. circulans* มีอัตราการรอดชีวิตเพิ่มขึ้น (11-17 %) มีน้ำหนักเพิ่มขึ้น (8-22 %) เมื่อเทียบกับกึ่งที่ไม่ได้รับโปรไบโอติก (Ziaei-Nejad *et al.*, 2006) เช่นเดียวกับ Castex *et al.* (2008) ที่ให้ *Litopenaeus stylirostris* กินอาหารผสมแบคทีเรียกรดแลคติก *Pediococcus acidilactici* เป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่ากึ่งมีอัตราการรอดชีวิตเพิ่มขึ้น 15% และมีน้ำหนักเพิ่มขึ้น 12% ในทำนองเดียวกัน Moriarty (1999) ใช้ *Bacillus* spp. เป็นโปรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงกึ่ง พบว่ากึ่งในบ่อเพาะเลี้ยงมีสุขภาพแข็งแรงดีและมีอัตราการรอดชีวิตถึง 80-100%

กึ่งทะเลที่ได้รับโปรไบโอติกเป็นระยะเวลาหนึ่ง สามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิตจากการติดเชื้อก่อโรคได้ ตัวอย่างเช่น Vaseeharan and Ramasamy (2003) เลี้ยงกึ่งกุลาดำด้วยโปรไบโอติก *B. subtilis* BT23 ปริมาณ  $10^6$ - $10^8$  cfu/ml เป็นเวลา 6 วัน แล้วทำให้ติดเชื้อด้วย *V. harveyi* ปริมาณ  $10^3$ - $10^4$  cfu/ml เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่ามีอัตราการรอดชีวิตประมาณ 90 % เช่นเดียวกับ *Litopenaeus vannamei* ที่ได้รับโปรไบโอติก *B. subtilis* UTM126, *Roseobacter gallaeciensis* SLV03 และ *Pseudomonas aestumarina* SLV22 ผสมอาหารเป็นเวลา 28 วัน พบว่ากึ่งที่ได้รับโปรไบโอติก มีอัตราการรอดชีวิตในขณะเลี้ยง (94.25, 96.00 และ 94.75% ตามลำดับ) สูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับโปรไบโอติก (89.75%) หลังจากทำให้กึ่งติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* พบว่ากึ่งที่ได้รับโปรไบโอติก มีอัตราการรอดชีวิต(81, 84 และ 79% ตามลำดับ) สูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับโปรไบโอติก (67%) (Balcazar *et al.*, 2007b)

ในทำนองเดียวกัน Rengpipat *et al.* (1998) ทดลองให้กึ่งกุลาดำกินโปรไบโอติก *Bacillus* S11 ผสมอาหาร เป็นเวลา 100 วัน พบว่ากึ่งที่ได้รับโปรไบโอติกมีการเติบโตและรอดชีวิตสูงกว่ากึ่งที่ไม่ได้รับโปรไบโอติก หลังจากทำให้กึ่งติดเชื้อด้วย *V. harveyi* พบว่ากึ่งที่ได้รับโปรไบโอติกมีอัตราการรอดชีวิต 100 % ส่วนกึ่งที่ไม่ได้รับโปรไบโอติกมีอัตราการรอดชีวิตเพียง 26 % นอกจากนี้ Meunpol *et al.* (2003) รายงานว่าการใช้โอโซนร่วมกับการใช้โปรไบโอติก *Bacillus* S11 เป็นเวลา 1 เดือนช่วยให้กึ่งกุลาดำรอดชีวิตเพิ่มขึ้นอีก

Castex *et al.* (2009) รายงานว่า *Litopenaeus stylirostris* ที่ได้รับโปรไบโอติก *Pediococcus acidilactici* ปริมาณ  $9.5 \times 10^6$  cfu/g เป็นเวลา 22 วัน สามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิต จากการทำให้กุ้งติดเชื้อด้วย *V. nigripulchritudo* โดยพบว่ากุ้งที่ได้รับโปรไบโอติกมีอัตราการรอดชีวิต 67% ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีอัตราการรอดชีวิตเพียง 47% เช่นเดียวกับ Li *et al.* (2009) ที่ให้ *Litopenaeus vannamei* กินโปรไบโอติก *B. megenterium* OJ ปริมาณ  $10^8$  และ  $10^{10}$  cfu/g เป็นเวลา 28 วัน พบว่ากุ้งมีอัตราการรอดชีวิตหลังจากทำให้ติดโรคด้วย white spot syndrome virus เท่ากับ 65% และ 80% ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีอัตราการรอดชีวิต 60%

นอกจากนี้ถึงแม้ว่ากุ้งทะเลยังไม่เคยได้รับโปรไบโอติกมาก่อน แต่ได้รับโปรไบโอติกพร้อมกับเชื้อก่อโรค พบว่าสามารถเพิ่มอัตราการรอดตายได้ ตัวอย่างเช่น Maketon and Masawang (2004) เลี้ยงกุ้งกุลาดำโดยให้โปรไบโอติก *B. subtilis* AM-01 พร้อมเชื้อก่อโรค *V. harveyi* และ *B. licheniformis* AM-04 พร้อม *V. harveyi* เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่ากุ้งทั้งสองกลุ่มมีอัตราการรอดตายประมาณ 60 % ส่วนกุ้งที่ได้รับเฉพาะเชื้อก่อโรค *V. harveyi* มีอัตราการรอดตายเพียง 40 % ผลการทดลองสอดคล้องกับ Li *et al.* (2006) ที่เลี้ยง *Penaeus chinensis* อายุประมาณ 10 วัน โดยเติมโปรไบโอติก *Arthrobacter* XE-7 ( $10^6$  CFU/ml) ร่วมกับเชื้อก่อโรคผสมของ *V. parahaemolyticus*, *V. anguillarum* และ *V. nereis* ( $10^6$  CFU/ml) ติดตามผลเป็นเวลา 14 วัน พบว่ากุ้งมีอัตราการรอดชีวิต 82.6% สูงกว่ากุ้งที่เติมเฉพาะ *Vibrio* spp. ผสม (3 ชนิด) มีอัตราการรอดชีวิตเพียง 56.9%

ในทำนองเดียวกัน Rattanachuy *et al.* (2007) เติมเชื้อ *Pseudomonas* sp. W3 ( $10^6$  cfu/ml) ในบ่อเลี้ยงกุ้ง (*Litopenaeus vannamei*) หลังจาก 32 วัน พบว่ากุ้งที่เติมเชื้อ *Pseudomonas* sp. W3 ผสมเชื้อก่อโรค *V. harveyi* มีอัตราการตาย 33% ต่ำกว่ากุ้งกลุ่มที่เติมเฉพาะ *V. harveyi* ซึ่งมีอัตราการตาย 40%

#### 4. *Vibrio* spp. ที่พบในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

แบคทีเรียที่พบในน้ำทะเลและในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำมีหลายชนิด ทั้งที่เป็นแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์และแบคทีเรียที่อาจก่อโรคในสัตว์น้ำ แบคทีเรียที่พบได้แก่ *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *E. coli*, *Bacillus*, *Salmonella*, *Flavobacterium* และ *Moraxella* เป็นต้น โดยพบ *Vibrio* มากที่สุด ประมาณ  $10^2$ – $10^3$  cfu/ml และบางช่วงในขณะนี้น้ำนิ่งจะพบสูงถึง  $10^4$

cfu/ml คิดเป็นปริมาณสูงกว่า 80% ของประชากรแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำทะเล (ศุภชัย, 2538; Sung *et al.*, 1999; Gopal *et al.*, 2005)

*Vibrio* เป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นแท่ง (rod) ลักษณะคล้ายเครื่องหมายคอมม่า (comma) หรือ curve rod ขนาดของเซลล์กว้างประมาณ 0.5-1.5  $\mu\text{m}$  และยาวประมาณ 3.0  $\mu\text{m}$  (Austin, 1988) *Vibrio* เกือบทุกชนิดสามารถเคลื่อนที่ได้โดยอาศัยแฟลเจลลา (flagella) เดิมโตได้ทั้งที่มีอากาศหรือมีอากาศเล็กน้อย ต้องการสารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน บางชนิดสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนและคาร์บอนไดออกไซด์จากกระบวนการหมัก สามารถเติบโตได้ในน้ำที่มีความเค็ม (Ingraham, 2000; Walker, 1998; Baffone *et al.*, 2001) รายละเอียดของ *Vibrio* ชนิดสำคัญที่ก่อให้เกิดโรครุนแรงในกุ้งกุลาดำมีดังต่อไปนี้

#### 4.1 *Vibrio harveyi*

*V. harveyi* ทำให้เกิดโรคเรืองแสงในกุ้งกุลาดำ เชื้อนี้สามารถให้แสงสีเขียวแกมเหลืองออกมาโดยปฏิกิริยาทางเคมีที่เกิดจากเอนไซม์ลูซิเฟอเรส (luciferase) ซึ่งทำให้เรืองแสงได้ในที่มืด *V. harveyi* จะเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วในน้ำที่มีความเค็มระหว่าง 10–40 ppt ที่อุณหภูมิสูงประมาณ 5–35°C และค่าพีเอชน้ำที่เชื้อเจริญเติบโตดี คือ 7–9 นอกจากนี้ *V. harveyi* ยังไวต่อยาคลอแรมฟินิโคลและโนโวบีโอซิน แต่มีความต้านทานต่อยาเซตรปโตมัยซิน (กรัมประมง, 2532) เชื้อ *V. harveyi* พบได้ทั่วไปในน้ำของบ่อเลี้ยงกุ้งร่วมกับ *V. spp.* ชนิดอื่นๆ (Liu *et al.*, 1996) ถ้าไม่มีการจัดการบ่อที่ดี *V. harveyi* จะเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว เมื่อกุ้งติดเชื้อจะทำให้เกิดโรคเป็นพิษจากสารที่หลั่งออกจากเซลล์ เช่น cysteine protease (Lee *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 1997)

Defoirdt *et al.* (2007) รายงานว่า *V. harveyi* เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อในสัตว์น้ำเศรษฐกิจได้แทบทุกชนิด ตัวอย่างเช่น ในกลุ่ม Crustaceans (จำพวกกุ้งและปู) ได้แก่ Brine shrimp (*Artemia franciscana*), Kuruma prawn (*Penaeus japonicus*), Ridgeback prawn (*Sicyonia ingentis*), Rock lobster (*Jasus verreauxi*) White shrimp (*Litopenaeus vannamei*) และ Tiger prawn (*P. monodon*) เป็นต้น สัตว์ในกลุ่มนี้หลังจากได้รับเชื้อจะป่วยเป็นโรคที่เรียกว่า luminescent vibriosis ซึ่งมีอัตราการตายสูงมาก ในกลุ่มปลา ได้แก่ Cobia fish (*Rachycentron canadum*), Grouper (*Epinephelus coioides*), Red drum (*Sciaenops ocellatus*) ส่วนใหญ่ตายด้วยโรคกระเพาะอาหารอักเสบ ปลา Salmonids, Seahorse (*Hippocampus spp.*) และ Summer flounder (*Paralichthys*

*dentatus*) เป็นโรคเกี่ยวกับทางเดินอาหารแลโหดเป็นพิษ ในกลุ่ม Molluscs (หอยและปลาหมึก) ได้แก่ Abalone (*Haliotis tuberculata*), Japanese abalone (*Sulculus diversicolor*) และ Pearl oyster (*Pinctada maxima*) เป็นต้น

Defoirdt *et al.* (2007) รายงานว่าสารปฏิชีวนะที่นิยมใช้ทั่วไปในการยับยั้ง *V. harveyi* ได้แก่ cotrimoxazole, chloramphenicol, erythromycin, streptomycin, tetracyclin, ampicillin, oxytetracycline furazolidone, kanamycin, gentamycin, nitrofurantoin, novobiocin and sulfonamide เป็นต้น ส่วนในประเทศไทยนิยมใช้ kanamycin และ carbenicillin และมีรายงานว่า *V. harveyi* คือต่อยา ampicillin, streptomycin, kanamycin และ carbenicillin (Ottaviani *et al.*, 2001)

#### 4.2 *Vibrio parahaemolyticus*

*V. parahaemolyticus* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นแท่งสั้นหรือโค้ง มีความยาวตั้งแต่ 1-3  $\mu\text{m}$  กว้าง 0.4-0.5  $\mu\text{m}$  ลักษณะโคโลนีที่บัสแสง จุกกลางโคโลนีสีเข้ม เติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5-10% ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมเท่ากับ 3% เติบโตได้ที่อุณหภูมิ 5-45°C อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 37.5°C ความเป็นกรดต่าง 5-11 โดยช่วงที่เหมาะสมคือ 7.5-8.5 เติบโตได้ดีในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ตรวจพบเชื้อนี้ได้ ในกุ้งหลายชนิด (Hosseini *et al.*, 2004) จากผลการศึกษาของ Alapid-Tendencia and Dureza (1997) พบว่า *V. parahaemolyticus* ทำให้เกิดโรคโหดเป็นพิษในกุ้งกุลาดำ โดยพบว่าเมื่อนิดเชื้อ *V. parahaemolyticus* ให้กับกุ้งกุลาดำ จะทำให้กุ้งกุลาดำป่วยเป็นโรคตัวสีแดง ซึ่ง Sudheesh and Xu (2001) พบว่า extracellular proteases ที่ผลิตจากเชื้อ *V. parahaemolyticus* น่าจะเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคในกุ้งกุลาดำ

#### 4.3 *Vibrio alginolyticus*

*V. alginolyticus* ทำให้เกิดโรคไวรัสโอซิสและโรคโหดเป็นพิษในกุ้งกุลาดำ โดย Lee *et al.* (1996) ได้รายงานการระบาดของโรคกุ้งที่เกิดจาก เชื้อ *V. alginolyticus* spp. val ในปี 1994 ที่ประเทศไต้หวัน ทำให้กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงไว้ตายเป็นจำนวนมาก สาเหตุที่ทำให้กุ้งตายนอกจากสารพิษที่เชื้อผลิตออกมาและ serine protease และพบว่าเชื้อชนิดนี้มีความต้านทานต่อยา ampicillin, novobiocin, penicillin G, sulfisoxazole และ sulfonamide (Lee *et al.*, 1997)

## 5. แบคทีเรียสกุลบาซิลลัส

*Bacillus* เป็นแบคทีเรียที่ต้องการอากาศในการเติบโต สามารถสร้างสปอร์ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ทำให้ทนความร้อนได้ หรือเรียกแบคทีเรียชนิดนี้ว่า aerobic endospore forming bacteria บาซิลลัสมีรูปร่างเป็นแท่ง (rod) มีขนาดกว้างประมาณ 0.5-1.5  $\mu\text{m}$  และยาวประมาณ 1-10  $\mu\text{m}$  ตติสแกรมบวกแตกต่างกันในแต่ละระยะการเติบโต และตติสแกรมลบได้บ้างเมื่อบ่มไว้เกิน 24 ชั่วโมง (Austin, 1988) ตั้งเป็น Genus *Bacillus* ครั้งแรกโดย Ferdinand Cohn ในปี 1877 โดย *B. subtilis* (ATCC 6051) เป็นชนิดแรกที่ค้นพบ (Harwood, 1989) *Bacillus* ส่วนใหญ่เติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไป เช่น BHI, TSA และ NA บางชนิดสามารถทนความเค็มที่มีโซเดียมคลอไรด์ได้สูงกว่า 12% เช่น *B. filicolicus* พบได้ตามชายฝั่งทะเลแต่ไม่พบในมหาสมุทร (Varnam, 2000) *Bacillus* ส่วนใหญ่ชอบอุณหภูมิปานกลางประมาณ 37°C และสามารถเติบโตเป็นโคโลนีได้ภายใน 24 ชั่วโมง ใน Genus *Bacillus* อาจแบ่งเป็นกลุ่มกว้างๆ ได้ 6 กลุ่ม ซึ่งมีประมาณกว่า 60 species (Sonenshein *et al.*, 1993; เสาวนีย์, 2547) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ได้แก่ *B. polymyxa*, *B. alvei*, *B. circulans* และ *B. marcerans* สร้าง spore เป็น oval shape ขึ้นออกจากเซลล์ เป็นพวก facultative anaerobes ทำ fermentation กับน้ำตาลหลายชนิด และต้องการสารอาหารที่ค่อนข้างยุ่งยาก เช่น วิตามินและกรดอะมิโน ในกลุ่มนี้สามารถผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตได้หลายชนิด เช่น amylase, glucanase, cellulase, pectinase และ pullulanase

กลุ่มที่ 2 ได้แก่ *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. megaterium*, *B. licheniformis* และ *B. pumilus* โดยแบคทีเรียพวกนี้จะเปลี่ยนแปลงรูปร่างเซลล์ทั้งเซลล์ไปเป็น endospore รูป oval shape ในการทำ sporulation ส่วนใหญ่เป็นพวก strictly aerobes และส่วนใหญ่เช่นกันที่สามารถทำ fermentation กับน้ำตาลได้บางชนิด บางชนิด เช่น *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. licheniformis* และ *B. thuringiensis* เป็น facultative anaerobe สามารถผลิตเอนไซม์ออกนอกเซลล์ได้หลายชนิด รวมทั้งเอนไซม์ที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น amylase, glucanase และ proteases

กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มที่มีความหลากหลายทางสรีรวิทยาแตกต่างกันไปมาก *B. brevis* จัดอยู่ในกลุ่มนี้ เป็นประเภท strict aerobe ไม่สร้างกรดจากน้ำตาล และสร้าง spore รูป oval shape ขึ้นออกมาจากเซลล์ ส่วนชนิดอื่นที่จัดไว้ในกลุ่มนี้ ได้แก่ *B.adius* และ *B. freudenreihii*

กลุ่มที่ 4 เป็นพวกสร้าง spore รูปกลม ได้แก่ *B. sphaericus*, *B. insolitus* และ *B. psychrophilus* เป็นต้น แบคทีเรียในกลุ่มนี้แตกต่างจากกลุ่มอื่นอย่างชัดเจน มี lysine หรือ ornithine แทนที่ mesodiaminopimelic acid ใน peptidoglycan ของ cell wall เป็นพวก strict aerobes และสำหรับ *B. sphaericus* ไม่ใช้น้ำตาลในการเติบโต แต่ชอบใช้ acetate เป็นแหล่ง carbon และพลังงาน

กลุ่มที่ 5 เป็นพวก thermophilic bacilli ชนิดต่างๆ ซึ่งอาจมีสรีรวิทยาต่างๆ กัน มีกระบวนการสร้างพลังงานต่างกัน ตั้งแต่ชนิดที่เป็น strict aerobe ไปจนถึง microaerophiles บางชนิด เช่น *B. schlegelii* เป็น chemolithoautotrophs ซึ่งสามารถใช้ CO<sub>2</sub> และ CO เป็นแหล่ง carbon ได้ เติบโตได้ดีที่อุณหภูมิมากกว่าหรือเท่ากับ 50°C ตัวอย่างของแบคทีเรียในกลุ่มนี้ ได้แก่ *B. coagulans*, *B. stearothermophilus* และ *B. thermodenitrificans* เป็นต้น

กลุ่มที่ 6 เป็นประเภท thermo-acidophiles ซึ่งได้ถูกจัดเป็น genus ใหม่ คือ Alicyclobacillus แบคทีเรียกลุ่มนี้มีเชื้อหึ่งเซลล์ที่มีส่วนประกอบของ alicyclic acids ตัวอย่างของแบคทีเรียกลุ่มนี้ ได้แก่ *A. acidocaldarius*, *A. acidoterrestris* และ *A. cycloheptanicus*

*Bacillus* ส่วนใหญ่สร้างเอนไซม์ได้หลายชนิดเพื่อช่วยการเติบโตและย่อยอาหาร เช่น อะไมเลส โปรติเอสและไลเปส เป็นต้น เช่น เอนไซม์โปรติเอสผลิตโดย *B. clausii*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* และ *B. halodulans* เอนไซม์อะไมเลสผลิตโดย *B. licheniformis*, *B. stearothermophilus*, *B. amyloliquefaciens* และ *B. halomaculans* เป็นต้น (Morcel and Biedermann, 1994; Kumar, 2002; Lima *et al.*, 2004; Priest, 1977; Berkeley *et al.*, 2002; Sellami-Kamoun *et al.*, 2008)

*Bacillus* spp. สามารถผลิตสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ เช่น แบคเทอริโอซิน เอนไซม์โปรติเอส ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และกรดอินทรีย์ เป็นต้น (Moriarty, 1998; Gomez *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2000; George *et al.*, 1995; Sonenshin *et al.*, 1993; Payot *et al.*, 1999) เช่น *B. subtilis* ผลิต alboleutin, bacillomycin, botrycidin, fengycin, iturin, mycosubtilin, rhizocitins ยับยั้งเชื้อรา bacilysin, surfactin (ยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อรา) และ subtilin (ยับยั้งแบคทีเรีย) ส่วน *B. licheniformis* ผลิต bacitracin (ยับยั้งแบคทีเรีย) และ *B. brevis* ผลิต brevistin, edeines, gramicidin, gramicidin, tyrocidine (ยับยั้งแบคทีเรีย) สำหรับ *B. circulans* ผลิต polypeptins, EM49 (ยับยั้ง

แบคทีเรีย) *B. mesentericus* ผลิต esperin (ยับยั้งแบคทีเรีย) octapeptins (ยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อรา) และ *B. polymyxa* ผลิต polymyxins และ tridecactins (ยับยั้งแบคทีเรีย)

*B.thuringiensis* strain B439 ผลิต thuricin 439 ยับยั้ง *Listeria innocu* (Ahern *et al.*, 2003) เช่นเดียวกับ Barboza-Corona *et al.* (2009) รายงานว่า *B. thuringiensis* ที่คัดแยกได้ ผลิตแบคทีเรียโอซินชนิดต่างๆ ได้แก่ morricin 269, kurstacin 287, kenyacin 404, entomocin 420 และ tolworthcin 524 ที่ยับยั้ง *Staphylococcus aureus*

นอกจากนี้ *B. thuringiensis* และ *B. cereus* สามารถผลิต crystalline endotoxin ได้ (Harwood, 1989; Jung *et al.*, 2003; Fukamizo *et al.*, 1994) โดยเฉพาะ protein crystals ของ *B. thuringiensis* มีความเป็นพิษสูงต่อแมลงและมีการสกัดเพื่อเป็นการค้าในการนำไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช (Ingraham, 2000) *Bacillus* ที่แยกได้จากกุ่ม *Jeotkal* สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อรา *Phytophthora infestans* ในมะเขือเทศได้ (Hyesook *et al.*, 2006) *B. amyloliquefaciens* สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ในถั่วเหลือง ยับยั้งเชื้อรา *Botrytis cinerea* ในมะเขือเทศ และยับยั้งเชื้อ *Fusarium verticillioides* ในข้าวได้ (Yu *et al.*, 2002; Mari *et al.*, 1996; Pereira *et al.*, 2007)

แบคทีเรียโอซินออกฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียก่อโรค โดยจับกับตัวรับจำเพาะบนผิวของแบคทีเรียเป้าหมาย (Daw and Falkner, 1996) ทำให้เกิดรูระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์ด้านนอกที่ขอบน้ำ กับชั้นของฟอสโฟลิพิดที่ไม่ชอบน้ำ เป็นผลให้เกิดการรั่วไหลของไอออนและสารเมตาบอไลต์ต่างๆ นอกจากนี้ อาจเกิดการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนและกรดนิวคลีอิก ส่งผลให้เซลล์ตายในที่สุด (Thennarasu *et al.*, 2005; Montville *et al.*, 1995)

Tsujii *et al.* (1998) รายงานว่า เอนไซม์โปรติเอสมีสมบัติเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค โดยเอนไซม์โปรติเอสจะจับที่ฟอสโฟลิพิดที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมาย ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เสียหาย เซลล์ไม่สามารถทำงานได้เป็นปกติและตายไปในที่สุด *Bacillus* ที่ผลิต protease ได้แก่ *B. aquimaris* strain VITP4, *B. pumilus* CBS, *B. subtilis* 24RP6, *B. subtilis* 72RP17, *B. firmus* 24RP4, *B. proteolyticus* CFR3001, *B. megaterium* JHT3, *B. subtilis* DET6 และ *B. thuringiensis* DET9 สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคชนิดต่างๆ เช่น *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Candida albicans* และ *Listeria monocytogenes* (Shivanand

and Jayaraman, 2009; Jaouadi *et al.*, 2008; Amoa-Awua *et al.*, 2006; Bhaskar *et al.*, 2007; Patel *et al.*, 2009)

*Bacillus* สามารถสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งมีสมบัติเป็นตัวออกซิไดซ์ (oxidant) ทำลายโครงสร้างของฟอสโฟลิพิด ที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์เชื้อก่อโรคทำให้เปลี่ยนแปลงไป ผนังเซลล์ขาดความแข็งแรงเหมือนเซลล์ได้รับบาดเจ็บ และตายไปในที่สุด (Peterson *et al.*, 2008) ส่วนกรดอินทรีย์โดยเฉพาะกรดแลคติก เมื่อเข้าไปในเซลล์ของจุลินทรีย์ก็จะแตกตัว ทำให้เกิดการสะสมของประจุลบในเซลล์ ส่งผลให้เซลล์ทำงานผิดปกติและเป็นสาเหตุที่ทำให้เซลล์ตาย (Makras and De Vuyst, 2006; Kamra and Srivastava, 1991) *Bacillus* ที่ผลิตกรดแลคติกมีหลายชนิด เช่น *B. coagulans* SIM-7, *B. cereus* JCM 2152, *B. coagulans* JCM2257, *B. subtilis* JCM 1465, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* ATCC 33679 และ *B. licheniformis* TY7 (Michelson *et al.*, 2006; Ohara and Yahata, 1996; Sakai and Yamanami, 2006)

ด้วยเหตุผลที่ *Bacillus* สามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นรวมทั้งสามารถผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิดที่เป็นประโยชน์ต่อการย่อยอาหารและการเติบโต จึงมีการนำ *Bacillus* มาใช้เป็นโปรไบโอติกสำหรับสัตว์ปีกและมนุษย์ เช่น *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. coagulans*, *B. clausii*, *B. megaterium* และ *B. licheniformis* (Yurong *et al.*, 2005; Green *et al.*, 1999; Duc *et al.*, 2004; Oggioni *et al.*, 2003) ยิ่งไปกว่านั้น เนื่องจาก *Bacillus* สามารถตรวจพบได้ทั่วไปในดินและน้ำของบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ รวมทั้งทางเดินอาหารกุ้ง เช่น *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. polymyxa*, *B. coagulans* และ *B. circulans* เป็นต้น (ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งจันทบุรี, 2549) อีกทั้งยังไม่เคยมีรายงานว่า *Bacillus* เป็นสาเหตุของโรคในสัตว์น้ำ จึงมีการนำ *Bacillus* เหล่านี้มาศึกษาเพื่อใช้เป็นโปรไบโอติกในสัตว์น้ำ

## 6. การผลิต *Bacillus* spp.

ปัจจัยที่มีผลต่อการเติบโตของ *Bacillus* ได้แก่องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน อนินทรีย์ฟอสเฟต เกลืออนินทรีย์ และธาตุที่ต้องการในปริมาณน้อยแต่มีความจำเป็นในการเติบโตของจุลินทรีย์ และการควบคุมสภาวะการเพาะเลี้ยง เช่น อุณหภูมิ พีเอช และปริมาณออกซิเจน ซึ่งมีบทบาทต่อการเติบโตและขบวนการเมตาบอลิซึมของแบคทีเรีย

## 6.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเติบโตและเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียแต่ละชนิดแตกต่างกันไป แต่โดยทั่วไปในการเติบโตของแบคทีเรียทุกชนิดต้องการ น้ำ แหล่งพลังงาน แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนและแร่ธาตุต่างๆ แบคทีเรียบางชนิดอาจต้องการสารเสริมการเติบโต เช่น วิตามินหรือกรดอะมิโน นอกจากนี้อาหารเลี้ยงเชื้อต้องมีธาตุอาหารที่เหมาะสมกับชนิดของแบคทีเรียแล้วจะต้องมีความเข้มข้นของสารอาหารพอเหมาะต่อการเติบโตด้วย

6.1.1 แหล่งคาร์บอน สารประกอบคาร์บอนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานที่สำคัญสำหรับการเติบโตของจุลินทรีย์ ในสถานะที่มีออกซิเจนสมบูรณ์จุลินทรีย์จะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเปลี่ยนเป็นองค์ประกอบของเซลล์และอีก 50 เปอร์เซ็นต์ถูกใช้เป็นแหล่งพลังงาน คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอนที่นิยมใช้ในการหมักโดยจุลินทรีย์ เช่น แป้งและน้ำตาล โดยทั่วไปกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดสำหรับการเติบโตของจุลินทรีย์ นอกจากนี้ได้แก่พวก เซลลูโลส แอลกอฮอล์ ไขมันและน้ำมัน รวมถึงโมลาสซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการผลิตน้ำตาล และเวย์ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมนม เป็นต้น (Waites *et al.*, 2001)

6.1.2 แหล่งไนโตรเจน เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของเซลล์ แหล่งไนโตรเจนที่จุลินทรีย์ใช้แบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ อนินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่ แอมโมเนีย ก๊าซแอมโมเนีย เช่น แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมฟอสเฟต และแอมโมเนียมไนเตรท เป็นต้น และแหล่งไนโตรเจนอีกประเภทหนึ่งคืออินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่ ยีสต์สกัด เปปโตน และกรดอะมิโน รวมทั้งที่อยู่ในรูปของผลพลอยได้จากอุตสาหกรรม เช่น น้ำข้าวโพด ยีสต์สกัด เปปโตนและน้ำถั่วเหลือง เป็นต้น

6.1.3 อนินทรีย์ฟอสเฟต จุลินทรีย์เติบโตได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอนินทรีย์ฟอสเฟต เนื่องจากอนินทรีย์ฟอสเฟตเร่งการใช้แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนของจุลินทรีย์ โดยเกลืออนินทรีย์ฟอสเฟตที่จุลินทรีย์ใช้ได้ ได้แก่ โปรแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) และไดโปรแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )

6.1.4 เกลืออนินทรีย์ เกลืออนินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลเกี่ยวข้องกับ ionic strength ในอาหารเลี้ยงเชื้อและเกี่ยวข้องกับการควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์บางชนิด ตัวอย่างเกลืออนินทรีย์ เช่น โซเดียมคลอไรด์และแมกนีเซียมซัลเฟต เป็นต้น

6.1.5 ธาตุที่ต้องการในปริมาณน้อย มีความจำเป็นในการเติบโตของจุลินทรีย์ ถ้าขาดทำให้จุลินทรีย์มีการเติบโตในระยะ lag phase นาน และอาจลดการเติบโตและผลได้ของเซลล์ ตัวอย่างธาตุที่ต้องการในปริมาณน้อยแต่มีความจำเป็นในการเติบโตของจุลินทรีย์ เช่น แมกนีเซียม แมงกานีส เหล็กและสังกะสี

## 6.2 การควบคุมสภาวะการเพาะเลี้ยงเชื้อ

6.2.1 อุณหภูมิ เป็นสภาวะแวดล้อมที่มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการเติบโตของแบคทีเรีย เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจะส่งผลให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาเคมีในเซลล์ของจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น ดังนั้นจุลินทรีย์จะเติบโตเร็วที่อุณหภูมิที่สูงขึ้น แต่ก็มีอุณหภูมิสูงสุดที่จุลินทรีย์จะสามารถเติบโตได้ เนื่องจากจุลินทรีย์มีโมเลกุลที่ถูกทำลายเมื่ออยู่ในอุณหภูมิที่สูงเกินไป เช่น โปรตีน กรดนิวคลีอิก และไขมัน เป็นต้น หรือที่อุณหภูมิต่ำเกินไปจุลินทรีย์ก็ไม่สามารถเติบโตได้ เนื่องจากไขมันที่ผนังเซลล์ของจุลินทรีย์แข็งตัวจนไม่สามารถทำงานเป็นปรกติได้ จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเติบโตแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์ จุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง (mesophiles) เติบโตได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 20-45°C จุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิต่ำ (psychrophiles) เติบโตได้ดีที่อุณหภูมิต่ำกว่า 15°C และจุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิสูง (thermophiles) เติบโตได้ดีในช่วงอุณหภูมิ ที่สูงกว่า 55°C (Waites *et al.*, 2001)

6.2.1 พีเอช เนื่องจากการเติบโตของแบคทีเรียถูกควบคุมโดยขบวนการเมตาบอลิซึม ซึ่งมีเอนไซม์เป็นตัวสำคัญ และพีเอชมีอิทธิพลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ ดังนั้นพีเอชของอาหารจึงมีผลต่อการเติบโตของแบคทีเรีย แบคทีเรียส่วนใหญ่มีค่าพีเอชในอาหารที่เหมาะสมต่อการเติบโตอยู่ระหว่าง 6.5-7.5 แต่หลังจากเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่พีเอชที่เหมาะสมไประยะหนึ่ง เมื่อแบคทีเรียใช้อาหารในการเติบโตจะปล่อยสารประเภทกรดหรือด่างออกมา เป็นผลให้พีเอชของอาหารเปลี่ยนไปจนอยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเติบโตของแบคทีเรีย ดังนั้นในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียจึงต้องมีการควบคุมพีเอชให้อยู่ในสภาวะที่เหมาะสม

6.2.3 ปริมาณออกซิเจน มีบทบาทต่อการเติบโตและขบวนการเมตาบอลิซึมของแบคทีเรียแทบทุกชนิด เพราะออกซิเจนเป็นสารตัวสุดท้ายที่จะรับอิเล็กตรอนในขบวนการสร้างพลังงานจาก electron transport chain (respiratory chain)

## 7. การทำแห้งแบบพ่นฝอย

การทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray drying) เป็นวิธีที่นิยมอย่างกว้างขวางในการทำแห้งของผลิตภัณฑ์ในอุตสาหกรรมหลายชนิด เนื่องจากเป็นวิธีที่เสียค่าใช้จ่ายไม่มากและผลิตได้ในปริมาณสูง (Meng *et al.*, 2008) ตัวอย่างอุตสาหกรรมที่ใช้วิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอย ได้แก่ อุตสาหกรรมเคมี เช่น phenol-formaldehyde resins, catalysts , PVC emulsion และ amino acid อุตสาหกรรมสี เช่น chrome yellow, food color และ paint pigments การทำปุ๋ย เช่น nitrate, ammonium และ phosphates สารซักล้างและสารลดแรงตึงผิว (surface-active agents) เช่น detergent enzyme, bleach powder และ emulsifying agents

อุตสาหกรรมอาหาร เช่น นม, หางนม, เนย, ไข่ และ โปรตีนถั่วเหลือง การทำแห้งคาร์โบไฮเดรต เช่น น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลอื่นๆ และมอลโทเดกซ์ทริน อุตสาหกรรมเครื่องดื่ม เช่น กาแฟและชา อุตสาหกรรมยา เช่น เพนนิซิลิน, เลือด, เอนไซม์และวัคซีน และอุตสาหกรรมชีวเคมี เช่น สาหร่าย, ยีสต์สกัด, เอนไซม์และยีสต์ที่ใช้ในการทำเบียร์ (Brewers yeast: *Saccharomyces* spp.) เป็นต้น (Mujumdar, 2004; Corrigan, 1995; Indyk *et al.*, 1996; Pisecky, 2005 ; Luna-Solano *et al.*, 2005)

### 7.1 หลักการทำงานของการทำงานแบบพ่นฝอย

หลักการทำงานของการทำงานแบบพ่นฝอย คือ การพ่นสารละลายของสารที่ต้องการทำแห้งเข้าไปในห้องอากาศร้อนที่มีอุณหภูมิในช่วง 150-200°C ความชื้นจะระเหยอย่างรวดเร็วทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้ไม่เสียหายมากนัก โดยมีขั้นตอนดังนี้

- ให้ความร้อนกับอากาศแห้ง
- พ่นฝอยละอองของของเหลวที่จะทำแห้ง
- ละอองของของเหลวสัมผัสกับอากาศแห้งที่ร้อนทำให้เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ที่แห้ง
- รวบรวมและจัดเก็บผลิตภัณฑ์แห้งที่ได้

## 7.2 ชนิดของเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย

ชนิดของเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอยแบ่งตามชนิดของเครื่องพ่นฝอย ได้เป็น 2 ชนิดคือ

### 7.2.1 แบบจานหมุน (centrifugal atomizer หรือ rotating disk)

เครื่องพ่นฝอยแบบจานหมุนมีข้อดีคือ มีอัตราการพ่นฝอยสูง (feed rate) สามารถใช้กับของเหลวที่มีสมบัติกัดกร่อนได้ดี อุตันน้อย ควบคุมขนาดของอนุภาคพ่นฝอยด้วยความเร็วของจานหมุน แต่มีข้อเสียคือ ใช้พลังงานมากกว่าแบบหัวฉีด มีราคาแพงกว่า และต้องการห้องทำแห้ง (drying chamber) ที่ใหญ่

### 7.2.2 แบบหัวฉีด (pressure nozzle)

เครื่องทำแห้งแบบหัวฉีดมีข้อดีคือ เป็นระบบที่ง่ายไม่ซับซ้อนและมีราคาถูก ไม่มีส่วนประกอบของเครื่องที่ต้องเคลื่อนที่ และใช้พลังงานน้อย แต่ก็มีข้อเสีย เช่น มีความจุน้อยหรือมีอัตราการพ่นฝอยต่ำเมื่อเทียบกับแบบจานหมุน มีโอกาสอุตันสูงและอาจถูกกัดกร่อนจากของเหลวที่นำมาทำแห้งได้ง่าย (Mujumdar, 2004)

## 7.3 ปัจจัยที่มีผลต่อผลิตภัณฑ์ ในการทำแห้งแบบพ่นฝอย

7.3.1 อุณหภูมิอากาศร้อนเข้า คืออุณหภูมิของอากาศร้อนที่เคลื่อนที่เข้าไปในอุปกรณ์ทำแห้งโดยใช้เครื่องเป่าลมร้อนมีค่าระหว่าง 150-170°C ถ้าอุณหภูมิต่ำกว่านี้จะทำให้ผลิตภัณฑ์ที่มีความชื้นสูงเกินไป แต่ถ้าอุณหภูมิสูงเกินไปจะไม่สามารถควบคุมอุณหภูมิอากาศร้อนออกได้ (Mauriello *et al.*, 1999)

7.3.2 อุณหภูมิอากาศร้อนออก คือ อุณหภูมิของอากาศที่ทำหน้าที่เป็นตัวพาผลิตภัณฑ์ไปสู่ไซโคลน โดยทั่วไปมีค่าประมาณ 60-90°C ถ้าอุณหภูมิต่ำกว่านี้จะทำให้ผลิตภัณฑ์ที่มีความชื้นสูงเกินไป แต่ถ้าสูงกว่านี้อาจทำให้ผลิตภัณฑ์เสียหายได้ (Gardiner *et al.*, 2002) นอกจากนี้อัตราการรอดชีวิตของจุลินทรีย์จะลดลงเมื่อเพิ่มอุณหภูมิอากาศออก (Teixeira *et al.*, 1995)

7.3.3 ความดันที่ผ่านเข้าสู่หัวฉีด (automizing air pressure) ความดันที่ผ่านเข้าสู่หัวฉีดนี้มีผลต่อขนาดของผลิตภัณฑ์ ถ้าน้อยเกินไปทำให้ผลิตภัณฑ์มีขนาดใหญ่ ถ้ามามากเกินไปทำให้ผลิตภัณฑ์มีขนาดเล็กเกินไป และไม่สามารถแยกออกจากไซโคลนได้ โดยทั่วไปความดันที่ผ่านเข้าสู่หัวฉีดมีค่าประมาณ 98-196 kPa

7.3.4 สารพา เป็นสารที่ใช้ผสมกับผลิตภัณฑ์ที่ต้องการทำแห้งหรือเซลล์ เพื่อป้องกันไม่ให้ผลิตภัณฑ์หรือเซลล์สัมผัสกับความชื้นโดยตรง ตัวอย่างของสารพาเช่น สารประเภทคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ lactose, sucrose, manitol, cyclodextrin และ dextrin เป็นต้น (Millqvist-Fureby *et al.*, 1999)

7.3.5 สารป้องกันเซลล์ ในการทำแห้งเซลล์จำเป็นต้องใส่สารป้องกันเซลล์ซึ่งมีสมบัติในการปกป้องเซลล์จากกระบวนการทำแห้งได้ ทำให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์เพิ่มมากขึ้น สารป้องกันเซลล์มีหลายประเภท ตัวอย่างสารป้องกันเซลล์ที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย ได้แก่ มอลโทเดกซ์ทริน เล็กซ์แทรน น้ำตาลซูโคส tween 80 และวิตามินบางชนิด เป็นต้น (Desmond *et al.*, 2002)

#### 7.4 การทำแห้งแบบพ่นฝอยเอนไซม์และจุลินทรีย์

Belghith *et al.* (2001) ทำแห้งแบบพ่นฝอยเอนไซม์เซลล์ูเลส ที่ผลิตโดย *Penicillium occitanis* ใช้อุณหภูมิอากาศร้อนเข้า 175°C และอุณหภูมิอากาศร้อนออก 90°C พบว่าเมื่อใช้ 1% และ 3% มอลโทเดกซ์ทริน เป็นสารตัวพาให้ผลดีโดยมีผลได้ของผลิตภัณฑ์ (yield) เท่ากันคือ 85% มากกว่าใช้ 1% PEG เป็นสารตัวพาซึ่งให้ผลได้ของผลิตภัณฑ์เพียง 70.8% และเอนไซม์มีความเสถียรเมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 8 เดือน Millqvist-Fureby *et al.* (1999) ทำแห้งแบบพ่นฝอยเอนไซม์ทริปซิน ใช้อุณหภูมิความร้อนเข้า 180°C และอุณหภูมิความร้อนออก 70 °C พบว่าใช้ dextrin หรือ lactose ผสม Tween 80 เป็นสารตัวพา เอนไซม์มีกิจกรรมเหลืออยู่เท่ากันถึง 99% ส่วนการใช้ cyclodextrin, lactose, sucrose และ mannitol เอนไซม์มีกิจกรรมเหลืออยู่เท่ากับ 95%, 94%, 90% และ 82% ตามลำดับ

Vasiljevic and Jelen (2003) ทำแห้งแบบพ่นฝอย galactosidase ที่ผลิตโดย *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842 ใช้อุณหภูมิความร้อนเข้า 102°C และอุณหภูมิความร้อนออก 50°C พบว่าใช้ whey protein, lactose และ skim milk เป็นสารตัวพา หลังจากเก็บรักษาไว้

ที่อุณหภูมิ 7°C เป็นเวลา 30 วัน เอนไซม์มีกิจกรรมเหลืออยู่เท่ากับ 94%, 93.3% และ 92.2% ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีรายงานการทำแห้งแบบพ่นฝอย lysozyme ที่สกัดได้จากไข่ขาว (Elkordy *et al.*, 2004) และทำแห้ง lactate dehydrogenase โดยใช้ trehalose เป็นสารตัวพา (Adler และ Lee, 1999)

Gardiner *et al.* (2002) ทำแห้งแบบพ่นฝอย *Lb. paracasei* NFBC 338 ใช้อุณหภูมิความร้อนเข้าเท่ากับ 175°C และอุณหภูมิความร้อนออกเท่ากับ 68°C ใช้หางนม (skim milk) เป็นสารตัวพา พบว่า *Lb. paracasei* NFBC 338 มีอัตราการรอดชีวิต 84.5% ในทำนองเดียวกัน Costa *et al.* (2002) ทำแห้งแบบพ่นฝอย *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 ซึ่งใช้ในการยับยั้ง *Penicillium expansum* และ *Penicillium digitatum* ในส้มและมะนาว โดยใช้หางนมเป็นสารตัวพา พบว่า *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 มีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 50%

Hamsupo *et al.* (2005a) ทำแห้งแบบพ่นฝอย *Lb. reuteri* KUB-AC5 ใช้อุณหภูมิความร้อนเข้าเท่ากับ 170°C และอุณหภูมิความร้อนออกเท่ากับ 85°C ใช้ 20% นมผงเป็นสารตัวพา พบว่า *Lb. reuteri* KUB-AC5 มีอัตราการรอดชีวิต 11.3% และ O’Riordan *et al.* (2001) ทำแห้งแบบพ่นฝอย *Bifidobacterium* PL1 ใช้อุณหภูมิความร้อนเข้าเท่ากับ 100°C และอุณหภูมิความร้อนออกเท่ากับ 45°C ใช้ starch เป็นสารตัวพา พบว่า *Bifidobacterium* PL1 มีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 30%

Boza *et al.* (2004) ศึกษาการทำแห้งแบบพ่นฝอยแบคทีเรีย *Beijerinckia* sp. โดยใช้ 10% หางนมผสมกับ 15% dextrose malt dextrin โดยศึกษาผลของอุณหภูมิขาเข้า (135, 155, 175°C) และอุณหภูมิขาออก (80, 90, 100°C) พบว่าที่อุณหภูมิขาเข้าและออก เท่ากับ 135, 80; 155, 90 และ 175, 100°C มีเซลล์รอดชีวิตเท่ากับ  $1.28 \times 10^8$ ,  $2.78 \times 10^7$  และ  $1.69 \times 10^7$  cfu/g ของแข็ง ตามลำดับ ในขณะที่เซลล์มีชีวิตเริ่มต้นก่อนการทำแห้งแบบพ่นฝอยเท่ากับ  $1.40 \times 10^9$  cfu/g ของแข็ง จากผลการทดลองพบว่าที่อุณหภูมิขาออกต่ำ *Beijerinckia* sp. จะมีเซลล์รอดชีวิตสูง

Zhou *et al.* (2004) ทำแห้งแบบพ่นฝอย *B. thuringiensis* โดยใช้อุณหภูมิอากาศเข้า 180°C และแปรผันอุณหภูมิอากาศออกตั้งแต่ 65°C ถึง 95°C พบว่าที่อุณหภูมิอากาศออกเท่ากับ 65°C มีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุดประมาณ 40% เช่นเดียวกับ Xueyong *et al.* (2008) ทำแห้ง *B. thuringiensis* โดยใช้อุณหภูมิขาเข้าและออก เท่ากับ 155, 66; 165, 70; 210, 75 และ 250, 97°C พบว่ามีเซลล์รอดชีวิตเท่ากับ  $10^{11}$ ,  $10^{11}$ ,  $5.0 \times 10^{10}$  และ  $4.0 \times 10^{10}$  cfu/g ตามลำดับ และ Zhou *et al.* (2004) ทำแห้งแบบ

พันธุ์ฝอย *B. thuringiensis* พบว่าเมื่อใช้อุณหภูมิความร้อนเข้าเท่ากับ 180°C, 210°C และ 240°C และอุณหภูมิความร้อนออกเท่ากับ 60 °C จะทำให้มีกิจกรรมการฆ่าแมลง *Plutella xylostella* ยังคงอยู่เท่ากับ 76.67%, 50% และ 53.33% ตามลำดับ

## อุปกรณ์และวิธีการ

### อุปกรณ์

#### 1. เครื่องมือ

- 1.1 เครื่องชั่งละเอียด (Satorius, Germany)
- 1.2 หม้อนิ่งความดัน (Hirayama, Japan)
- 1.3 ตู้อบลมร้อน (Mettler, Germany)
- 1.4 ตู้ปลอดเชื้อรุ่น NU-440-400E (Laminar flow : Nuair)
- 1.5 ตู้บ่มเชื้อ (Mettler, Germany)
- 1.6 เครื่องวัด พีเอช (Schott, Germany)
- 1.7 เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Thermospectronic, Helios Gamma, England)
- 1.8 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath, Clifton)
- 1.9 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker Series 25, New Brunswick Scientific Co., Inc. Edison, New Jersey. U.S.A.)
- 1.10 เครื่องเขย่า (Vortex)
- 1.11 ถังหมักขนาด 2 ลิตร (New Brunswick Scientific, NJ, USA)
- 1.12 เครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอยระดับนำร่อง (Niro A/S, Denmark)
- 1.13 โถดูดความชื้น
- 1.14 เครื่องแก้วและอุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์
- 1.15 ตู้ปลากระจกขนาด 30×40×50 cm
- 1.16 เครื่องให้อากาศพร้อมสายยางและหัวทราย

#### 2. สารเคมี

- 2.1 Calcium carbonate ( $\text{CaCO}_3$ ; Univar, Ajak, NSW, Australia)
- 2.2 95% Ethyl alcohol (Solvent solution Grade A; Commercial grade)
- 2.3 Glycerol (Carlo Erba reagent, MI, U.S.A.)
- 2.4 Phenol (Amresco, Ohio, U.S.A.)

- 2.5 Sulphuric acid (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; Lab-Scan, Ireland)
- 2.6 Sodium Hydroxide (NaOH; Merk, Germany)
- 2.7 Phosphoric acid (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; BDH Analar, England)
- 2.8 Maltodextrins (Commercial grade)
- 2.9 Monosodium glutamate (Commercial grade)

### 3. เชื้อจุลินทรีย์

3.1 *Bacillus* spp. คัดแยกได้จากกึ่งอุตสาหกรรมที่เลี้ยงในจังหวัดสมุทรสงคราม ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และแบคทีเรียสกุลบราซิลที่คัดแยกได้จากนาข้าว ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.2 *Vibrio* spp. คัดแยกได้จากกึ่งอุตสาหกรรมที่ป่วยเป็นโรค จำนวน 10 สายพันธุ์ ซึ่งได้แก่ *V. harveyi* VH01, *V. harveyi* VH02, *V. harveyi* VH03, *V. harveyi* VH04, *V. harveyi* VH06, *V. alginolyticus* VA01 และ *V. parahaemolyticus* VP01 ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และ *V. harveyi* VH05, *V. alginolyticus* VA02 และ *V. parahaemolyticus* VP02 ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ กรมประมง

### วิธีการ

#### 1. การคัดเลือก *Bacillus* spp. ที่ยับยั้ง *Vibrio* spp.

##### 1.1 การเพาะเลี้ยง *Bacillus* spp.

นำ *Bacillus* spp. จาก stock culture มาเลี้ยงบน nutrient agar ผสมโซเดียมคลอไรด์ 1.5 % บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อตรวจสอบลักษณะโคโลนี แล้วจึงทำการเพาะเลี้ยง *Vibrio* spp. ใน nutrient broth (NB) ผสมโซเดียมคลอไรด์ 1.5% บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C ด้วยความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

## 1.2 การเพาะเลี้ยง *Vibrio* spp.

นำ *Vibrio* spp. จาก stock culture มาเลี้ยงบน thiosulfate citrate bile salt sucrose (TCBS) agar บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อตรวจสอบลักษณะโคโลนี (Donovan and van Netten, 1995) แล้วจึงทำการเพาะเลี้ยง *Vibrio* spp. ใน NB ผสมโซเดียมคลอไรด์ 1.5% บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C ด้วยความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

## 1.3 การทดสอบความสามารถของ *Bacillus* spp. ในการยับยั้งการเติบโตของ *Vibrio* spp. ด้วยวิธี agar well diffusion

นำเชื้อ *Vibrio* spp. ที่เพาะเลี้ยงไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาผสมใน nutrient agar ผสมโซเดียมคลอไรด์ 1.5% ปริมาตร 25 ml ให้มีปริมาณเชื้อประมาณ  $10^6$  cfu/ml เทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ทิ้งให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง หลังจากนั้นเจาะหลุมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 mm เติม *Bacillus* spp. จำนวน 25 สายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ลงในหลุมปริมาตร 50  $\mu$ l บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ตรวจสอบผลโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone)

## 2. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ *Bacillus* spp. ที่ยับยั้ง *Vibrio* spp. โดยวิธี agar well diffusion

นำ *Bacillus* spp. สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากการทดลองข้อที่ 1 มาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (Minimum Inhibitory Concentration : MIC) ของ *Bacillus* spp. ที่ยับยั้งการเติบโตของ *Vibrio* spp. โดยการเจือจาง *Bacillus* spp. ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% ให้มีปริมาณเชื้อประมาณ  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  และ  $10^3$  cfu/ml แล้วเติมลงหลุม ปริมาตร 50  $\mu$ l ตามวิธีการข้อ 1.3 บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ตรวจสอบผลโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) และกำหนดให้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ *Bacillus* spp. ที่ยับยั้งการเติบโตของ *Vibrio* spp. คือความเข้มข้นต่ำสุดของ *Bacillus* spp. ที่ยังคงเห็นบริเวณยับยั้ง

### 3. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ *Bacillus* spp. ที่ยับยั้ง *V. harveyi* VH05 โดยวิธี co-culture

นำ *Bacillus* spp. สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากการทดลองข้อที่ 1 มาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ *Bacillus* spp. ที่ยับยั้งการเติบโตของ *V. harveyi* VH05 โดยทำการเลี้ยง *Bacillus* spp. ร่วมกับ *V. harveyi* VH05 ใน NB ผสมโซเดียมคลอไรด์ 1.5% ด้วยการเตรียม *Bacillus* spp. ให้มีปริมาณเชื้อในอาหารประมาณ  $10^8$ ,  $10^7$  และ  $10^6$  cfu/ml ส่วน *V. harveyi* VH05 มีปริมาณเชื้อในอาหารประมาณ  $10^6$ ,  $10^4$  และ  $10^2$  cfu/ml ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง มาหาปริมาณ *V. harveyi* VH05 โดยใช้วิธี spread plate บน TCBS agar และหาปริมาณ *Bacillus* spp. บน nutrient agar ผสมโซเดียมคลอไรด์ 1.5% และกำหนดให้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ *Bacillus* spp. ที่ยับยั้งการเติบโตของ *Vibrio* spp. คือความเข้มข้นต่ำสุดของ *Bacillus* spp. ที่ยังคงยับยั้งการเติบโตของ *Vibrio* spp. ได้

### 4. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเติบโตของ *Bacillus* spp.

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมและผลของแหล่งอาหารต่อการเติบโตของ *Bacillus* spp. ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของ *Vibrio* spp. ที่คัดเลือกได้จากตับของกุ้งกุลาดำ ได้แก่ ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ อุณหภูมิ แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน โดยทำการทดลองในพลาสติก และพีเอชทำการทดลองในถังหมัก

#### 4.1 ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์

ถ่ายเชื้อ *Bacillus* spp. ปริมาณ 5 % (v/v) ลงในพลาสติกขนาด 500 ml ที่บรรจุ NB ปริมาตร 200 ml ศึกษาการเติบโตของเชื้อโดยแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 0, 5, 10 และ 15 g/l บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C ด้วยความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างครั้งละ 3 ml ทุก 4 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

#### 4.2 อุณหภูมิ

ถ่ายเชื้อ *Bacillus* spp. ปริมาณ 5 % (v/v) ลงในพลาสติกขนาด 500 ml ที่บรรจุ NB ปริมาตร 200 ml ศึกษาการเติบโตของเชื้อโดยแปรผันอุณหภูมิในการบ่มเท่ากับ 25, 30, 37 และ

45°C และเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างครั้งละ 3 ml ทุก 4 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

#### 4.3 แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน

ถ่ายเชื้อ *Bacillus* spp. ปริมาณ 5 % (v/v) ลงในพลาสติกขนาด 500 ml ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 สูตร ได้แก่ molass-NaCl (M+NaCl), molass-Sandril salt-monosodium glutamate (M+S+Mo), sucrose-Sandril salt-monosodium glutamate (Su+S+Mo) และ sucrose-Sandril salt-di ammonium phosphate (Su+S+diAm) ปริมาตร 200 ml บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C ด้วยความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ศึกษาการเติบโตของเชื้อ โดยวัดปริมาณเซลล์มีชีวิต การใช้น้ำตาล และพีเอชโดยเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง

#### 4.4 พีเอช

ศึกษาผลของพีเอชต่อการเติบโตของ *Bacillus* spp. โดยทำการทดลองในถังหมักที่ควบคุมพีเอชเท่ากับ 5.0, 6.0 และ 7.0 อัตราการกวนเท่ากับ 600 rpm และอุณหภูมิเท่ากับ 37°C เตรียมกล้าเชื้อโดยถ่ายเชื้อ *Bacillus* spp. ปริมาณ 5% (v/v) ลงในพลาสติกขนาด 250 ml ที่มีอาหารที่คัดเลือกได้จากข้อ 4.3 ปริมาตร 75 ml บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C ด้วยความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมลงในถังหมักที่มีอาหารที่คัดเลือกได้จากข้อ 4.3 ปริมาตร 1,425 ml ศึกษาการเติบโตของเชื้อโดยวัดปริมาณเซลล์มีชีวิต การใช้น้ำตาล พีเอชและน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยเก็บตัวอย่างทุก 4 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

### 5. การศึกษาการทำแห้งแบบพ่นฝอยของ *Bacillus* spp. B17

#### 5.1 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อ

โดยเฉพาะเลี้ยง B17 ในอาหาร 2 ชนิด คือ NB และ MSMo บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C ด้วยความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอยโดยใช้ 20% มอลโทเดกซ์ทริน เป็นสารพา ใช้อุณหภูมิอากาศเข้าเท่ากับ 130°C และอุณหภูมิอากาศออกเท่ากับ 70°C จากนั้นนำผง B17 ที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณเซลล์มีชีวิต ปริมาณความชื้น และกิจกรรมการ

ยับยั้งการเติบโตของ *V. harveyi* VH05 จำนวนอัตราการรอดชีวิตหลังทำแห้งแบบพ่นฝอยโดยใช้สูตร

$$\text{อัตราการรอดชีวิต} = \frac{N \times 100}{N_0}$$

เมื่อ N หมายถึง ปริมาณเซลล์มีชีวิตหลังการทำแห้งแบบพ่นฝอย

$N_0$  หมายถึง ปริมาณเซลล์มีชีวิตก่อนการทำแห้งแบบพ่นฝอย

## 5.2 ผลของระยะเวลาเพาะเลี้ยงเชื้อ

โดยเพาะเลี้ยง B17 ใน NB เป็นเวลา 24, 36 และ 48 ชั่วโมง แล้วนำไปผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอยโดยใช้ 20% มอลโทเดกซ์ทรินเป็นสารพา จากนั้นนำผง B17 ที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณเซลล์มีชีวิต ปริมาณความชื้น และกิจกรรมการยับยั้งการเติบโตของ *V. harveyi* VH05

## 5.3 ผลของสารพาและสารป้องกันเซลล์

โดยเพาะเลี้ยง B17 ใน NB เป็นเวลา 36 ชั่วโมง แล้วนำไปผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอยโดยใช้ 20% มอลโทเดกซ์ทริน, 20% นมผง และ 15% มอลโทเดกซ์ทรินผสม 5% โมโนโซเดียมกลูตาเมตเป็นสารพา จากนั้นนำผง B17 ที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณเซลล์มีชีวิต ปริมาณความชื้น และกิจกรรมการยับยั้งการเติบโตของ *V. harveyi* VH05

## 5.4 การใช้ผง B17 เป็นหัวเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างง่าย

ใช้ผง B17 ที่ได้จากการทำแห้งแบบพ่นฝอยมี 15% มอลโทเดกซ์ทรินผสม 5% โมโนโซเดียมกลูตาเมตเป็นสารพา มาเป็นหัวเชื้อปริมาณ 0.1% (w/v) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 6 ชนิด ได้แก่ normal saline (NS), nutrient broth (NB), shrimp feed medium (SF), molass medium (Mo) molass-Sandril salt- monosodium glutamate medium (MSMo) และ coconut juice (Coco) บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C ด้วยความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 24 และ 36 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์หาปริมาณเซลล์มีชีวิต และกิจกรรมการยับยั้งการเติบโตของ *V. harveyi* VH05

### 5.5 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของผง B17 ที่ยับยั้ง VH05 โดยวิธี co-culture

โดยทำการเลี้ยง *V. harveyi* VH05 ร่วมกับผง B17 ใน NB ผสมโซเดียมคลอไรด์ 1.5% ปริมาตร 100 ml ด้วยการเติมผง B17 ปริมาณ 1, 0.1 และ 0.01 g ซึ่งจะมีปริมาณเชื้อในอาหาร ประมาณ  $10^7$ ,  $10^6$  และ  $10^5$  cfu/ml ตามลำดับ ส่วน *V. harveyi* VH05 มีปริมาณเชื้อในอาหาร ประมาณ  $10^6$ ,  $10^4$  และ  $10^2$  cfu/ml ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง มาหาปริมาณ *V. harveyi* VH05 โดยใช้วิธี spread plate บน TCBS agar และปริมาณ *Bacillus* spp. บน NB ผสมโซเดียมคลอไรด์ 1.5 %

### 5.6 ผลของสารพา สารป้องกันเซลล์และอุณหภูมิต่ออัตราการรอดชีวิตของ B17 ในช่วงการเก็บรักษา

โดยนำผง B17 ที่ผ่านการทำให้แห้งแบบพ่นฝอยที่ใช้ 20% มอลโทเดกซ์ทริน 20% นมผง และ 15% มอลโทเดกซ์ทรินผสม 5% โมโนโซเดียมกลูตาเมตเป็นสารตัวพาในข้อ 5.3 ไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C และ 30°C เป็นเวลา 6 เดือน และทุกเดือนทำการวิเคราะห์หาปริมาณเซลล์มีชีวิต ปริมาณความชื้น และกิจกรรมการยับยั้งการเติบโตของ *V. harveyi* VH05

## 6. การศึกษาประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp. ยับยั้ง *Vibrio* spp. ก่อโรคในกุ้งกุลาดำ

### 6.1 สัตว์ทดลอง

กุ้งกุลาดำ อายุประมาณ 2 เดือน ขนาดน้ำหนักเฉลี่ย 8-10 กรัมต่อตัว จากฟาร์มเลี้ยงกุ้งกุลาดำ อำเภอนนทบุรี จังหวัดชลบุรี

### 6.2 อาหารกุ้ง

กลุ่มที่ 1 เป็นอาหารสำเร็จรูปซึ่งเป็นอาหารปรกติที่กุ้งกินโดยไม่มีการผสม *Bacillus* spp. (อาหารสำเร็จรูป CP No. 5003 พี)

กลุ่มที่ 2 เป็นอาหารสำเร็จรูปผสม *Bacillus* spp. แบ่งเป็นเชื้อสดและเชื้อผง

- กรณีเป็นอาหารสำเร็จรูปผสม *Bacillus* spp. ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเตรียมโดยพ่น *Bacillus* spp. ที่เพาะเลี้ยงไว้ในอาหาร MSMo เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ปริมาณเชื้อประมาณ  $10^9$  cfu/ml) ลงบนอาหารสำเร็จรูป ในอัตราส่วนของ *Bacillus* spp. ต่ออาหารสำเร็จรูป เท่ากับ 1:10 (ml/g) ซึ่งจะได้ปริมาณเชื้อของ *Bacillus* spp. ในอาหารกึ่งประมาณ  $10^8$  cfu/g หลังจากนั้นนำไปฟุ้งลมให้แห้ง คลุกด้วยน้ำมันปลาทูน่า และนำไปฟุ้งลมให้แห้งอีกครั้ง ก่อนนำไปใช้ในการทดลองต่อไป ส่วนในกรณีการเตรียมอาหารกึ่งให้มีปริมาณเชื้อของ *Bacillus* spp. ในอาหารกึ่งประมาณ  $10^6$  cfu/g ทำได้โดยเจือจางเชื้อให้มีปริมาณเชื้อเท่ากับ  $10^7$  cfu/ml ก่อนพ่นลงบนอาหารในอัตราส่วนเดิม

- กรณีเป็นอาหารสำเร็จรูปผสมผง *Bacillus* spp. เตรียมโดยผสมผง *Bacillus* spp. (ปริมาณเชื้อประมาณ  $10^9$  cfu/g) ลงในอาหารสำเร็จรูป ในอัตราส่วนของผง *Bacillus* spp. ต่ออาหารสำเร็จรูป เท่ากับ 1 : 10 (g/g) ซึ่งจะได้ปริมาณเชื้อของ *Bacillus* spp. ในอาหารกึ่งประมาณ  $10^8$  cfu/g คลุกด้วยน้ำมันปลาทูน่า และนำไปฟุ้งลมให้แห้งก่อนนำไปใช้ในการทดลองต่อไป ส่วนในกรณีการเตรียมอาหารกึ่งให้มีปริมาณเชื้อของ *Bacillus* spp. ในอาหารกึ่งประมาณ  $10^6$  cfu/g ทำได้โดยเจือจางเชื้อให้มีปริมาณเชื้อเท่ากับ  $10^7$  cfu/ml ก่อนพ่นลงบนอาหารในอัตราส่วนเดิม

ในแต่ละกลุ่มการทดลองจะให้อาหารสำเร็จรูปคิดเป็น 3% ของน้ำหนักกุ้งกุลาดำ โดยให้อาหาร 3 ครั้งต่อวัน เวลา 8.00 น. 12.00 น. และ 18.00 น.

### 6.3 การเตรียมแบคทีเรียก่อโรคและการทำให้กุ้งกุลาดำติดโรค

เลี้ยง *V. harveyi* VH05 ใน NB ผสมโซเดียมคลอไรด์ 1.5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำให้กุ้งกุลาดำติดโรคโดยเติมลงในตู้เลี้ยงกุ้ง (ความเข้มข้นประมาณ  $10^9$  cfu/ml) ให้มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ  $10^6$  cfu/ml (เดิมเชื้อความเข้มข้น  $10^9$  cfu/ml ปริมาณ 40 ml)

### 6.4 การเตรียมน้ำเค็ม

เจือจางน้ำเกลือเข้มข้นด้วยน้ำประปาให้มีความเข้มข้นประมาณ 15 ppt ฆ่าเชื้อด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 100 ppt เดิมอากาศด้วย air pump เป็นเวลา 2 วัน แล้วจึงเติมน้ำที่เตรียมได้ในตู้กระจกขนาด 30×40×60 cm ปริมาตร 40 l เพื่อใช้เลี้ยงกุ้งกุลาดำจำนวน 20 ตัวต่อตู้

## 6.5 การแบ่งกลุ่มการทดลองเลี้ยงกุ้ง

การทดลองเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 1 ศึกษาการใช้ *Bacillus* spp. ในการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำโดยวิธีเติมลงน้ำ ประกอบด้วย 2 กลุ่มการทดลอง ได้แก่

- กลุ่มควบคุม ไม่มีการเติม *Bacillus* spp. ลงน้ำ แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ

กลุ่มควบคุม (-) ให้อาหารสำเร็จรูป และไม่มีการทำให้กุ้งกุลาดำติดโรคด้วย *V. harveyi* VH05 หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 28 วัน

กลุ่มควบคุม (+) ให้อาหารสำเร็จรูป และมีการทำให้กุ้งกุลาดำติดโรคด้วย *V. harveyi* VH05 หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 28 วัน

- กลุ่มทดลองที่มีการเติม *Bacillus* spp. ลงน้ำ โดยเติม *Bacillus* spp. ให้มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ  $10^5$  cfu/ml ทุกวัน (เติมเชื้อความเข้มข้น  $10^9$  cfu/ml ปริมาณ 10 ml) แล้วจึงทำให้กุ้งกุลาดำติดโรคด้วย *V. harveyi* VH05 หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 28 วัน

การทดลองเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 2 ศึกษาการใช้ *Bacillus* spp. ในการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำโดยวิธีผสมอาหาร เปรียบเทียบระหว่างความเข้มข้น  $10^6$  และ  $10^8$  cfu/g ประกอบด้วย 2 กลุ่มการทดลอง ได้แก่

- กลุ่มควบคุม ไม่มีการเติม *Bacillus* spp. ลงน้ำ แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ

กลุ่มควบคุม (-) ให้อาหารสำเร็จรูป และไม่มีการทำให้กุ้งกุลาดำติดโรคด้วย *V. harveyi* VH05 หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 28 วัน

กลุ่มควบคุม (+) ให้อาหารสำเร็จรูป และมีการทำให้กุ้งกุลาดำติดโรคด้วย *V. harveyi* VH05 หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 28 วัน

- กลุ่มทดลองที่ให้อาหารสำเร็จรูปผสม *Bacillus* spp. ที่มีปริมาณเชื้อของ *Bacillus* spp. ในอาหารกุ้งประมาณ  $10^6$  cfu/g และ  $10^8$  cfu/g ทุกวัน แล้วจึงทำให้กุ้งกุลาดำติดโรคด้วย *V. harveyi* VH05 หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 28 วัน

การทดลองเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 3 ศึกษาการใช้ผง *Bacillus* spp. ในการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ โดยวิธีผสมอาหาร เปรียบเทียบระหว่างความเข้มข้น  $10^6$  และ  $10^8$  cfu/g ประกอบด้วย 2 กลุ่มการทดลอง ได้แก่

- กลุ่มควบคุม ไม่มีการเติม *Bacillus* spp. ลงน้ำ แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ

กลุ่มควบคุม (-) ให้อาหารสำเร็จรูป และไม่มีการทำให้กุ้งกุลาดำติดโรคด้วย *V. harveyi* VH05 หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 28 วัน

กลุ่มควบคุม (+) ให้อาหารสำเร็จรูป และมีการทำให้กุ้งกุลาดำติดโรคด้วย *V. harveyi* VH05 หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 28 วัน

- กลุ่มทดลองที่ให้อาหารสำเร็จรูปผสม *Bacillus* spp. ที่มีปริมาณเชื้อของ *Bacillus* spp. ในอาหารกุ้งประมาณ  $10^6$  cfu/g และ  $10^8$  cfu/g ทุกวัน แล้วจึงทำให้กุ้งกุลาดำติดโรคด้วย *V. harveyi* VH05 หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 28 วัน

#### 6.6 การทำความสะอาด

เปลี่ยนถ่ายน้ำทุก 2 วัน โดยถ่ายน้ำออกในปริมาณ 50% ของปริมาณทั้งหมด และดูดตะกอนภายในตู้กระจก แล้วจึงเติมน้ำใหม่ให้เท่ากับระดับเดิม

#### 6.7 การตรวจนับปริมาณแบคทีเรียในตับกุ้งกุลาดำ

เก็บตัวอย่างกุ้งกุลาดำในแต่ละกลุ่มการทดลองหลังจากทำให้กุ้งติดโรคด้วย *V. harveyi* VH05 นำไปวิเคราะห์หาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและ *Vibrio* spp. ในตับกุ้งกุลาดำ โดยนำตับกุ้งกุลาดำจำนวน 1 g ละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% นำมาหาจำนวนเชื้อทั้งหมดด้วยวิธี standard plate count ใน NB ผสมโซเดียมคลอไรด์ 1.5% และ TCBS สำหรับ *Vibrio* spp.

#### 6.8 การบันทึกข้อมูล

6.8.1 หากการเติบโตโดยการชั่งน้ำหนักของกึ่งกลาดำในวันที่ 28 ของการทดลอง ก่อนการทำให้กึ่งกลาดำติดโรคด้วย *V. harveyi* VH05 โดยการชั่งน้ำหนักในแต่ละตู้ทดลอง แล้วนำมาหาค่าน้ำหนักเฉลี่ย

6.8.2 หาอัตราการรอดชีวิตของกึ่งกลาดำโดยการนับจำนวนกึ่งที่เหลืรอดในแต่ละกลุ่มการทดลอง นำมาคำนวณหาอัตราการรอดชีวิตโดยใช้สูตร

$$\text{อัตราการรอดชีวิต (\%)} = \frac{\text{จำนวนกึ่งกลาดำที่เหลืรอดในแต่ละกลุ่มการทดลอง} \times 100}{\text{จำนวนกึ่งกลาดำเริ่มต้นในแต่ละกลุ่มการทดลอง}}$$

## 7. สถานที่ทำการทดลอง

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพมหานคร

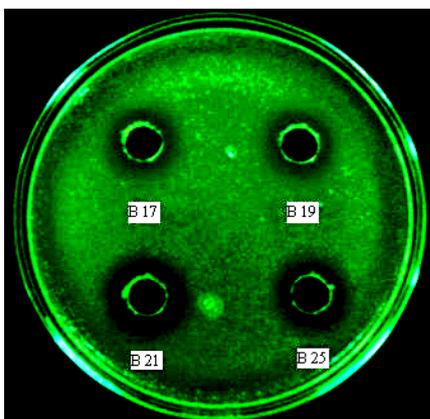
## 8. ระยะเวลาดำเนินการวิจัย

เริ่มตั้งแต่เดือนเมษายน 2547 ถึง เดือนสิงหาคม 2549

## ผลและการวิจารณ์

### 1. ผลการคัดเลือก *Bacillus* spp. ที่ยับยั้ง *Vibrio* spp.

ผลการคัดเลือก *Bacillus* spp. จากดักกิ้งกลาดำ จำนวนทั้งสิ้น 25 ไอโซเลท ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของ *Vibrio* spp. ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ก่อโรคในกุ้งกลาดำ จำนวน 10 สายพันธุ์ ได้แก่ *V. harveyi* (VH01, VH02, VH03, VH04, VH05 และ VH06), *V. alginolyticus* (VA01 และ VA02) และ *V. parahaemolyticus* (VP01 และ VP02) โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ด้วยวิธี agar well diffusion แสดงในภาพที่ 1 และตารางที่ 1



ภาพที่ 1 ผลของ *Bacillus* spp. ที่ยับยั้ง *Vibrio* spp. โดยวิธี agar well diffusion

ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 1 พบว่ามี *Bacillus* spp. จำนวน 17 ไอโซเลท ที่ยับยั้งการเติบโตของ *Vibrio* spp. ได้อย่างน้อย 1 สายพันธุ์ และ *Bacillus* spp. จำนวน 8 ไอโซเลท ไม่สามารถยับยั้งการเติบโตของ *Vibrio* spp. นอกจากนี้พบว่า B17, B19, B21 และ B25 สามารถยับยั้งการเติบโตของ *Vibrio* spp. ได้ทั้ง 10 สายพันธุ์ โดยให้ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งอยู่ในช่วง  $1.43 \pm 0.04$  ถึง  $1.80 \pm 0.35$ ,  $1.38 \pm 0.11$  ถึง  $2.20 \pm 0.07$ ,  $1.18 \pm 0.04$  ถึง  $1.80 \pm 0.07$  และ  $1.38 \pm 0.04$  ถึง  $1.95 \pm 0.14$  cm ตามลำดับ

ผลการศึกษาด้วยระบบจัดจำแนกชนิดจุลินทรีย์ เอ พี ไอ โดยสถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (TISTR) พบว่า B17, B19, B21 และ 25 คือ *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens* และ *B. megaterium* ตามลำดับ

ตารางที่ 1 กิจกรรมการยับยั้ง *Vibrio* spp. ของ *Bacillus* spp. โดยวิธี agar well diffusion

<i>Bacillus</i> spp.	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (cm ± S.D. <sup>a</sup> )									
	VH01	VH02	VH03	VH04	VH05	VH06	VA01	VA02	VP01	VP02
B01	1.60±0.07	-	1.45±0.14	-	-	-	-	-	-	-
B02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B03	1.73±0.04	-	1.60±0.00	-	-	-	-	-	1.45±0.14	-
B04	-	-	1.23±0.04	-	-	-	-	-	-	-
B05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B06	1.83±0.32	1.20±0.00	-	-	-	-	-	-	-	-
B07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B08	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่ยับยั้ง *Vibrio* spp.

a หมายถึง ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation)

ตารางที่ 1 (ต่อ)

<i>Bacillus</i> spp.	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (cm ± S.D. <sup>a</sup> )										
	VH01	VH02	VH03	VH04	VH05	VH06	VA01	VA02	VP01	VP02	
B09	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B10	-	1.65±0.07	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B13	-	1.20±0.07	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B15	1.55±0.07	-	-	-	-	-	-	1.03±0.04	-	-	-
B16	1.58±0.04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่ยับยั้ง *Vibrio* spp.

a หมายถึง ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation)

ตารางที่ 1 (ต่อ)

<i>Bacillus</i> spp.	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (cm ± S.D. <sup>a</sup> )									
	VH01	VH02	VH03	VH04	VH05	VH06	VA01	VA02	VP01	VP02
B17	1.43±0.04	1.48±0.04	1.80±0.35	1.50±0.00	1.50±0.14	1.68±0.04	1.58±0.11	1.48±0.04	1.45±0.07	1.68±0.04
B18	-	-	-	-	-	-	-	-	1.55±0.07	1.88±0.04
B19	1.40±0.00	1.40±0.00	2.20±0.07	1.43±0.04	1.63±0.04	1.65±0.14	1.55±0.28	1.38±0.11	1.50±0.07	1.58±0.04
B20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.78±0.04
B21	1.48±0.04	1.48±0.04	1.58±0.11	1.18±0.04	1.35±0.07	1.73±0.18	1.63±0.11	1.23±0.04	1.70±0.07	1.80±0.07
B22	1.58±0.32	1.35±0.00	1.48±0.18	-	-	-	-	-	1.58±0.04	-
B23	-	-	-	-	-	-	-	-	1.11±0.14	1.20±0.00
B24	-	-	-	-	-	-	-	-	1.03±0.11	1.25±0.00
B25	1.63±0.04	1.63±0.04	1.55±0.07	1.38±0.04	1.45±0.14	1.90±0.07	1.78±0.25	1.25±0.07	1.38±0.04	1.95±0.14

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่ยับยั้ง *Vibrio* spp.

a หมายถึง ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation)

จากผลงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียทดสอบทั้ง 4 สายพันธุ์ แสดงบริเวณยับยั้ง *V. harveyi* ใกล้เคียงกับ *Enterococcus* spp., *Lactobacillus* spp. และ *Bacillus* spp. ซึ่งมีบริเวณยับยั้งอยู่ในช่วง 1.7-2.1, 1.3-2.1 และ 1.3-2.0 cm ตามลำดับ (ดอกรักและคณะ, 2547) และ *Pseudomonas* I-2 ที่มีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 1.7 cm (Chythanya *et al.*, 2002) ในทำนองเดียวกัน *Pseudomonas* spp. W3 มีบริเวณยับยั้ง *V. harveyi* เท่ากับ  $2.16 \pm 0.04$  cm นอกจากนี้ยังใกล้เคียงกับการใช้สารปฏิชีวนะ oxolinic acid (2  $\mu$ g) และ sulfamethoxazole (25  $\mu$ g) ยับยั้ง *V. harveyi* ที่มีบริเวณยับยั้งเท่ากับ  $2.20 \pm 0.13$  และ  $2.00 \pm 0.03$  cm ตามลำดับ (Rattanachuy *et al.*, 2007)

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งของ B17, B19, B21 และ B25 กับสมุนไพร พบว่ามีค่าบริเวณยับยั้ง *V. harveyi* ใกล้เคียงกับสารสกัด *Azadirachta indica* (ใบสะเดา) และ *Andrographis paniculata* (ฟ้าทะลายโจร) มีบริเวณยับยั้ง เท่ากับ  $1.32 \pm 0.01$  และ  $1.63 \pm 0.03$  cm และดีกว่า *Tinospora cardifolia* (ใบชิงช้าชาลี) และ *Terminalia bellirica* (สมอแหมน) มีบริเวณยับยั้งเท่ากับ  $0.73 \pm 0.06$  และ  $0.71 \pm 0.03$  cm (Sivaran *et al.*, 2004)

สำหรับผลการยับยั้ง *V. parahaemolyticus* พบว่า *Bacillus* ทดสอบทั้ง 4 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งได้ใกล้เคียงกับ *B. subtilis* UTM126 ที่ยับยั้งเชื้อก่อโรค *V. parahaemolyticus* PS-017 มีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 1.2 cm (Balcazar *et al.*, 2007b) และ *B. clausii* (MB9) มีบริเวณยับยั้ง *V. parahaemolyticus* MTCC 451 เท่ากับ 2.2 cm (Asha-Devi *et al.*, 2008) ซึ่งใกล้เคียงกับที่พบในการทดลองนี้ และใกล้เคียงกับ *Pseudomonas* I-2 ที่มีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 1.6 cm (Chythanya *et al.*, 2002) ในทำนองเดียวกัน Balcazar *et al.* (2007a) พบว่า *B. subtilis* UTM 126 ยับยั้ง *V. parahaemolyticus* PS-017 ได้ ผลการทดลองนี้ยังให้ผลใกล้เคียงกับการใช้สมุนไพรสกัด *Rhinacanthus communis* (ทองพันชั่ง) และ *Phyllanthus niruri* (หญ้าไต้ใบ) ยับยั้ง *V. parahaemolyticus* พบว่ามีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 2.03 และ 1.93 cm (Immanuel *et al.*, 2004)

ผลการทดลองนี้ยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Vijayan *et al.* (2006) ที่ใช้ *Pseudomonas* PS-102 ยับยั้ง *V. harveyi*, *V. alginolyticus* และ *V. parahaemolyticus* โดยมีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 1.5-1.8, 1.0-2.5 และ 1.8-2.2 cm ตามลำดับ และ Hai *et al.* (2007) พบว่า *P. synxantha* และ *P. aeruginosa* สามารถยับยั้ง *V. harveyi*, *V. alginolyticus* และ *V. parahaemolyticus* ได้

นอกจากนี้ *Bacillus* ยังสามารถยับยั้ง *Vibrio* ที่เป็นสาเหตุของโรคในปลาได้ เช่น *Bacillus* spp. NM12 ยับยั้ง *V. vulnificus* RIMD 2219009 มีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 1.56-1.79 cm (Sugita *et al.*, 1998) และ *B. clausii* (MB9) ยับยั้ง *V. cholerae* MTCC 1738 มีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 1.8 cm (Asha-Devi *et al.*, 2008) ซึ่งมีบริเวณยับยั้งใกล้เคียงกับการยับยั้ง *V. harveyi*, *V. alginolyticus* และ *V. parahaemolyticus* โดย *Bacillus* spp. ในการทดลองนี้

ความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค อาจเนื่องจาก *Bacillus* สามารถผลิตสารยับยั้งได้หลายชนิด เช่น แบคเทอริโอซิน เอนไซม์โปรติเอส ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และกรดอินทรีย์ เป็นต้น (Moriarty, 1998; Gomez *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2000; George *et al.*, 1995) โดยแบคเทอริโอซินจะจับกับตัวรับจำเพาะบนผิวของแบคทีเรียเป้าหมาย (Daw and Falkner, 1996) ทำให้เกิดรูระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์ด้านนอกที่ชอบน้ำ กับชั้นของฟอสโฟลิพิดที่ไม่ชอบน้ำ เป็นผลให้เกิดการรั่วไหลของไอออนและสารเมตาบอลิต์ต่างๆ นอกจากนี้ อาจเกิดการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนและกรดนิวคลีอิก ส่งผลให้เซลล์ตายในที่สุด (Thennarasu *et al.*, 2005; Montville *et al.*, 1995)

เนื่องจาก B17, B19, B21 และ B25 สามารถยับยั้งการเติบโตของ *Vibrio* spp. ได้ทั้ง 10 สายพันธุ์ และให้ค่าบริเวณยับยั้งสูง ดังนั้นจึงเลือกแบคทีเรียทดสอบทั้ง 4 สายพันธุ์นี้ เพื่อศึกษาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้ง (Minimum Inhibitory Concentration: MIC) *Vibrio* spp. โดยวิธี agar well diffusion ต่อไป

## 2. ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ *Bacillus* spp. ที่ยับยั้ง *Vibrio* spp. โดยวิธี agar well diffusion

ผลการทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ *Bacillus* ที่สามารถยับยั้งการเติบโตของ *Vibrio* spp. ทั้ง 10 สายพันธุ์ ซึ่งมีปริมาณเชื้อ  $10^6$  cfu/ml ดังแสดงในตารางที่ 2 ถึง 5

ผลจากตารางที่ 2 แสดงผลของความเข้มข้นของ B17 ต่อการยับยั้ง *Vibrio* spp. จะเห็นว่าความเข้มข้นต่ำสุด  $10^4$  cfu/ml สามารถยับยั้ง VH06, VA01 และ VP02 และมีค่าบริเวณยับยั้งเท่ากับ  $1.25 \pm 0.07$ ,  $1.43 \pm 0.11$  และ  $1.40 \pm 0.07$  ตามลำดับ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น  $5 \times 10^6$  cfu/ml B17 สามารถยับยั้ง *Vibrio* spp. ได้เกือบทุกสายพันธุ์ยกเว้น VH04 และที่  $5 \times 10^7$  cfu/ml สามารถยับยั้งการเติบโตของ *Vibrio* spp. ได้ทั้ง 10 สายพันธุ์ และมีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเท่ากับ  $1.40 \pm 0.07$  ถึง  $1.88 \pm 0.18$  cm

สำหรับ B19 พบว่า มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคได้น้อยกว่า B17 โดยพบว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้ง VH02, VA01 และ VP02 เท่ากับ  $5 \times 10^5$  cfu/ml มีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเท่ากับ  $1.10 \pm 0.00$  ถึง  $1.33 \pm 0.04$  cm เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ B19 เป็น  $5 \times 10^6$  cfu/ml ค่าของเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเพิ่มขึ้น และสามารถยับยั้ง *Vibrio* spp. ได้เพิ่มขึ้นเป็น 8 สายพันธุ์ (ยกเว้น VH01 และ VA02) และที่  $5 \times 10^7$  cfu/ml สามารถยับยั้ง *Vibrio* spp. ได้ทั้ง 10 สายพันธุ์ มีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเท่ากับ  $1.38 \pm 0.04$  ถึง  $2.10 \pm 0.21$  cm

ผลจากตารางที่ 4 พบว่า B21 มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับ B17 โดย B21 ความเข้มข้น  $5 \times 10^4$  cfu/ml สามารถยับยั้ง *Vibrio* spp. ได้เพียง 2 สายพันธุ์ (VH06 และ VA01) มีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเท่ากับ  $1.33 \pm 0.18$  ถึง  $1.68 \pm 0.04$  cm เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น  $5 \times 10^5$  cfu/ml ยับยั้ง *Vibrio* spp. ได้ 5 สายพันธุ์ (VH02, VH05, VH06, VA01 และ VP02) ที่  $5 \times 10^6$  cfu/ml ยับยั้งได้ 8 สายพันธุ์ ยกเว้น VH04 และ VA02 และที่  $5 \times 10^7$  cfu/ml สามารถยับยั้ง *Vibrio* spp. ได้ทั้ง 10 สายพันธุ์ และมีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเท่ากับ  $1.13 \pm 0.04$  ถึง  $1.88 \pm 0.32$  cm (ตารางที่ 4)

ผลจากตารางที่ 5 พบว่า B25 มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ดีกว่า B17 เล็กน้อย โดยพบว่า ที่  $5 \times 10^4$  cfu/ml สามารถยับยั้ง *Vibrio* spp. ได้ 4 สายพันธุ์ (VH02, VH05, VH06 และ VA01) มีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเท่ากับ  $1.28 \pm 0.04$  ถึง  $1.80 \pm 0.14$  cm เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ B25 เป็น  $5 \times 10^5$  cfu/ml ยับยั้ง *Vibrio* spp. เพิ่มขึ้นเป็น 8 สายพันธุ์ (ยกเว้น VH04 และ VA02) มีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเท่ากับ  $1.28 \pm 0.11$  ถึง  $1.95 \pm 0.07$  cm B25 ที่ความเข้มข้น  $5 \times 10^6$  cfu/ml และที่  $5 \times 10^7$  cfu/ml ยับยั้งการเติบโตของ *Vibrio* spp. ได้ทั้ง 10 สายพันธุ์ มีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเท่ากับ  $1.28 \pm 0.04$  ถึง  $1.90 \pm 0.21$  และ  $1.25 \pm 0.07$  ถึง  $1.95 \pm 0.14$  ตามลำดับ

ตารางที่ 2 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ B17 ที่ยับยั้ง *Vibrio* spp. โดยวิธี agar well diffusion

<i>Vibrio</i> spp.	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (cm ± S.D. <sup>a</sup> )				
	ความเข้มข้นของ B17 (cfu/ml)				
	5 x10 <sup>7</sup>	5x10 <sup>6</sup>	5x10 <sup>5</sup>	5x10 <sup>4</sup>	5x10 <sup>3</sup>
VH01	1.50±0.00	1.23±0.11	-	-	-
VH02	1.40±0.14	1.48±0.11	1.33±0.04	-	-
VH03	1.88±0.18	1.75±0.49	1.75±0.42	-	-
VH04	1.40±0.07	-	-	-	-
VH05	1.53±0.04	1.38±0.04	1.25±0.07	-	-
VH06	1.63±0.04	1.63±0.11	1.60±0.07	1.25±0.07	-
VA01	1.53±0.04	1.48±0.04	1.43±0.18	1.43±0.11	-
VA02	1.50±0.00	1.20±0.14	-	-	-
VP01	1.50±0.00	1.48±0.11	1.40±0.07	-	-
VP02	1.65±0.00	1.58±0.11	1.55±0.07	1.40±0.07	-

สัญลักษณ์ VH01 = *V. harveyi* 01, VH02 = *V. harveyi* 02, VH03 = *V. harveyi* 03, VH04 = *V. harveyi* 04,  
 VH05 = *V. harveyi* 05, VH06 = *V. harveyi* 06, VA01 = *V. alginolyticus* 01, VA02 = *V. alginolyticus*  
 02, VP01 = *V. parahaemolyticus* 01, VP02 = *V. parahaemolyticus* 02

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่ยับยั้ง *Vibrio* spp.

a หมายถึง ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation)

ตารางที่ 3 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ B19 ที่ยับยั้ง *Vibrio* spp. โดยวิธี agar well diffusion

<i>Vibrio</i> spp.	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (cm± S.D. <sup>a</sup> )				
	ความเข้มข้นของ B19 (cfu/ml)				
	5x10 <sup>7</sup>	5x10 <sup>6</sup>	5x10 <sup>5</sup>	5x10 <sup>4</sup>	5x10 <sup>3</sup>
VH01	1.43±0.04	-	-	-	-
VH02	1.55±0.14	1.43±0.04	1.33±0.04	-	-
VH03	2.10±0.21	1.80±0.14	-	-	-
VH04	1.45±0.14	1.10±0.07	-	-	-
VH05	1.58±0.04	1.45±0.07	-	-	-
VH06	1.75±0.07	1.50±0.14	-	-	-
VA01	1.65±0.14	1.40±0.14	1.10±0.00	-	-
VA02	1.38±0.04	-	-	-	-
VP01	1.43±0.04	1.28±0.04	-	-	-
VP02	1.63±0.04	1.55±0.00	1.18±0.11	-	-

สัญลักษณ์ VH01 = *V. harveyi* 01, VH02 = *V. harveyi* 02, VH03 = *V. harveyi* 03, VH04 = *V. harveyi* 04,  
 VH05 = *V. harveyi* 05, VH06 = *V. harveyi* 06, VA01 = *V. alginolyticus* 01, VA02 = *V. alginolyticus*  
 02, VP01 = *V. parahaemolyticus* 01, VP02 = *V. parahaemolyticus* 02

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่ยับยั้ง *Vibrio* spp.

a หมายถึง ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation)

ตารางที่ 4 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ B21 ที่ยับยั้ง *Vibrio* spp. โดยวิธี agar well diffusion

<i>Vibrio</i> spp.	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (cm ± S.D. <sup>a</sup> )				
	ความเข้มข้นของ B21 (cfu/ml)				
	5x10 <sup>7</sup>	5x10 <sup>6</sup>	5x10 <sup>5</sup>	5x10 <sup>4</sup>	5x10 <sup>3</sup>
VH01	1.45±0.07	1.28±0.11	-	-	-
VH02	1.55±0.14	1.43±0.04	1.28±0.04	-	-
VH03	1.88±0.32	1.58±0.04	-	-	-
VH04	1.13±0.04	-	-	-	-
VH05	1.30±0.14	1.30±0.07	1.23±0.11	-	-
VH06	1.75±0.21	1.63±0.11	1.53±0.25	1.33±0.18	-
VA01	1.63±0.18	1.58±0.11	1.65±0.07	1.68±0.04	-
VA02	1.28±0.04	-	-	-	-
VP01	1.55±0.07	1.63±0.04	-	-	-
VP02	1.68±0.04	1.58±0.04	1.25±0.07	-	-

สัญลักษณ์ VH01 = *V. harveyi* 01, VH02 = *V. harveyi* 02, VH03 = *V. harveyi* 03, VH04 = *V. harveyi* 04,  
 VH05 = *V. harveyi* 05, VH06 = *V. harveyi* 06, VA01 = *V. alginolyticus* 01, VA02 = *V. alginolyticus*  
 02, VP01 = *V. parahaemolyticus* 01, VP02 = *V. parahaemolyticus* 02

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่ยับยั้ง *Vibrio* spp.

a หมายถึง ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation)

ตารางที่ 5 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ B25 ที่ยับยั้ง *Vibrio* spp. โดยวิธี agar well diffusion

<i>Vibrio</i> spp.	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (cm $\pm$ S.D. <sup>a</sup> )				
	ความเข้มข้นของ B25 (cfu/ml)				
	$5 \times 10^7$	$5 \times 10^6$	$5 \times 10^5$	$5 \times 10^4$	$5 \times 10^3$
VH01	1.63 $\pm$ 0.04	1.50 $\pm$ 0.00	1.38 $\pm$ 0.04	-	-
VH02	1.60 $\pm$ 0.00	1.55 $\pm$ 0.07	1.55 $\pm$ 0.14	1.38 $\pm$ 0.11	-
VH03	1.55 $\pm$ 0.07	1.53 $\pm$ 0.04	1.50 $\pm$ 0.07	-	-
VH04	1.38 $\pm$ 0.04	1.28 $\pm$ 0.04	-	-	-
VH05	1.45 $\pm$ 0.14	1.60 $\pm$ 0.14	1.38 $\pm$ 0.11	1.28 $\pm$ 0.04	-
VH06	1.90 $\pm$ 0.07	1.90 $\pm$ 0.21	1.88 $\pm$ 0.18	1.80 $\pm$ 0.14	-
VA01	1.78 $\pm$ 0.25	1.60 $\pm$ 0.28	1.45 $\pm$ 0.28	1.33 $\pm$ 0.04	-
VA02	1.25 $\pm$ 0.07	1.28 $\pm$ 0.04	-	-	-
VP01	1.38 $\pm$ 0.04	1.33 $\pm$ 0.04	1.28 $\pm$ 0.11	-	-
VP02	1.95 $\pm$ 0.14	1.85 $\pm$ 0.00	1.95 $\pm$ 0.07	-	-

สัญลักษณ์ VH01 = *V. harveyi* 01, VH02 = *V. harveyi* 02, VH03 = *V. harveyi* 03, VH04 = *V. harveyi* 04,  
 VH05 = *V. harveyi* 05, VH06 = *V. harveyi* 06, VA01 = *V. alginolyticus* 01, VA02 = *V. alginolyticus*  
 02, VP01 = *V. parahaemolyticus* 01, VP02 = *V. parahaemolyticus* 02

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่ยับยั้ง *Vibrio* spp.

a หมายถึง ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation)

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ B17, B19, B21 และ B25 ที่ยับยั้ง *Vibrio* spp. โดยวิธี agar well diffusion

ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ	B17	B19	B21	B25
<i>Bacillus</i> (cfu/ml)				
10 <sup>4</sup>	VH06 VA01 VP02	-	VH06 VA01	VH02, 05, 06 VA01
10 <sup>5</sup>	VH02, 03, 05 VP01	VH02 VA01 VP02	VH02, 05 VP02	VH01, 03 VP01, 02
10 <sup>6</sup>	VH01 VA02	VH03, 04, 05, 06 VP01	VH01, 03 VP01	VH04 VA02
10 <sup>7</sup>	VH04	VH01 VA02	VH04 VA02	

จากตารางที่ 6 จะเห็นว่า B25 มีประสิทธิภาพยับยั้ง *Vibrio* spp. ทุกสายพันธุ์ได้ดีที่สุด มีค่า MIC เท่ากับ 5x10<sup>6</sup> cfu/ml ในขณะที่ B17, B19 และ B21 ให้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้ง *Vibrio* spp. ทั้ง 10 สายพันธุ์เท่ากับ 5x10<sup>7</sup> cfu/ml สอดคล้องกับผลวิจัยของ Hai *et al.* (2007) ที่พบว่า *P. synxantha* และ *P. aeruginosa* ยับยั้ง *V. harveyi*, *V. alginolyticus* และ *V. parahaemolyticus* ได้ทั้งหมดที่ความเข้มข้น 10<sup>7</sup> cfu/ml ในทำนองเดียวกัน เมื่อเทียบเคียงผลการทดลองที่ได้กับการใช้สารปฏิชีวนะ เพื่อยับยั้ง *V. alginolyticus* และ *V. parahaemolyticus* พบว่า ampicillin, amoxicillin, ciprofloxacin และ trimethoprim-sulphamethoxazole มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเท่ากับ 256, 2, 0.5 และ 0.12 mg/l ตามลำดับ (Zanetti *et al.*, 2001) เมื่อพิจารณาผลการยับยั้ง VH05 ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคเรืองแสงที่ระบาดในจังหวัดจันทบุรีในปี 2547 พบว่า B17, B21 และ B25 (มีค่า MIC เท่ากับ 5x10<sup>5</sup>, 5x10<sup>5</sup> และ 5x10<sup>4</sup> cfu/ml ตามลำดับ) มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง VH05 ได้ดีกว่า B19 (มีค่า MIC เท่ากับ 5x10<sup>6</sup>) ดังนั้นจึงเลือกใช้ B17, B21 และ B25 เพื่อศึกษาการยับยั้ง VH05 โดยวิธี co-culture ต่อไป

### 3. ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ *Bacillus* spp. ที่ยับยั้ง *V. harveyi* VH05 โดยวิธี co-culture

#### 3.1 ผลของความเข้มข้นของ B17 ต่อการยับยั้งการเติบโตของ VH05

ผลการศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ B17 ที่สามารถยับยั้งการเติบโตของ *Vibrio* spp. โดยแปรผันความเข้มข้นของ B17 เท่ากับ  $10^6$ ,  $10^7$  และ  $10^8$  cfu/ml และความเข้มข้น *Vibrio* spp. เท่ากับ  $10^2$ ,  $10^4$  และ  $10^6$  cfu/ml ดังแสดงในภาพที่ 2 ถึง 4

ภาพที่ 2 แสดงผลการยับยั้งการเติบโตของ *Vibrio* spp. ที่ความเข้มข้น  $10^2$  cfu/ml พบว่า B17 สามารถยับยั้ง *Vibrio* spp. ได้ทุกความเข้มข้น โดยพบว่าการลดลงของ *Vibrio* spp. ประมาณ 1 log cfu/ml ในช่วง 12 ชั่วโมงแรก และคงที่ตลอด 48 ชั่วโมง ในขณะที่ *Vibrio* spp. กลุ่มควบคุม มีปริมาณเซลล์รอดชีวิต  $10^8$  cfu/ml ที่ 48 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ VH05 เป็น  $10^4$  cfu/ml (ภาพที่ 3) จะเห็นว่า B17 ที่  $10^6$  cfu/ml ไม่สามารถยับยั้งได้ ในขณะที่เพิ่มความเข้มข้นของ B17 เป็น  $10^7$  และ  $10^8$  cfu/ml พบว่า B17 สามารถยับยั้งการเติบโตของ *Vibrio* spp. ประมาณ 2 log cfu/ml ส่วนกลุ่มควบคุมที่ไม่เติม B17 มีปริมาณเชื้อที่ 48 ชั่วโมง เท่ากับ  $8.2 \times 10^8$  cfu/ml

เมื่อปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ VH05 เพิ่มขึ้นเป็น  $10^6$  cfu/ml B17 ความเข้มข้น  $10^6$ ,  $10^7$  และ  $10^8$  cfu/ml ไม่สามารถยับยั้งได้ แต่ที่ B17 ความเข้มข้น  $10^8$  cfu/ml (ภาพที่ 4) จะเห็นแนวโน้มการลดลงของ VH05 ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ถึง ชั่วโมงที่ 48 โดยมีปริมาณเชื้อเท่ากับ  $2.35 \times 10^8$  ถึง  $1.99 \times 10^8$  cfu/ml เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่เติม B17 พบว่ากลุ่มควบคุมมี VH05 สูงกว่า โดยมีปริมาณเชื้อเท่ากับ  $4.55 \times 10^8$  ถึง  $1.12 \times 10^9$  cfu/ml ในช่วงเวลาเดียวกัน ดังนั้นค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ B17 ที่ยับยั้ง VH05 ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น  $10^2$  cfu/ml เท่ากับ  $10^6$  cfu/ml และที่  $10^4$  cfu/ml เท่ากับ  $10^7$  cfu/ml ส่วนที่  $10^6$  cfu/ml ไม่สามารถหาได้

#### 3.2 ผลของความเข้มข้นของ B21 ต่อการยับยั้งการเติบโตของ VH05

จากภาพที่ 5 พบว่า B21 ปริมาณเชื้อเริ่มต้น  $10^6$  cfu/ml ยับยั้ง VH05 ที่  $10^2$  cfu/ml ได้เพียง 12 ชั่วโมง หลังจากนั้น VH05 กลับมาเติบโตได้อีก โดยมีปริมาณเซลล์เท่ากับ  $1.4 \times 10^4$  cfu/ml ที่ 48 ชั่วโมง เมื่อเพิ่ม B21 เป็น  $10^7$  และ  $10^8$  cfu/ml สามารถยับยั้ง VH05 ได้ตลอด 48 ชั่วโมง

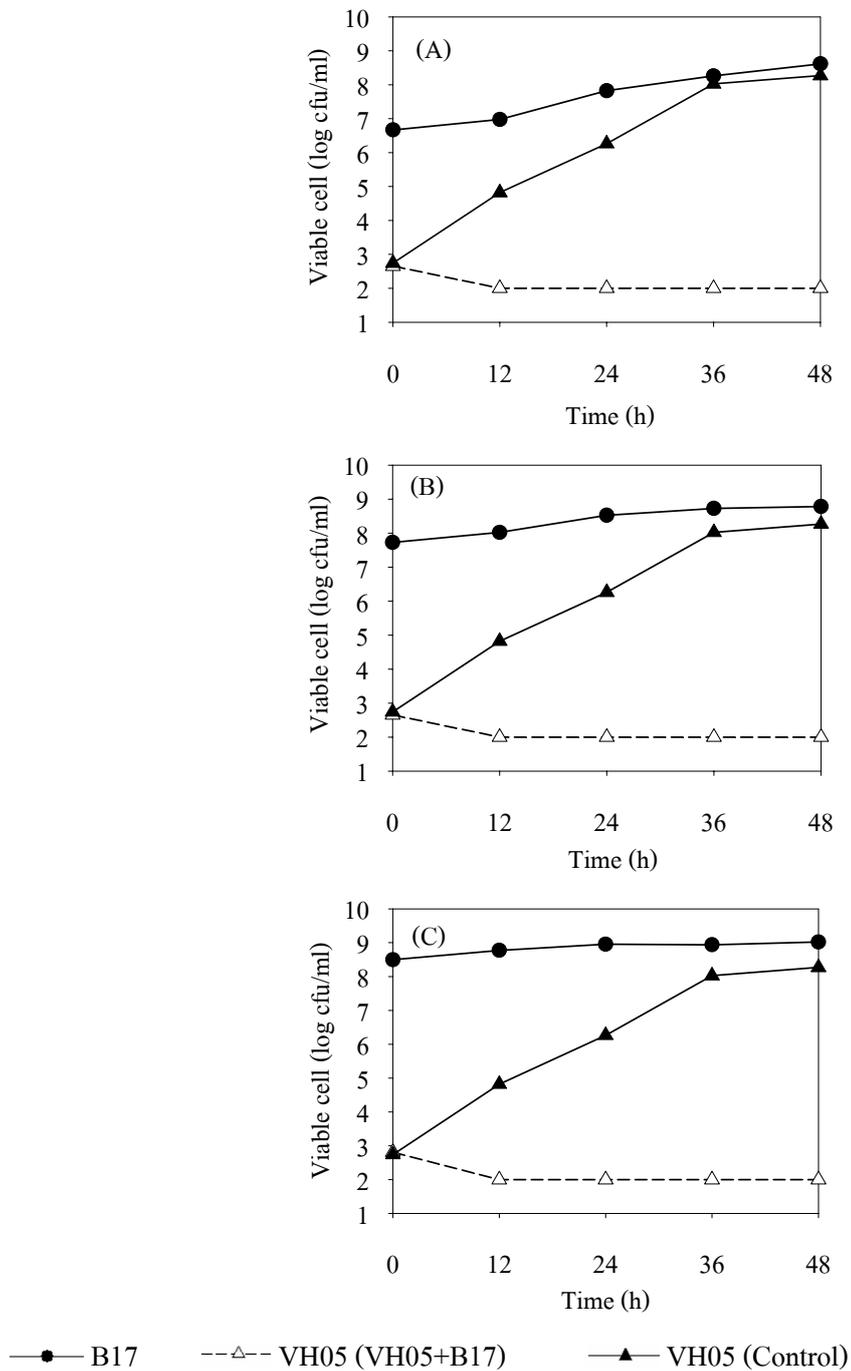
ในขณะที่กลุ่มควบคุมที่ไม่เติม B21 พบว่า VH05 เติบโตอย่างรวดเร็วมีปริมาณเชื้อเท่ากับ  $1.86 \times 10^8$  cfu/ml

สำหรับ VH05 ความเข้มข้น  $10^4$  cfu/ml B21 ที่  $10^6$  cfu/ml ไม่สามารถยับยั้งได้แต่เมื่อเพิ่มปริมาณเชื้อเป็น  $10^7$  และ  $10^8$  cfu/ml ยับยั้ง VH05 ได้เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและ 36 ชั่วโมงตามลำดับ หลังจากนั้นเชื้อสามารถกลับมาเติบโตได้อีก โดยชั่วโมงที่ 48 มีปริมาณเซลล์เท่ากับ  $1.53 \times 10^5$  และ  $5.7 \times 10^3$  cfu/ml ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มควบคุม VH05 มีปริมาณเท่ากับ  $8.2 \times 10^8$  cfu/ml ส่วน VH05 ความเข้มข้น  $10^6$  cfu/ml พบว่า B21 ทุกความเข้มข้นไม่สามารถยับยั้งได้ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ B21 ที่ยับยั้ง VH05 ที่  $10^2$  cfu/ml เท่ากับ  $10^7$  cfu/ml และที่  $10^4$  cfu/ml และ  $10^6$  cfu/ml ไม่สามารถหาได้

### 3.3 ผลของความเข้มข้นของ B25 ต่อยับยั้งการเติบโตของ VH05

ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 8 ถึง 10 พบว่า VH05 ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น  $10^6$  cfu/ml B25 ที่  $10^6$  cfu/ml ไม่สามารถยับยั้งได้ แต่จะเห็นแนวโน้มการลดลงของ VH05 ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ถึง ชั่วโมงที่ 48 โดยมีปริมาณเชื้อเท่ากับ  $6.5 \times 10^2$  ถึง  $1.36 \times 10^6$  cfu/ml เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่เติม B17 และพบว่ากลุ่มควบคุมมี VH05 สูงกว่า โดยมีปริมาณเชื้อเท่ากับ  $6.65 \times 10^4$  ถึง  $1.86 \times 10^8$  cfu/ml ในช่วงเวลาเดียวกัน แต่เมื่อเพิ่มปริมาณ B25 เป็น  $10^7$  และ  $10^8$  cfu/ml ยับยั้ง VH05 ได้ 12 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ หลังจากนั้นเชื้อสามารถกลับมาเติบโตได้อีก โดยชั่วโมงที่ 48 มี VH05 เท่ากับ  $1.14 \times 10^4$  และ  $1.05 \times 10^3$  cfu/ml ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มควบคุม VH05 มีปริมาณเท่ากับ  $1.86 \times 10^8$  cfu/ml

สำหรับ VH05 ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น  $10^4$  cfu/ml พบว่า B25 ทุกความเข้มข้นไม่สามารถยับยั้งได้ แต่เมื่อพิจารณาจากภาพที่ 9 และ 10 จะเห็นว่า B21 ที่  $10^7$  และ  $10^8$  cfu/ml ทำให้ VH05 ลดลงได้ประมาณ  $10^2$  ถึง  $10^4$  cfu/ml เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ส่วนที่ VH05 เท่ากับ  $10^6$  cfu/ml B25 ทุกความเข้มข้นไม่สามารถยับยั้งได้ ดังนั้นจากผลการทดลองจึงไม่สามารถหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ B25 ที่ยับยั้ง VH05 ได้ เนื่องจาก B25 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ใช้น้อยเกินไป

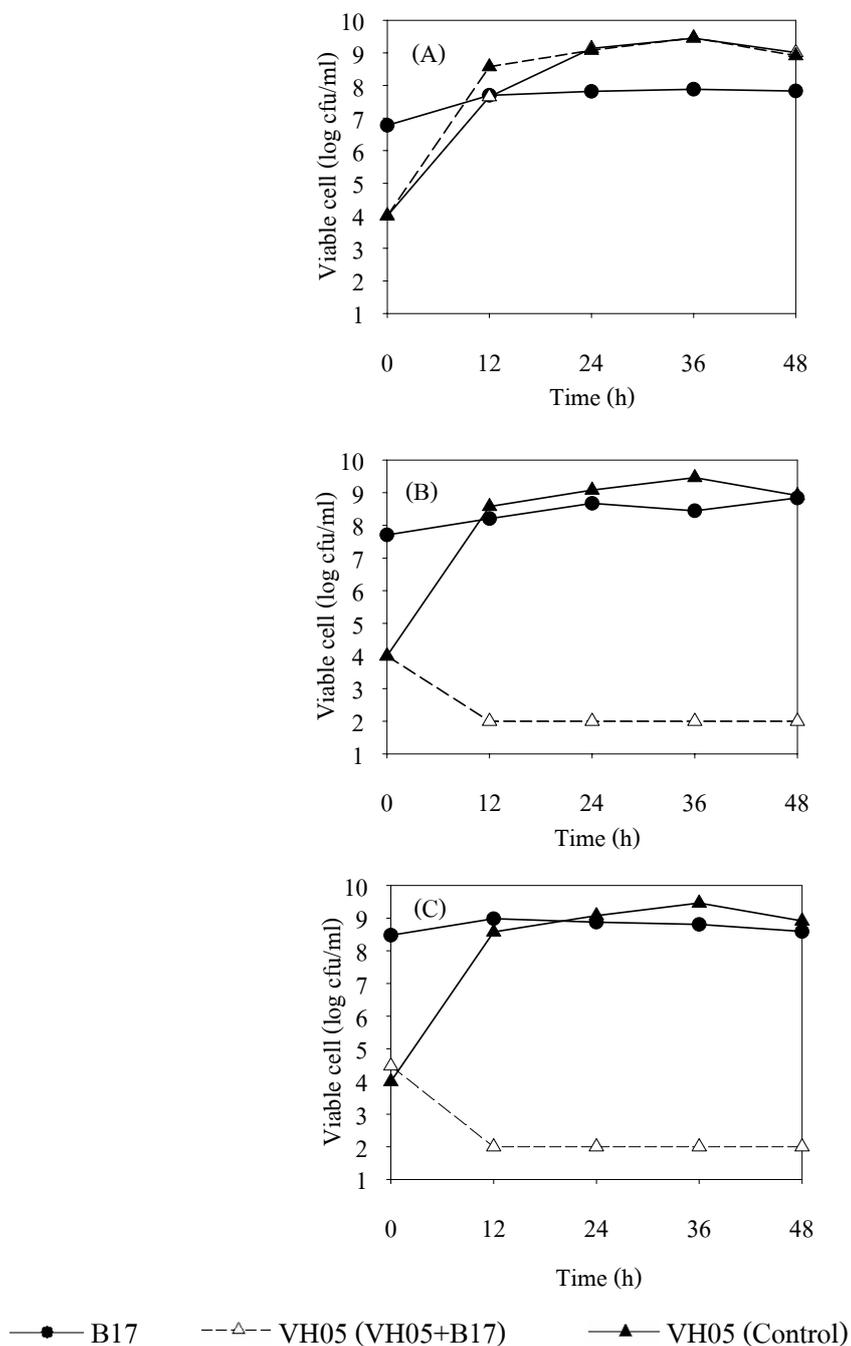


ภาพที่ 2 ผลของความเข้มข้นของ B17 ต่อการยับยั้งการเติบโตของ VH05 ที่ความเข้มข้น  $10^2$  cfu/ml

A: B17 ที่ความเข้มข้น ปริมาณ  $10^6$  cfu/ml

B: B17 ที่ความเข้มข้น ปริมาณ  $10^7$  cfu/ml

C: B17 ที่ความเข้มข้น ปริมาณ  $10^8$  cfu/ml

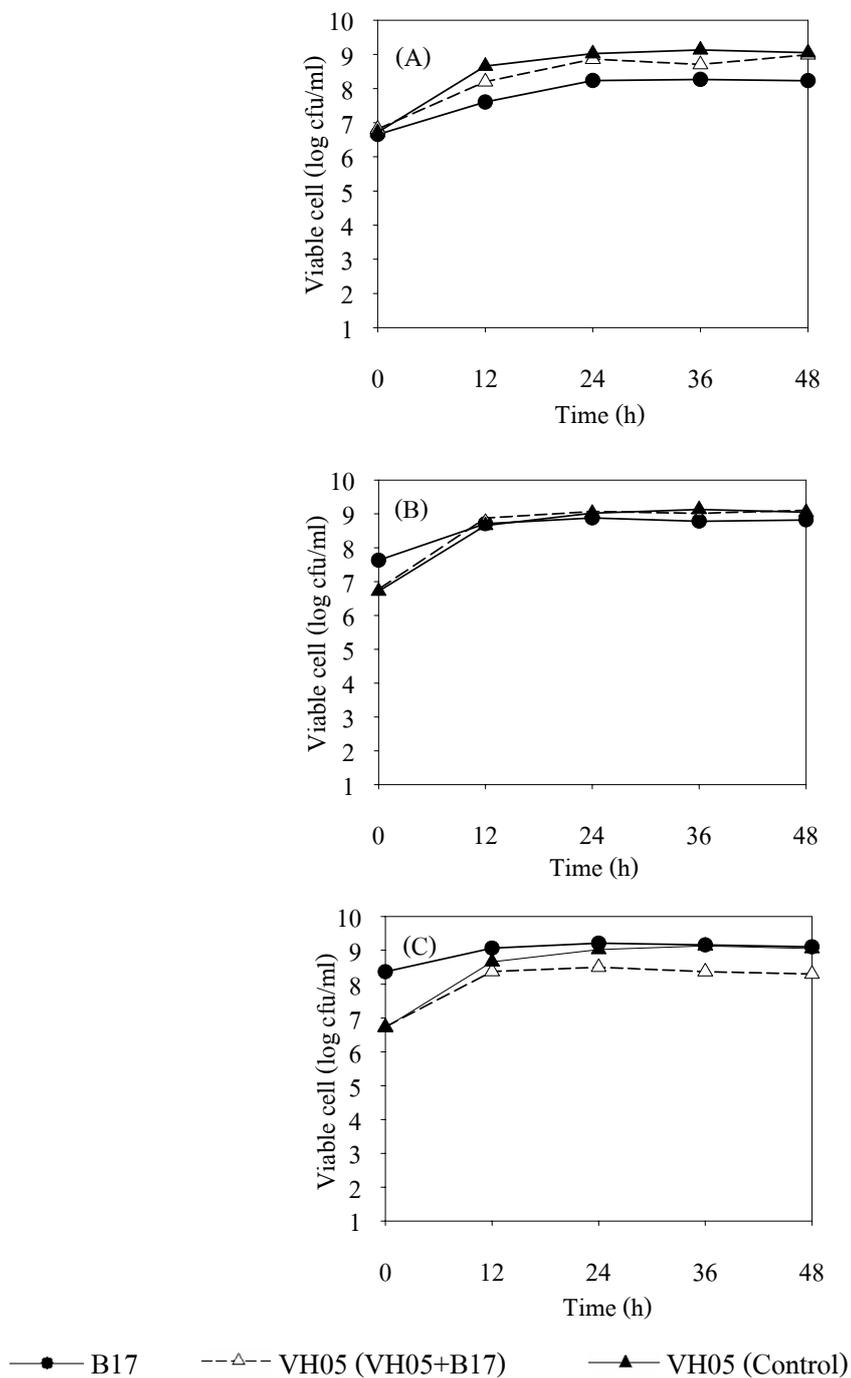


ภาพที่ 3 ผลของความเข้มข้นของ B17 ต่อการยับยั้งการเติบโตของ VH05 ที่ความเข้มข้น  $10^4$  cfu/ml

A: B17 ที่ความเข้มข้น ปริมาณ  $10^6$  cfu/ml

B: B17 ที่ความเข้มข้น ปริมาณ  $10^7$  cfu/ml

C: B17 ที่ความเข้มข้น ปริมาณ  $10^8$  cfu/ml

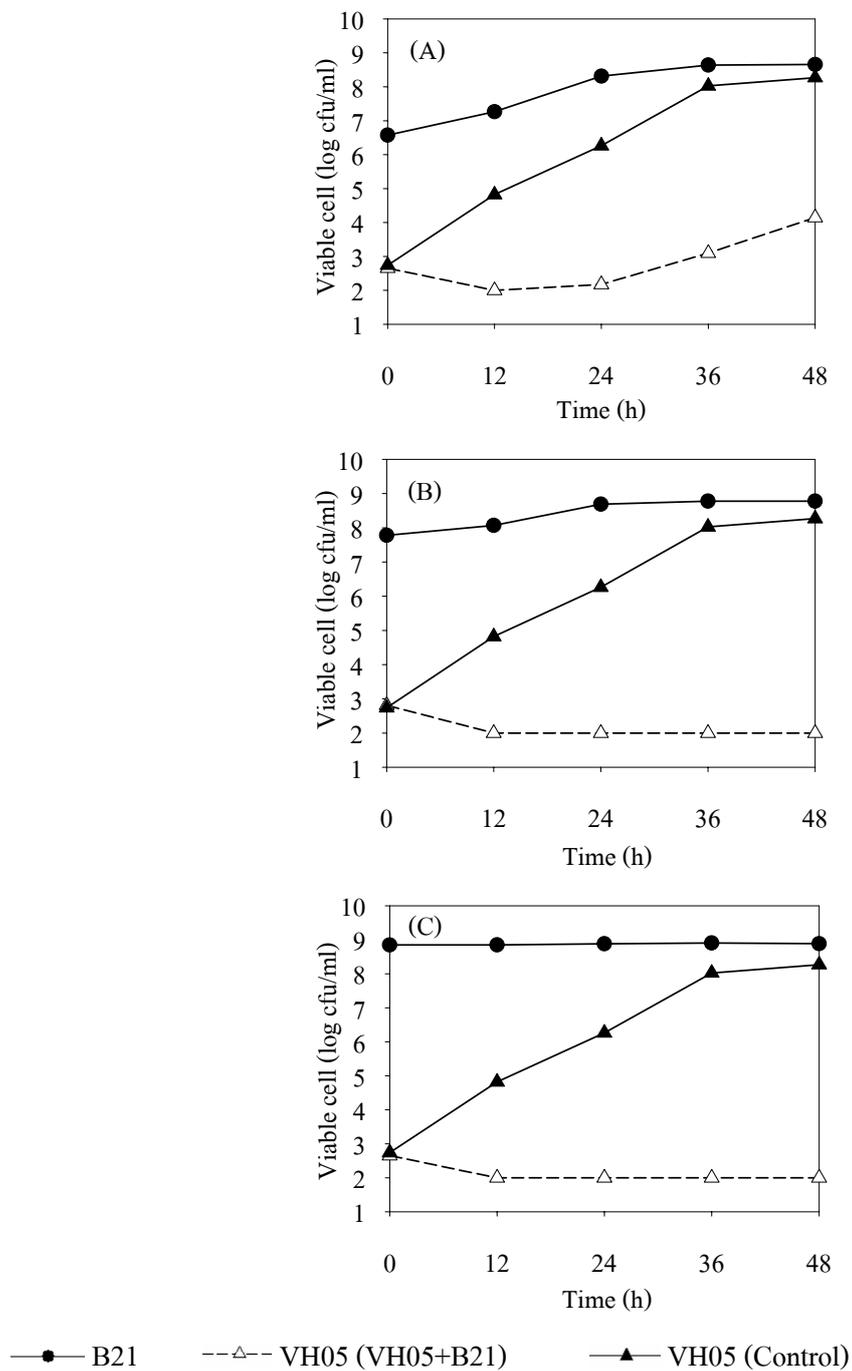


ภาพที่ 4 ผลของความเข้มข้นของ B17 ต่อการยับยั้งการเติบโตของ VH5 ที่ความเข้มข้น  $10^6$  cfu/ml

A: B17 ที่ความเข้มข้น ปริมาณ  $10^6$  cfu/ml

B: B17 ที่ความเข้มข้น ปริมาณ  $10^7$  cfu/ml

C: B17 ที่ความเข้มข้น ปริมาณ  $10^8$  cfu/ml

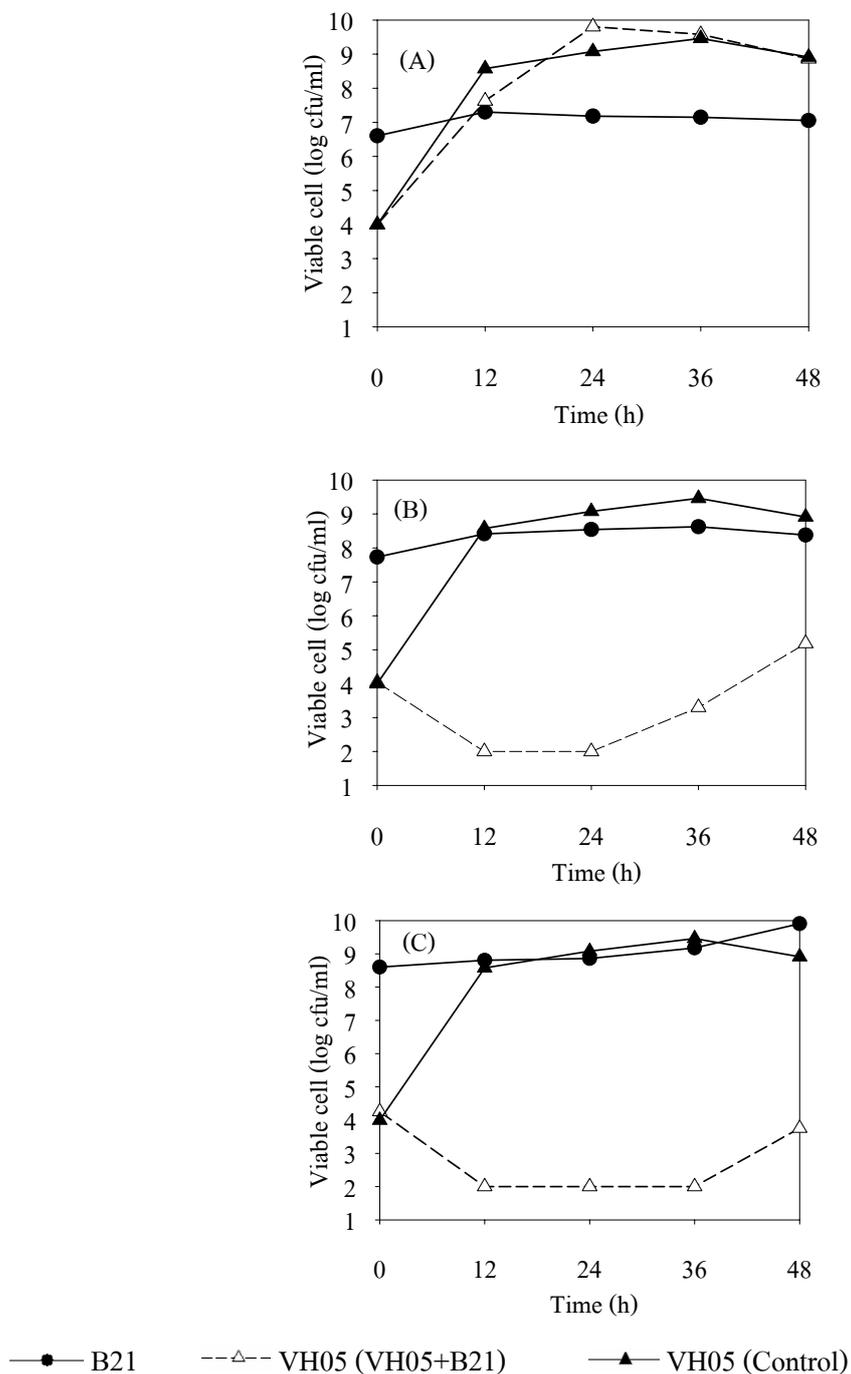


ภาพที่ 5 ผลของความเข้มข้นของ B21 ต่อการยับยั้งการเติบโตของ VH05 ที่ความเข้มข้น  $10^2$  cfu/ml

A: B21 ที่ความเข้มข้น ปริมาณ  $10^6$  cfu/ml

B: B21 ที่ความเข้มข้น ปริมาณ  $10^7$  cfu/ml

C: B21 ที่ความเข้มข้น ปริมาณ  $10^8$  cfu/ml

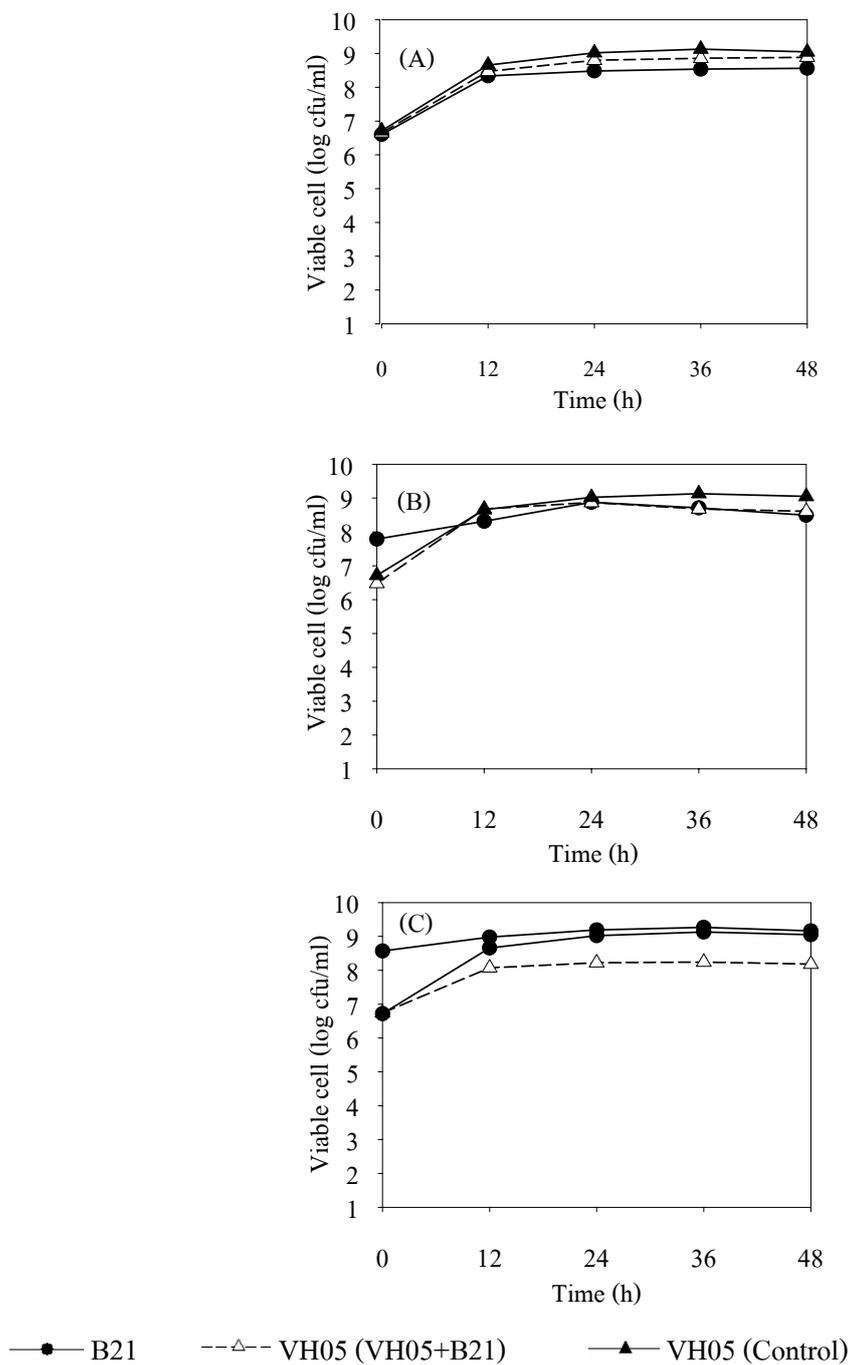


ภาพที่ 6 ผลของความเข้มข้นของ B21 ต่อการยับยั้งการเติบโตของ VH05 ที่ความเข้มข้น  $10^4$  cfu/ml

A: B21 ที่ความเข้มข้น ปริมาณ  $10^6$  cfu/ml

B: B21 ที่ความเข้มข้น ปริมาณ  $10^7$  cfu/ml

C: B21 ที่ความเข้มข้น ปริมาณ  $10^8$  cfu/ml

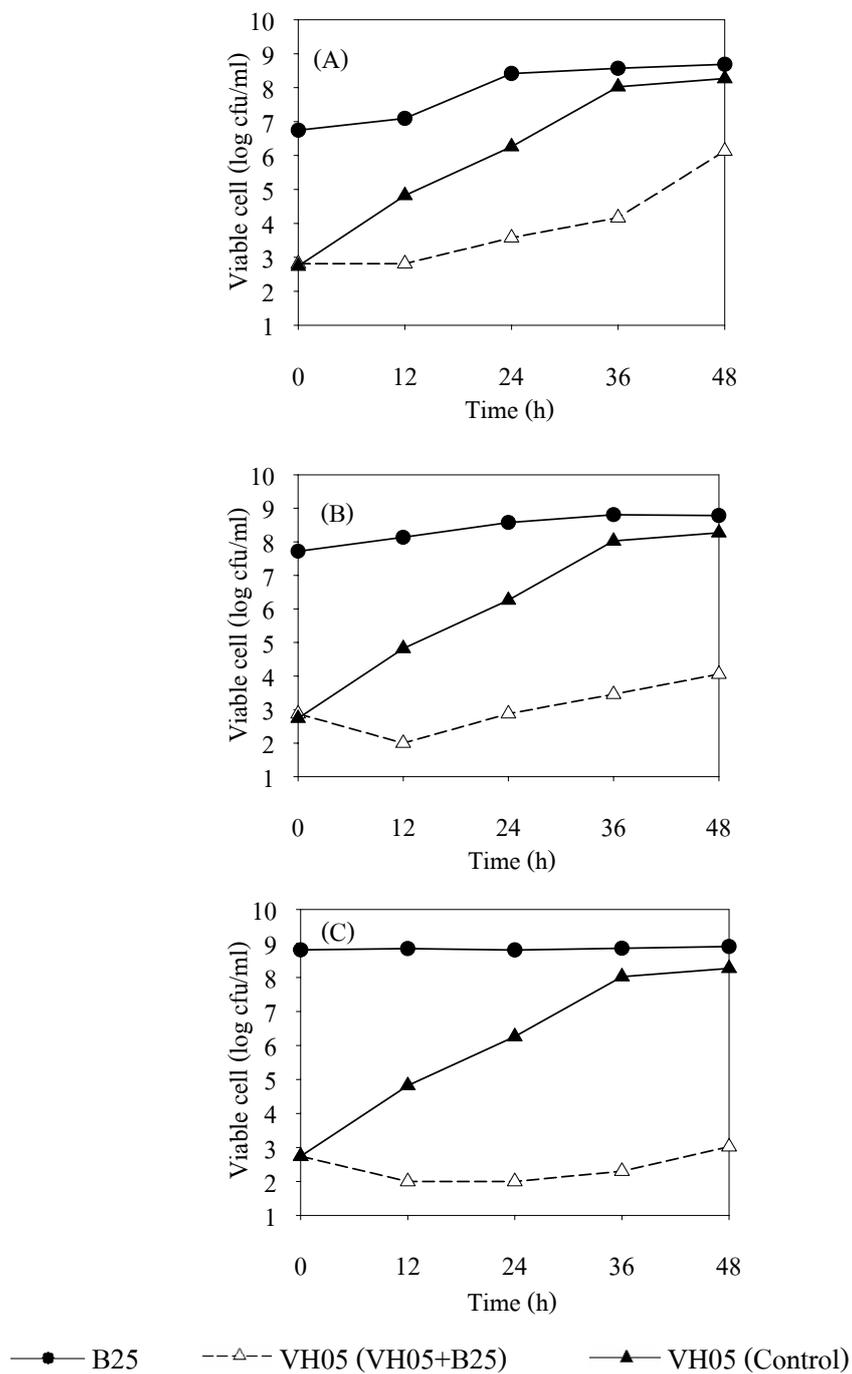


ภาพที่ 7 ผลของความเข้มข้นของ B21 ต่อการยับยั้งการเติบโตของ VH05 ที่ความเข้มข้น  $10^6$  cfu/ml

A: B21 ที่ความเข้มข้น ปริมาณ  $10^6$  cfu/ml

B: B21 ที่ความเข้มข้น ปริมาณ  $10^7$  cfu/ml

C: B21 ที่ความเข้มข้น ปริมาณ  $10^8$  cfu/ml

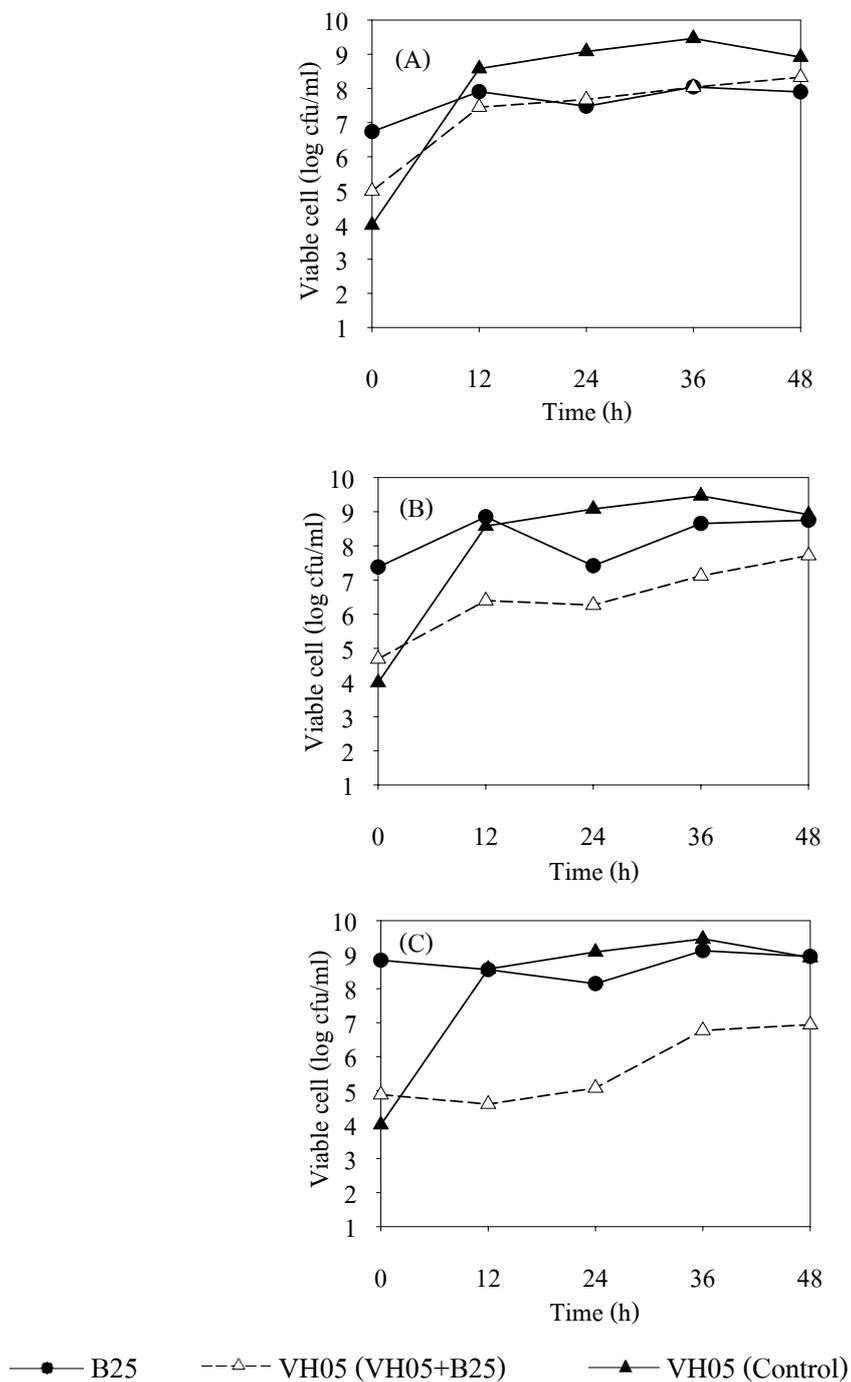


ภาพที่ 8 ผลของความเข้มข้นของ B25 ต่อการยับยั้งการเติบโตของ VH05 ที่ความเข้มข้น  $10^2$  cfu/ml

A: B25 ที่ความเข้มข้น ปริมาณ  $10^6$  cfu/ml

B: B25 ที่ความเข้มข้น ปริมาณ  $10^7$  cfu/ml

C: B25 ที่ความเข้มข้น ปริมาณ  $10^8$  cfu/ml

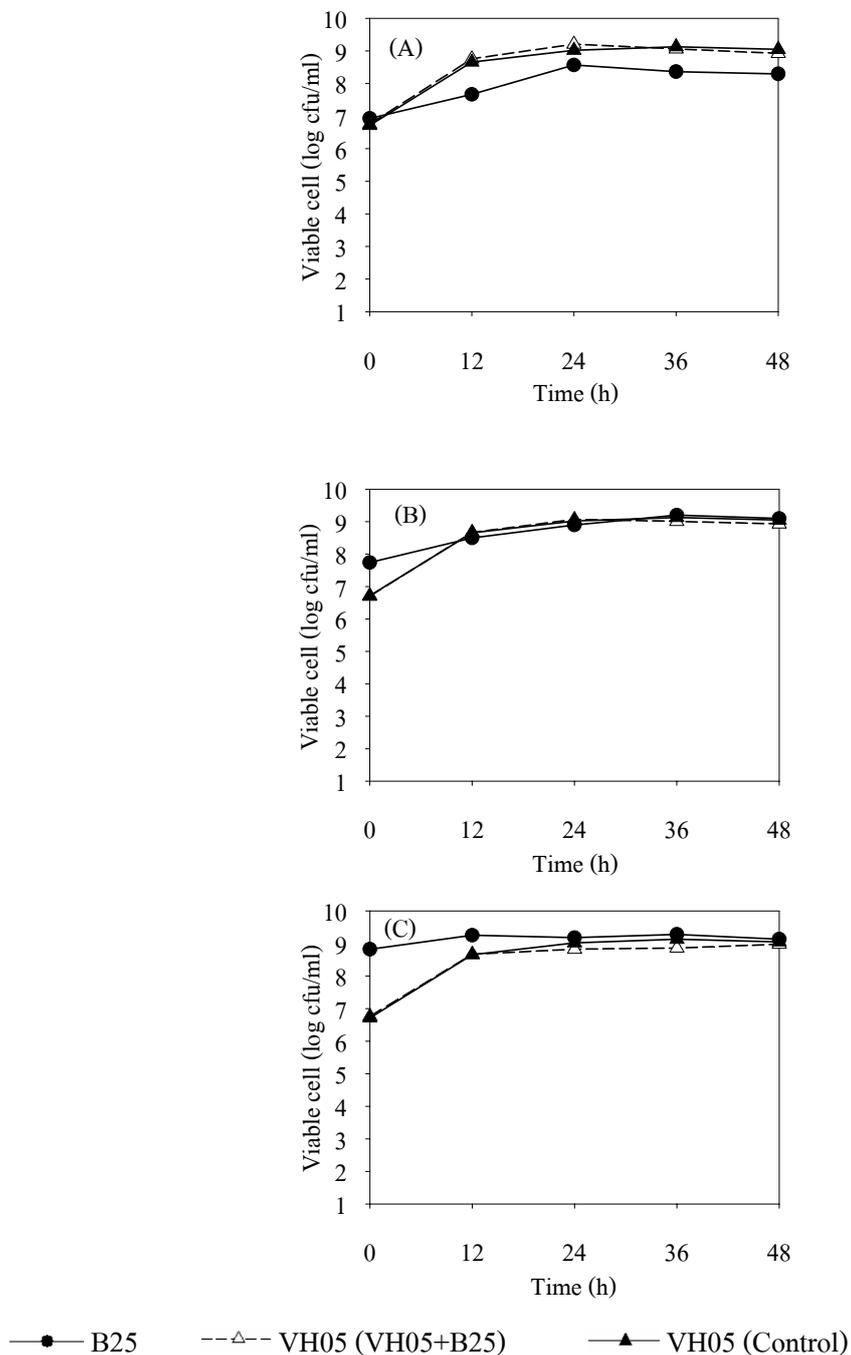


ภาพที่ 9 ผลของความเข้มข้นของ B25 ต่อการยับยั้งการเติบโตของ VH5 ที่ความเข้มข้น  $10^4$  cfu/ml

A: B25 ที่ความเข้มข้น ปริมาณ  $10^6$  cfu/ml

B: B25 ที่ความเข้มข้น ปริมาณ  $10^7$  cfu/ml

C: B25 ที่ความเข้มข้น ปริมาณ  $10^8$  cfu/ml



ภาพที่ 10 ผลของความเข้มข้นของ B25 ต่อการยับยั้งการเติบโตของ VH05 ที่ความเข้มข้น  $10^6$  cfu/ml

A: B25 ที่ความเข้มข้น ปริมาณ  $10^6$  cfu/ml

B: B25 ที่ความเข้มข้น ปริมาณ  $10^7$  cfu/ml

C: B25 ที่ความเข้มข้น ปริมาณ  $10^8$  cfu/ml

ตารางที่ 7 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ B17, B21 และ B25 ที่ยับยั้งการเติบโตของ VH05

ความเข้มข้นของVH05 (cfu/ml)	ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้ง (cfu/ml)		
	B17	B21	B25
$10^2$	$10^6$	$10^6$	$10^6$
$10^4$	$10^7$	$10^7$	$10^7$
$10^6$	$10^8$	$10^8$	-

จากผลการทดลองพบว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้ง *Vibrio* spp. จะขึ้นกับปริมาณเชื้อเริ่มต้นของเชื้อก่อโรค (ตารางที่ 7) ความเข้มข้นต่ำสุดของ B17, B21 และ B25 เท่ากับ  $10^6$  cfu/ml สามารถยับยั้งการเติบโตของ VH05 ที่ความเข้มข้น  $10^6$  cfu/ml ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่บ่งบอกถึงสถานะอันตรายที่มีการติดเชื้อในน้ำ แต่กึ่งกลางค่าจะยังคงไม่แสดงอาการเพียงแต่มีการสะสมของเชื้อเข้าสู่ตัวกุ้งโดยทางปากและทางผิวหนัง (Leano *et al.*, 1998) และที่  $10^7$  cfu/ml *Bacillus* ทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งการเติบโตของ VH05 ที่ความเข้มข้น  $10^4$  cfu/ml ซึ่งเป็นปริมาณที่ทำให้เกิดโรคในกุ้ง (Sung *et al.*, 2001) ในขณะที่ VH05 ความเข้มข้น  $10^6$  cfu/ml B17 และ B21 สามารถยับยั้งการเติบโตของ VH05 ที่ความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับ  $10^8$  cfu/ml

ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับรายงานของ Purivirojkul *et al.* (2006b) ที่ใช้ *B. pumilus* NW01, *B. sphaericus* NW02 และ *B. subtilis* NW03 ปริมาณเชื้อเริ่มต้น  $10^2$ - $10^3$  cfu/ml ยับยั้งการเติบโตของ *V. harveyi* ปริมาณเชื้อเริ่มต้น  $10^2$  cfu/ml พบว่าภายใน 48 ชั่วโมง *Bacillus* spp. ทั้ง 3 ชนิดไม่สามารถยับยั้งการเติบโตของ *V. harveyi* ได้ โดยมีปริมาณ *V. harveyi* เพิ่มขึ้นเป็น  $10^4$  cfu/ml ในทำนองเดียวกันการใช้ *Bacillus* WL01 และ *Bacillus* W1106 ความเข้มข้น  $10^6$  cfu/ml เลี้ยงร่วมกับ *V. harveyi* AQVH ความเข้มข้น  $10^6$  cfu/ml พบว่าเมื่อผ่านไป 48 ชั่วโมงไม่สามารถยับยั้ง *V. harveyi* AQVH ได้ (Purivirojkul and Arechon, 2007) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า *Bacillus* spp. ที่ใช้มีปริมาณน้อยเกินไปทำให้ไม่สามารถยับยั้ง *Vibrio* spp. ได้ ซึ่งสอดคล้องกับการใช้ B17, B21 และ 25 ที่ความเข้มข้น  $10^6$  cfu/ml ในการทดลองนี้

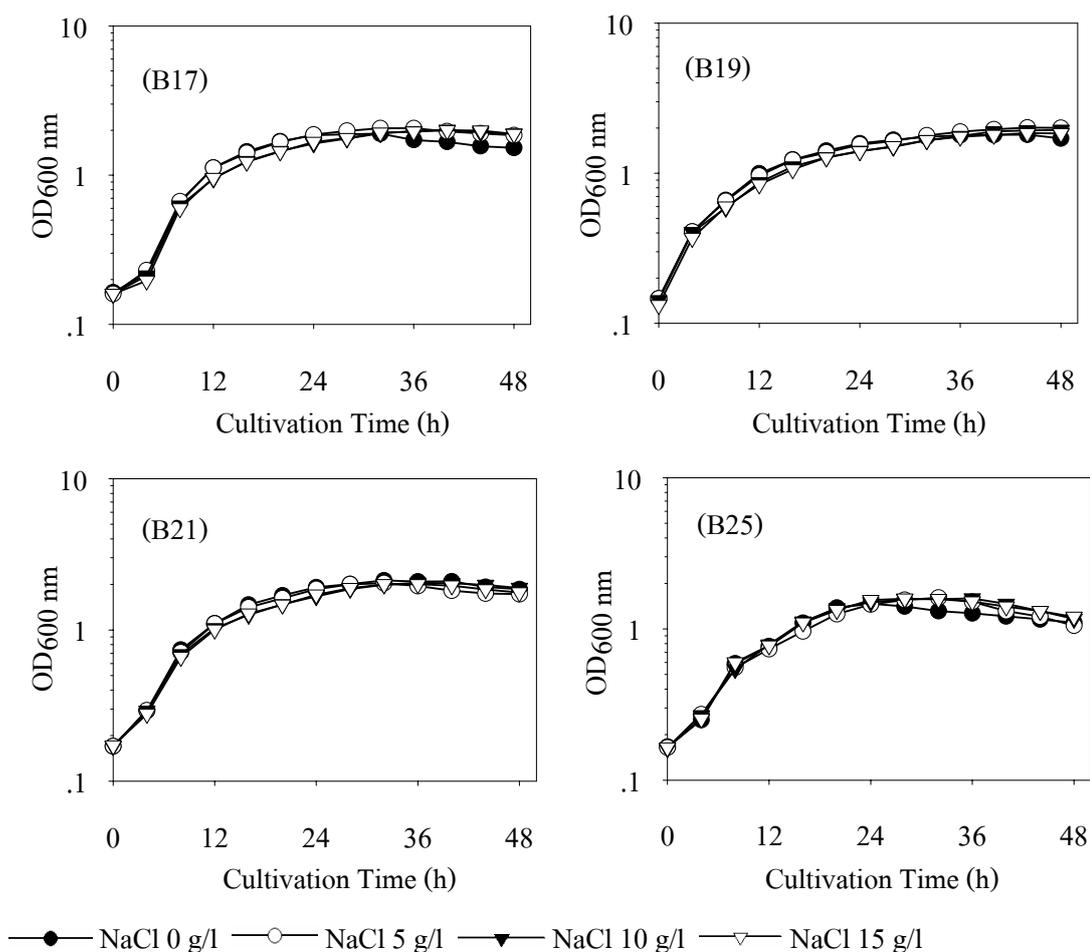
เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองกับ Hai *et al.* (2007) ที่ใช้ *Pseudomonas synxantha* หรือ *P. aeruginosa* ปริมาณเชื้อเริ่มต้น  $10^8$  cfu/ml เลี้ยงร่วมกับ *Vibrio* spp. ( $10^3$  cfu/ml) เมื่อเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมง ปริมาณ *Vibrio* spp. ลดลงเล็กน้อยแต่ยังคงเหลือประมาณ  $10^3$  cfu/ml ให้ผล

ใกล้เคียงกับการใช้ B21 ที่เลี้ยงร่วมกับ VH05 ปริมาณเริ่มต้น  $10^4$  cfu/ml ที่คงเหลือ VH05 ประมาณ  $10^3$  cfu/ml เช่นกัน แต่มีประสิทธิภาพน้อยกว่า B17 ที่สามารถยับยั้ง VH05 ได้ทั้งหมด

#### 4. ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเติบโตของ *Bacillus* spp.

##### 4.1 ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเติบโตของ *Bacillus* spp.

เนื่องจากโซเดียมคลอไรด์เป็นองค์ประกอบในน้ำทะเล ที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ดังนั้นการทดลองนี้จึงศึกษาผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเติบโตของ B17, B19, B21 และ B25



ภาพที่ 11 ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเติบโตของ *Bacillus* spp.

ผลการศึกษาดังแสดงในภาพที่ 11 พบว่า B17, B19, B21 และ B25 เติบโตได้ดีใกล้เคียงกัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0, 5, 10 และ 15 g/l โดยมีการเติบโตสูงสุดที่วัดเป็นค่า OD<sub>600</sub> อยู่ในช่วง 1.90-2.06, 1.81-2.01, 2.04-2.12 และ 1.47-1.61 ตามลำดับ ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับ Purivirojkul *et al.* (2005) ที่รายงานว่า *B. pumilus*, *B. sphaericus*, และ *B. subtilis* สามารถเติบโตได้ในอาหารที่มีความเค็มอยู่ในช่วง 0-8% NaCl และจากรายงานของ Kubo *et al.* (2001) พบว่า *B. cereus* CH-6 เติบโตได้ดีในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-15% (w/v) ในทำนองเดียวกัน Douglas *et al.* (1995) รายงานว่า *B. pumilus* ต้องการโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมต่อการเติบโตเท่ากับ 10-30 g/l และ Anthony *et al.* (2009) พบว่า *Bacillus licheniformis* AnBa9 ต้องการโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมต่อการเติบโตในอาหารเท่ากับ 8.5 g/l

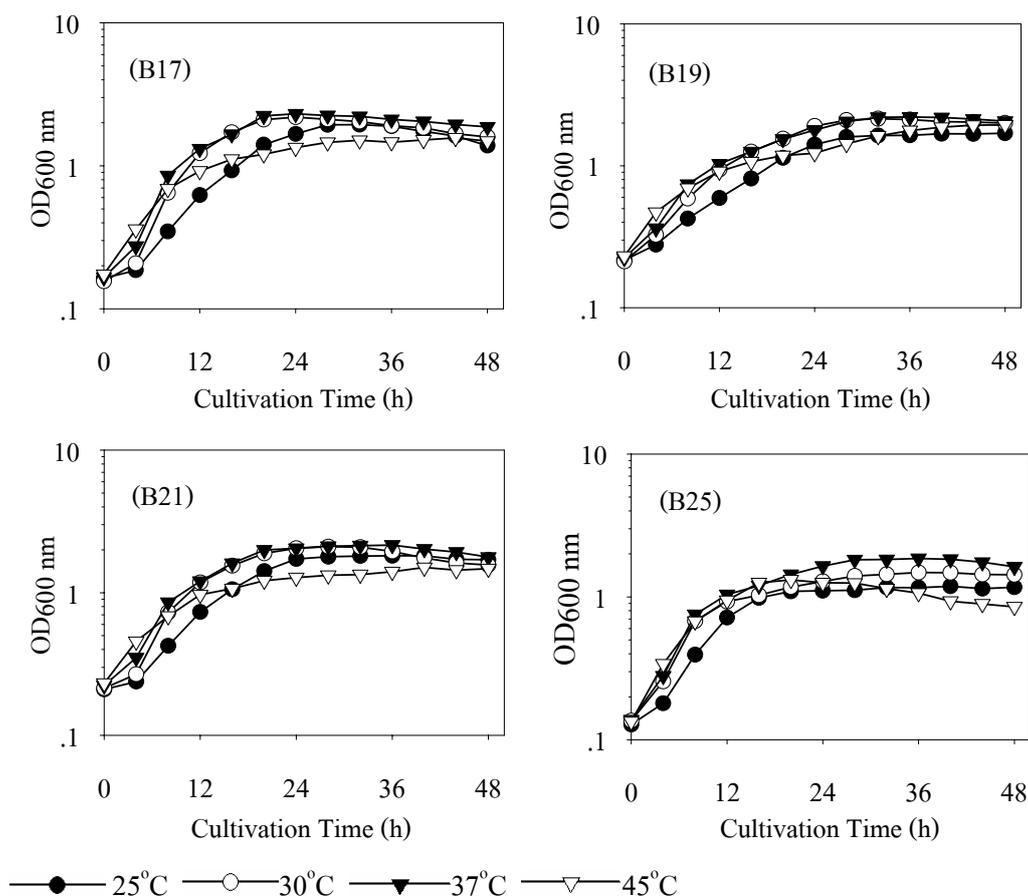
นอกจากนี้ Nekolny and Chaloupka (2000) รายงานว่าความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในอาหารมากเกินไป จะทำให้การเติบโตของ *Bacillus* ช้าลง และอัตราการเติบโตสูงสุดลดลง โดยพบว่า การเติบโตของ *B. megaterium* ในอาหาร SG medium ที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0M และ 0.5M ดีกว่าที่ความเข้มข้น 0.75M และ 1M เช่นเดียวกับ Kubo *et al.* (2001) ที่พบว่าในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นมากกว่า 15% (w/v) *B. cereus* CH-6 เติบโตลดลงเป็นอย่างมาก ในทำนองเดียวกัน *B. pumilus* ที่เติบโตได้ดีในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0-30 g/l แต่เติบโตได้ไม่ดีในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ 40-80 g/l และไม่เติบโตที่ความเข้มข้น 90-100 g/l (Marshall and Odame-Darkwah, 1995)

ผลการทดลองและรายงานที่ผ่านมาจะเห็นได้ว่า โซเดียมคลอไรด์มีผลต่อการส่งเสริมการเติบโตของ *Bacillus* เนื่องจากโซเดียมคลอไรด์จะเร่งการสังเคราะห์โปรตีนภายในเซลล์ โดยเพิ่มการแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของสารและไอออนเข้าไปในเซลล์ ในขณะที่เดียวกันเซลล์ก็มีการสะสมของกรดอะมิโนที่ทำหน้าที่ป้องกันการแพร่ที่เยื่อหุ้มเซลล์ เพื่อไม่ให้ไอออนเข้าสู่เซลล์มากเกินไป ซึ่งจะมีผลต่อเสถียรภาพของโปรตีนภายในเซลล์ ทำให้ *Bacillus* สามารถเติบโตได้ในอาหารที่มีเกลือสูงได้ (1.0 ถึง 1.5 M) (Nekolny and Chaloupka, 2000; Palomino *et al.*, 2009) แต่ถ้ามีปริมาณโซเดียมคลอไรด์สูงเกินไป เซลล์จะมีการสร้างสารป้องกันการแพร่มากขึ้น ทำให้เกิดการยับยั้งการสร้างเอนไซม์บางชนิด ส่งผลให้การเติบโตของ *Bacillus* ช้าลง (Douglas *et al.*, 1995)

เนื่องจากโซเดียมคลอไรด์มีผลต่อการสังเคราะห์โปรตีน เอนไซม์ และสารยับยั้งของ *Bacillus* และแบคทีเรียทดสอบทั้ง 4 สายพันธุ์สามารถเติบโตได้ดีในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0-15 g/l ดังนั้นจึงเลือกโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 15 g/l ในการเพาะเลี้ยงเชื้อทดสอบต่อไป

#### 4.2 ผลของอุณหภูมิต่อการเติบโตของ *Bacillus* spp.

การเติบโตของ *Bacillus* spp. วัดเป็นค่า OD<sub>600</sub> ดังแสดงในภาพที่ 12 พบว่า B17 เติบโตได้ดีใกล้เคียงกันที่อุณหภูมิ 30 และ 37°C มี OD สูงสุด เท่ากับ 2.19 และ 2.30 ตามลำดับ และเติบโตได้ดีกว่าที่อุณหภูมิ 25 และ 45°C โดยมี OD สูงสุด เท่ากับ 1.94 และ 1.57 ตามลำดับ ในขณะที่ B19 เติบโตได้ดีใกล้เคียงกันที่อุณหภูมิ 30 และ 37°C (OD สูงสุด เท่ากับ 2.15 และ 2.20 ตามลำดับ) แต่เติบโตที่ 45°C ดีกว่าที่ 25°C มี OD สูงสุด เท่ากับ 1.94 และ 1.7 ตามลำดับ



ภาพที่ 12 ผลของอุณหภูมิต่อการเติบโตของ *Bacillus* spp.

B21 เติบโตได้ดีใกล้เคียงกันที่อุณหภูมิ 30 และ 37°C (OD สูงสุด เท่ากับ 2.10 และ 2.16 ตามลำดับ) และเติบโตได้ดีกว่าที่อุณหภูมิ 25 และ 45°C และพบว่าในช่วง 16 ชั่วโมงแรก ที่อุณหภูมิ 45°C B21 เติบโตเร็วกว่าที่อุณหภูมิ 25°C หลังจากนั้นมีการเติบโตต่ำกว่าที่อุณหภูมิ 25°C ทำให้ที่อุณหภูมิ 25°C มีการเติบโตสูงสุด (OD สูงสุด เท่ากับ 1.82) มากกว่าที่อุณหภูมิ 45°C (OD สูงสุด เท่ากับ 1.50)

B25 เติบโตใกล้เคียงกัน ที่อุณหภูมิ 30 และ 37°C ในช่วง 20 ชั่วโมงแรก จากนั้นที่อุณหภูมิ 37°C เติบโตเร็วกว่า ทำให้ที่อุณหภูมิ 37°C มีการเติบโตสูงสุดมากกว่าที่ 30°C (OD สูงสุด เท่ากับ 1.86 และ 1.48 ตามลำดับ) ส่วน B25 ที่อุณหภูมิ 45°C เติบโตใกล้เคียงกับที่อุณหภูมิ 30 และ 37°C ในช่วง 20 ชั่วโมงแรก หลังจากนั้นมีการเติบโตที่ต่ำกว่า (OD สูงสุด เท่ากับ 1.32) สำหรับที่อุณหภูมิ 25°C เติบโตช้ากว่าอุณหภูมิอื่นๆ ในช่วง 24 ชั่วโมงแต่หลังจากนั้นมีการเติบโตใกล้เคียงกับที่อุณหภูมิ 45°C และเติบโตดีกว่าหลังชั่วโมงที่ 36 โดยมี OD สูงสุด เท่ากับ 1.19

ผลการทดลองจะเห็นว่า B17, B19, B21 และ B25 เติบโตได้ดีใกล้เคียงกันที่อุณหภูมิ 30 และ 37°C ส่วนที่อุณหภูมิ 25°C และ 45°C จุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 4 สายพันธุ์เติบโตได้ช้า สอดคล้องกับการทดลองของ Moita *et al.* (2005) ที่รายงานว่า *B. subtilis* CCMI 355 สามารถเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 27°C ถึง 34°C ส่วน *B. bataviensis* DSM 1560, *B. niacini* DSM 2923, *B. flexus* DSM 1320 และ *B. firmus* DSM 12 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเติบโตเท่ากับ 30°C (Abdelkafi *et al.*, 2005) เช่นเดียวกับ *B. licheniformis* P40 เติบโตและผลิตเบคเทอริโอซินได้ดีที่อุณหภูมิ 30 °C (Cladera-Olivera *et al.*, 2004)

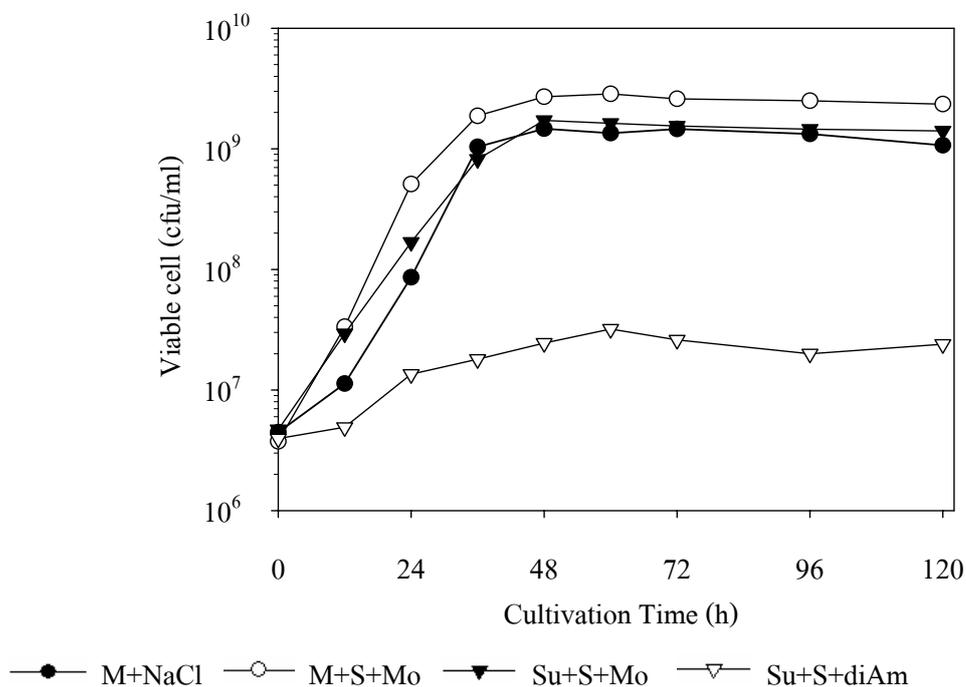
Sen and Babub (2005) รายงานว่า *B. coagulans* RK-02 เติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 38.3°C ส่วน *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. pumilus* และ *B. circulans* เติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 37°C (Encinas *et al.*, 1996) เช่นเดียวกับ Abdelkafi *et al.* (2005) ที่ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเติบโตของ *Bacillus* spp. YAS1 โดยแปรผันอุณหภูมิตั้งแต่ 25°C ถึง 45°C พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเติบโตของ *Bacillus* spp. YAS1 คือ 37°C และ Syu and Chen (1997) ศึกษาการเพาะเลี้ยง *B. amyloliquefaciens* โดยเปรียบเทียบอุณหภูมิที่ 30°C และ 37°C ผลการทดลองพบว่า *B. amyloliquefaciens* เติบโตที่อุณหภูมิ 37 °C ได้ดีกว่าที่ 30°C ในทำนองเดียวกัน Anthony *et al.*, 2009) พบว่า *B. licheniformis* AnBa9 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเติบโตเท่ากับ 37°C

อุณหภูมิมีอิทธิพลต่อการเติบโตของ *Bacillus* spp. รวมทั้งการใช้สารอาหาร และเมทาบอไลต์ต่างๆภายในเซลล์ การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงทำให้การทำงานของเซลล์ และไขมันซึ่งเป็นองค์ประกอบในเยื่อหุ้มเซลล์ของ *Bacillus* เปลี่ยนแปลงไป (Mayo and Noike, 1996) ที่อุณหภูมิต่ำอัตราการเกิดปฏิกิริยาเคมีในเซลล์ของจุลินทรีย์ลดลง และไขมันที่ผนังเซลล์ของจุลินทรีย์แข็งตัวจนไม่สามารถทำงานเป็นปกติได้ (Waite *et al.*, 2001) ที่อุณหภูมิสูงพบว่าไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์จะอยู่ในรูปของของเหลวมากขึ้น เนื่องจากกรดไขมันชนิดอิ่มตัวในเยื่อหุ้มเซลล์เพิ่มสูงขึ้น ในขณะที่กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวลดลง ส่งผลให้การผ่านเข้าออกของโปรตรอนและไอออนของโซเดียมจะสูงขึ้น เกิดการสังเคราะห์สารและโปรตีนในเซลล์มากขึ้น แต่ถ้าอุณหภูมิสูงเกินไป โปรตีน กรดนิวคลีอิก และไขมัน ที่มีอยู่ในจุลินทรีย์ก็จะถูกทำลาย (van de Vossenberg *et al.*, 1999; Saint-Pierre-Chazalet *et al.*, 2002)

จากผลการทดลองนี้ การเติบโตของ *Bacillus* spp. ทั้ง 4 สายพันธุ์ ที่ 30 และ 37°C ดีใกล้เคียงกัน แต่ที่ 37°C เติบโตดีกว่าที่ 30°C เล็กน้อย ดังนั้นจึงเลือกเพาะเลี้ยง *Bacillus* spp. ที่อุณหภูมิ 37°C ในทุกการทดลอง

#### 4.3 ผลของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนต่อการเติบโตของ *Bacillus* spp.

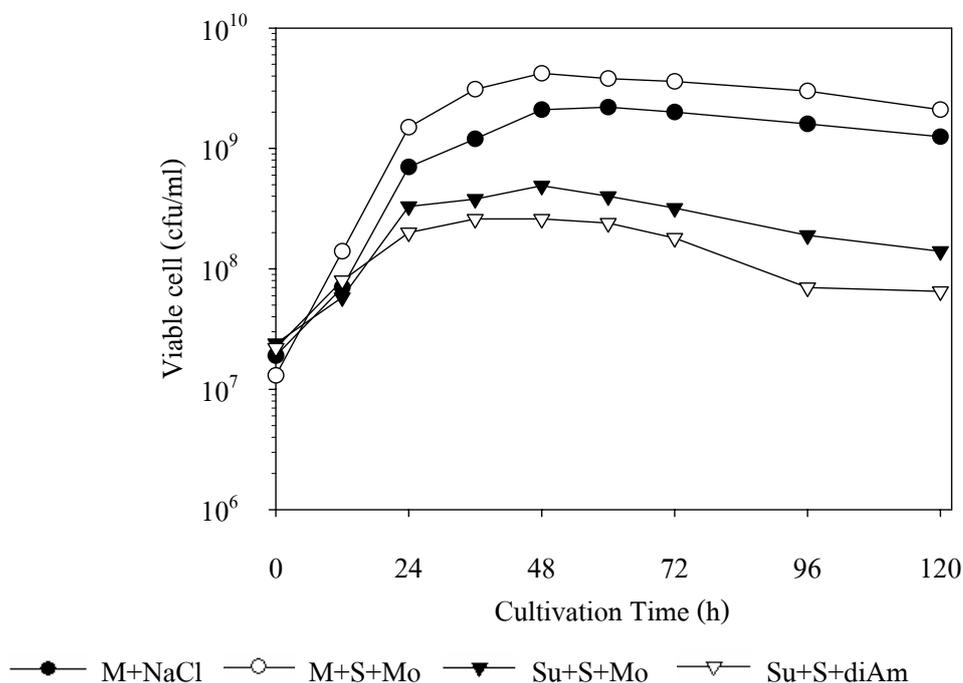
*Bacillus* เติบโตได้ดีในอาหารสำเร็จรูป NB ซึ่งมีราคาสูงมาก หากจะนำไปใช้เป็นอาหารเพื่อผลิต *Bacillus* ในระดับอุตสาหกรรมอาจไม่คุ้มค่า ดังนั้นจึงต้องหาอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณมากและราคาถูก อีกทั้งมีธาตุอาหารที่เพียงพอเหมาะสมต่อการเติบโตของ *Bacillus* ได้ ดังนั้นในการทดลองนี้จะศึกษาการเพาะเลี้ยง *Bacillus* spp. ในอาหารดัดแปร 4 สูตร ที่ใช้แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนราคาถูก โดยเลือกใช้กากน้ำตาลและน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน ใช้โมโนโซเดียมกลูตาเมตและแอมโมเนียมฟอสเฟต เป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนและอนินทรีย์ไนโตรเจน อาหารทั้ง 4 สูตร ได้แก่ molass-NaCl (M+NaCl), molass-Sandril salt-monosodium glutamate (M+S+Mo), sucrose-Sandril salt-monosodium glutamate (Su+S+Mo) และ sucrose-Sandril salt-di ammonium phosphate (Su+S+diAm)



ภาพที่ 13 ผลของอาหารตัดแปรต่อการเติบโตของ B17

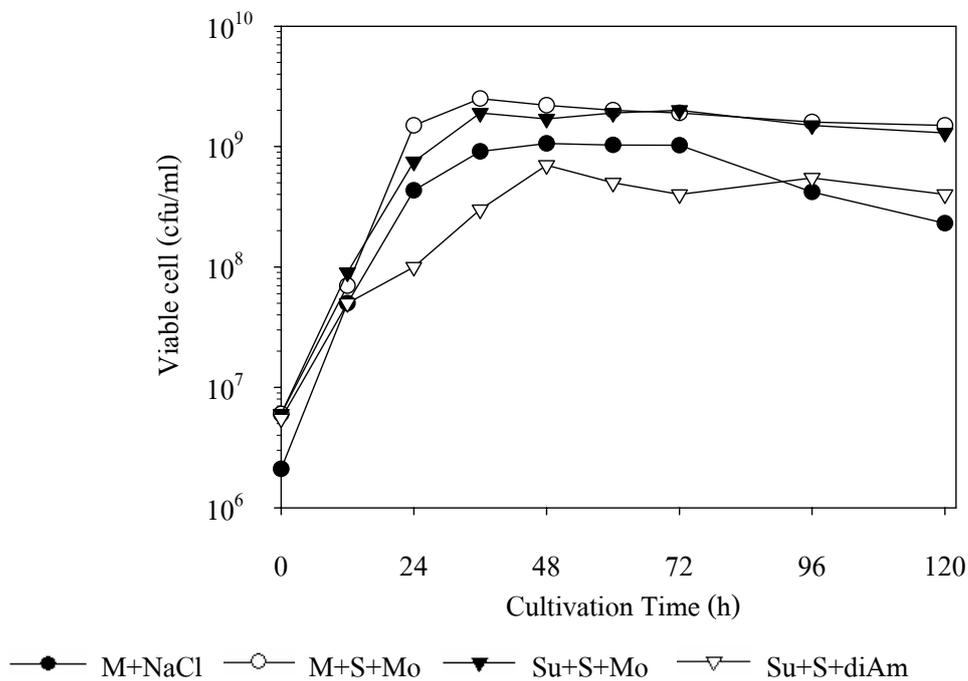
ภาพที่ 13 แสดงให้เห็นว่า B17 เติบโตได้ดีเมื่อใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหาร M+NaCl มีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ  $0.1531 \text{ h}^{-1}$  และได้ปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ  $1.47 \times 10^9 \text{ cfu/ml}$  ที่ 48 ชั่วโมง เมื่อเติมโมโนโซเดียมกลูตาเมตเป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหาร M+S+Mo พบว่า B17 มีการเติบโตดีขึ้นและดีที่สุดเมื่อเทียบกับอาหารสูตรอื่นๆ โดยมีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ  $0.1781 \text{ h}^{-1}$  และได้เซลล์สูงสุดเท่ากับ  $2.85 \times 10^9 \text{ cfu/ml}$  ที่เวลา 60 ชั่วโมง

เมื่อเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนจากกากน้ำตาลเป็นน้ำตาลทรายในอาหาร Su+S+Mo พบว่า B17 มีการเติบโตได้น้อยกว่าใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ  $0.1261 \text{ h}^{-1}$  และได้ปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ  $1.72 \times 10^9 \text{ cfu/ml}$  ที่เวลา 48 ชั่วโมง ทั้งนี้เนื่องจากในกากน้ำตาลมีสารประกอบไนโตรเจนหลายชนิดรวมทั้งกรดอะมิโนและวิตามินที่อาจเป็นประโยชน์ต่อการเติบโตของ B17 ส่วนการใช้แอมโมเนียมฟอสเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหาร Su+S+diAm พบว่า B17 มีการเติบโตได้ต่ำ มีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ  $0.0413 \text{ h}^{-1}$  และได้ปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ  $3.20 \times 10^7 \text{ cfu/ml}$  ที่เวลา 60 ชั่วโมง



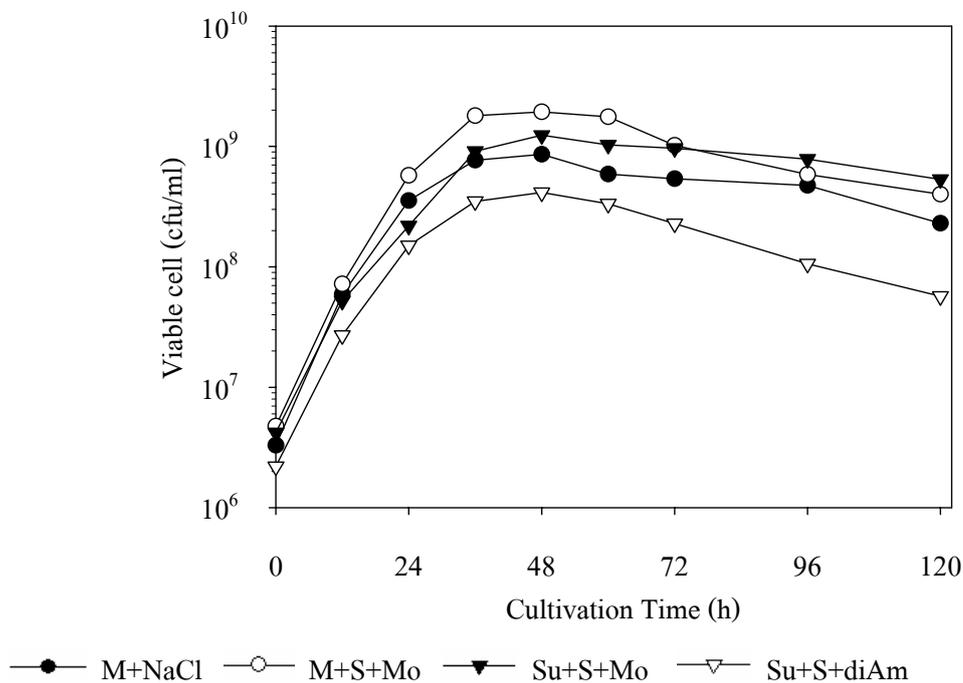
ภาพที่ 14 ผลของอาหารตัดแปรต่อการเติบโตของ B19

เมื่อพิจารณาภาพที่ 14 พบว่า B19 เติบโตได้ดีเมื่อใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหาร M+NaCl มีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ  $0.1021 \text{ h}^{-1}$  และได้ปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ  $2.20 \times 10^9 \text{ cfu/ml}$  ที่เวลา 60 ชั่วโมง เมื่อเติมโมโนโซเดียมกลูตาเมตเป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหาร M+S+Mo พบว่า B19 มีการเติบโตดีขึ้นและดีที่สุดเมื่อเทียบกับอาหารสูตรอื่นๆ โดยมีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ  $0.1566 \text{ h}^{-1}$  และได้เซลล์สูงสุดเท่ากับ  $4.20 \times 10^9 \text{ cfu/ml}$  ที่เวลา 48 ชั่วโมง เมื่อเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนจากกากน้ำตาลเป็นน้ำตาลทรายในอาหาร Su+S+Mo พบว่า B19 มีการเติบโตได้ไม่ดีโดยมีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ  $0.0835 \text{ h}^{-1}$  และได้ปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ  $4.90 \times 10^8 \text{ cfu/ml}$  ที่เวลา 48 ชั่วโมง ส่วนการใช้แอมโมเนียมฟอสเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหาร Su+S+diAm พบว่า B19 มีการเติบโตได้ต่ำ มีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ  $0.0694 \text{ h}^{-1}$  และได้ปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ  $2.60 \times 10^8 \text{ cfu/ml}$  ที่เวลา 36 ชั่วโมง



ภาพที่ 15 ผลของอาหารคัดแปรต่อการเติบโตของ B21

ดังภาพที่ 15 พบว่า B21 เติบโตได้ดีเมื่อใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหาร M+NaCl มีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ  $0.1280 \text{ h}^{-1}$  และได้ปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ  $1.06 \times 10^9 \text{ cfu/ml}$  ที่เวลา 48 ชั่วโมง เมื่อเติมโมโนโซเดียมกลูตาเมตเป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหาร M+S+Mo พบว่า B21 มีการเติบโตดีขึ้นและดีที่สุดเมื่อเทียบกับอาหารสูตรอื่นๆ โดยมีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ  $0.1763 \text{ h}^{-1}$  และได้ปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ  $2.5 \times 10^9 \text{ cfu/ml}$  ที่เวลา 36 ชั่วโมง เมื่อเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนจากกากน้ำตาลเป็นน้ำตาลทรายในอาหาร Su+S+Mo พบว่า B21 มีการเติบโตได้ดีใกล้เคียงกับการใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหาร M+S+Mo โดยมีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ  $0.1616 \text{ h}^{-1}$  และได้ปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ  $2.00 \times 10^9 \text{ cfu/ml}$  ที่เวลา 72 ชั่วโมง ส่วนการใช้แอมโมเนียมฟอสเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหาร Su+S+diAm พบว่า B21 มีการเติบโตได้พอสมควร มีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ  $0.1058 \text{ h}^{-1}$  และได้ปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ  $7.00 \times 10^8 \text{ cfu/ml}$  ที่เวลา 48 ชั่วโมง



ภาพที่ 16 ผลของอาหารตัดแปรต่อการเติบโตของ B25

B25 เติบโตได้ดีเมื่อใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหาร M+NaCl (ภาพที่ 16) มีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ  $0.153 \text{ h}^{-1}$  และได้ปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ  $8.60 \times 10^8 \text{ cfu/ml}$  ที่เวลา 48 ชั่วโมง เมื่อเติมโมโนโซเดียมกลูตาเมตเป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหาร M+S+Mo พบว่า B25 มีการเติบโตดีขึ้นและดีที่สุดเมื่อเทียบกับอาหารสูตรอื่นๆ โดยมีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ  $0.1658 \text{ h}^{-1}$  และได้ปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ  $1.94 \times 10^9 \text{ cfu/ml}$  ที่เวลา 48 ชั่วโมง เมื่อเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนจากกากน้ำตาลเป็นน้ำตาลทรายในอาหาร Su+S+Mo พบว่า B25 มีการเติบโตได้น้อยกว่าใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีอัตราเติบโตจำเพาะเท่ากับ  $0.1464 \text{ h}^{-1}$  มีปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ  $1.24 \times 10^9 \text{ cfu/ml}$  ที่เวลา 48 ส่วนการใช้แอมโมเนียมฟอสเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหาร Su+S+diAm พบว่า B25 มีการเติบโตได้พอสมควร มีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ  $0.1410 \text{ h}^{-1}$  และได้ปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ  $4.15 \times 10^8 \text{ cfu/ml}$  ที่เวลา 48 ชั่วโมง

ตารางที่ 8 อัตราการเติบโตจำเพาะและปริมาณเซลล์สูงสุดของ *Bacillus* spp. ในอาหารตัดแปรร

<i>Bacillus</i> spp.	พารามิเตอร์	อาหารตัดแปรร			
		M+NaCl	M+S+Mo	Su+S+Mo	Su+S+diAm
B17	$\mu$ ( $h^{-1}$ )	0.1531	0.1781	0.1261	0.0413
	cell <sub>max</sub> (cfu/ml)	$1.47 \times 10^9$	$2.85 \times 10^9$	$1.72 \times 10^9$	$3.20 \times 10^7$
B19	$\mu$ ( $h^{-1}$ )	0.1021	0.1566	0.0835	0.0694
	cell <sub>max</sub> (cfu/ml)	$2.20 \times 10^9$	$4.20 \times 10^9$	$4.90 \times 10^9$	$2.60 \times 10^8$
B21	$\mu$ ( $h^{-1}$ )	0.1280	0.1763	0.1616	0.1058
	cell <sub>max</sub> (cfu/ml)	$1.06 \times 10^9$	$2.50 \times 10^9$	$2.00 \times 10^9$	$7.00 \times 10^8$
B25	$\mu$ ( $h^{-1}$ )	0.1530	0.1658	0.1464	0.1410
	cell <sub>max</sub> (cfu/ml)	$8.60 \times 10^8$	$1.94 \times 10^9$	$1.24 \times 10^9$	$4.15 \times 10^8$

ดังแสดงในตารางที่ 8 เปรียบเทียบการใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนกับน้ำตาลซูโครส ในอาหาร M+S+Mo และ Su+S+Mo พบว่า B17, B19, B21 และ B25 สามารถใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดีกว่าน้ำตาลซูโครส ถึงแม้ว่าจะได้ปริมาณเซลล์สูงสุดใกล้เคียงกัน แต่ใช้กากน้ำตาลมีอัตราการเติบโตจำเพาะสูงกว่ามาก ส่วนการใช้โมโนโซเดียมกลูตาเมตเป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน เปรียบเทียบระหว่างอาหาร M+S+Mo และ M+NaCl พบว่าจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 4 สายพันธุ์ เติบโตได้ดีขึ้น โดยมีอัตราการเติบโตจำเพาะเพิ่มสูงขึ้น และมีปริมาณเซลล์สูงสุดเพิ่มขึ้นประมาณสองเท่า สำหรับการใช้อัมโมเนียมฟอสเฟตเป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน เปรียบเทียบระหว่างอาหาร Su+S+diAm และ M+S+Mo พบว่า B25 มีอัตราการเติบโตจำเพาะใกล้เคียงกับในอาหารที่ใช้โมโนโซเดียมกลูตาเมต แต่มีปริมาณเซลล์สูงสุดน้อยกว่า ในขณะที่ B17, B19 และ B21 มีอัตราการเติบโตจำเพาะและปริมาณเซลล์สูงสุดน้อยกว่าการใช้โมโนโซเดียมกลูตาเมต โดยเฉพาะอย่างยิ่ง B17 มีอัตราการเติบโตจำเพาะและปริมาณเซลล์สูงสุดลดลงเป็นอย่างมาก เมื่อเทียบกับการใช้โมโนโซเดียมกลูตาเมตเป็นแหล่งไนโตรเจน

ดังนั้นจึงเลือกอาหาร M+S+Mo เป็นอาหารที่เหมาะสม สำหรับการเพาะเลี้ยง *Bacillus* spp. เพื่อใช้ในการศึกษาพิเศษที่เหมาะสมต่อการเติบโต โดยทำการทดลองในถังหมักต่อไป

ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับหลายงานวิจัย ที่รายงานผลการใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์รวมทั้งการเพาะเลี้ยง *Bacillus* เนื่องจากกากน้ำตาลเป็นของเหลือจากอุตสาหกรรมน้ำตาลทรายแต่ยังมีธาตุอาหารเหลืออยู่ กากน้ำตาลมีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบอยู่ประมาณ 50% (sucrose, fructose และ glucose) นอกนั้นเป็นสารประกอบอื่นๆ รวมทั้งกรดอะมิโนและวิตามิน (Rodrigues *et al.*, 2006)

Patel *et al.* (2005) รายงานการใช้กากน้ำตาล เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยง *B. pseudofirmus* Ve1 พบว่า *B. pseudofirmus* Ve1 เติบโตและผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนประมาณ 1% (v/v) เช่นเดียวกับ Shikha *et al.* (2006) ที่รายงานว่า *B. pantotheneticus* ผลิตเอนไซม์โปรติเอสในอาหารที่มีกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดีกว่าในอาหารที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน เช่นเดียวกับ Gouda *et al.* (2001) รายงานว่า *B. megaterium* เติบโตและผลิต polyhydroxybutyrate (PHB) ได้ดีในอาหารที่มีกากน้ำตาลประมาณ 2% (v/v)

Dharmsthiti *et al.* (1985) รายงานการผลิต *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* และ *B. sphaericus* strain 1593 โดยใช้โมโนโซเดียมกลูตาเมตเป็นแหล่งอินทรีย์ในโตรเจน ส่วนรายงานการใช้ inorganic nitrogen เป็นแหล่งไนโตรเจนพบว่าขึ้นกับชนิดของ *Bacillus* spp. โดย *B. megaterium* สามารถเติบโตได้ในอาหารที่มีแอมโมเนียมฟอสเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน แต่ *Bacillus* spp. JB-99 ไม่สามารถเติบโตและผลิตเอนไซม์ได้เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน (Johnvesly and Naik, 2001)

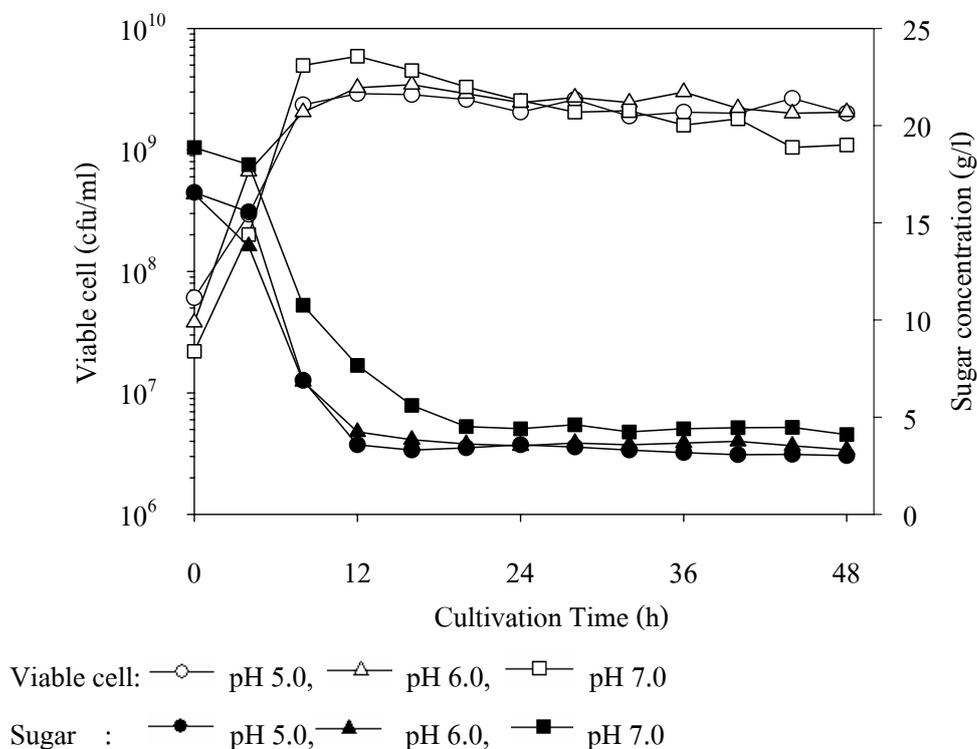
Kulpreecha *et al.* (2009) ศึกษาการใช้อาหารราคาถูกในการเพาะเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 โดยทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร 4 สูตร คือ sucrose ammonium sulphate, sucrose urea, molasses ammonium sulphate และ molasses urea พบว่าได้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 1.96, 2.83, 6.25 และ 7.05 g/l ตามลำดับ จากผลการทดลอง เชื้อสามารถใช้โมลาสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดีกว่าใช้ซูโครส และใช้อินทรีย์ไนโตรเจนเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ดีกว่าอนินทรีย์ และสูตรอาหารที่ใช้โมลาสผสมกับอินทรีย์ไนโตรเจน เชื้อเติบโตได้ดีที่สุด

Mabrouk *et al.* (1999) ศึกษาการผลิต alkaline proteases จาก *B. licheniformis* ATCC 21415 โดยเลี้ยงในอาหารที่แปรผันแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน พบว่า เชื้อสามารถผลิต alkaline proteases ในอาหารที่ใช้ sucrose เป็นแหล่งคาร์บอนได้ดีกว่าการใช้ molasses และใช้

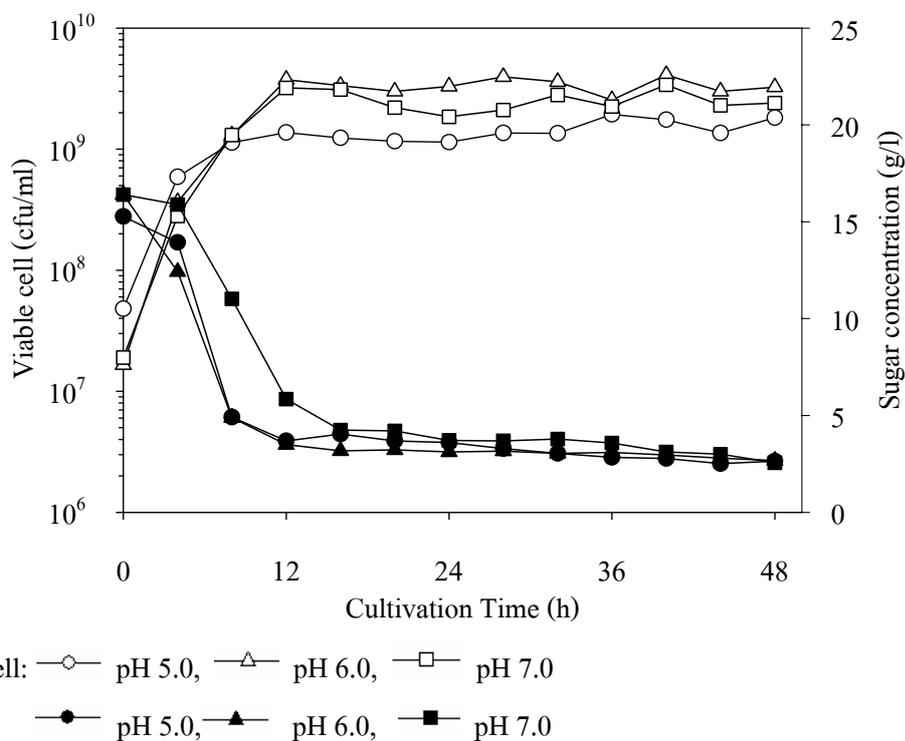
soybean (5%) ผสม ammonium phosphate (1%) เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ดีกว่าใช้ยูเรียหรือน้ำข้าวโพด

#### 4.4 ผลของพีเอชต่อการเติบโตของ *Bacillus* spp.

ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 17 พบว่าที่สภาวะควบคุมพีเอชเท่ากับ 6.0 และ 7.0 B17 มีอัตราการเติบโตจำเพาะใกล้เคียงกันโดยมีค่าเท่ากับ 0.4985 และ 0.4995  $\text{h}^{-1}$  ส่วนที่พีเอชเท่ากับ 5.0 มีอัตราการเติบโตจำเพาะต่ำกว่าโดยมีค่าเท่ากับ 0.4574  $\text{h}^{-1}$  และที่พีเอช 7.0 ให้ปริมาณเซลล์สูงสุด ( $5.90 \times 10^9$  cfu/ml ที่ 12 ชั่วโมง) สูงกว่าที่พีเอชเท่ากับ 5.0 ( $3.45 \times 10^9$  cfu/ml ที่ 16 ชั่วโมง) และ 6.0 ( $2.90 \times 10^9$  cfu/ml ที่ 12 ชั่วโมง) เมื่อเปรียบเทียบผลกับการเพาะเลี้ยงแบบไม่ควบคุมพีเอช (พีเอชเริ่มต้นประมาณ 5.32) ซึ่งมีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.1781  $\text{h}^{-1}$  และได้เซลล์สูงสุดเท่ากับ  $2.85 \times 10^9$  cfu/ml ที่เวลา 60 ชั่วโมง พบว่าการเพาะเลี้ยงแบบควบคุมพีเอชมีอัตราการเติบโตจำเพาะสูงกว่ามาก และมีเซลล์สูงสุดสูงกว่าแบบไม่ควบคุมพีเอช และใช้เวลาในการเติบโตน้อยกว่ามาก



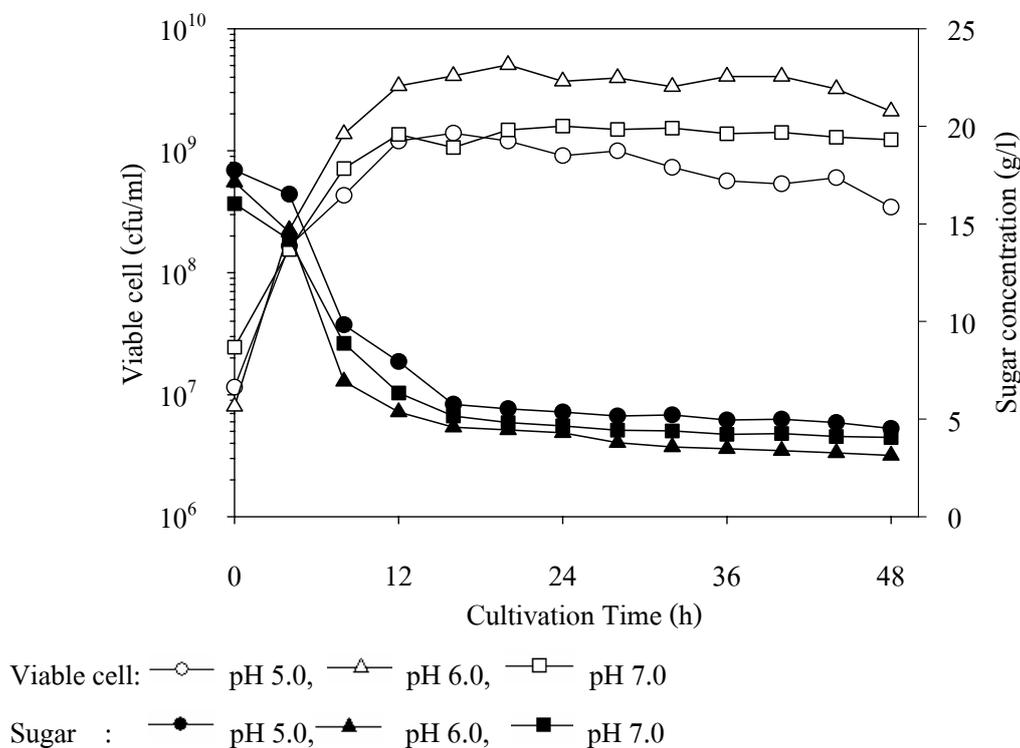
ภาพที่ 17 ผลของพีเอชต่อการเติบโตของ B17



ภาพที่ 18 ผลของพีเอชต่อการเติบโตของ B21

จากผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 18 พบว่าที่สภาวะควบคุมพีเอชเท่ากับ 6.0 และ 7.0 B21 มีอัตราการเติบโตจำเพาะใกล้เคียงกันโดยมีค่าเท่ากับ  $0.4387$  และ  $0.4231 \text{ h}^{-1}$  ส่วนที่พีเอชเท่ากับ 5.0 มีอัตราการเติบโตจำเพาะต่ำกว่าโดยมีค่าเท่ากับ  $0.3948 \text{ h}^{-1}$  นอกจากนี้ที่พีเอช 6.0 และ 7.0 ยังให้ปริมาณเซลล์สูงสุดใกล้เคียงกัน ( $4.10 \times 10^9 \text{ cfu/ml}$  ที่ 40 ชั่วโมง และ  $3.40 \times 10^9 \text{ cfu/ml}$  ที่ 40 ชั่วโมง ตามลำดับ) และสูงกว่าที่พีเอชเท่ากับ 5.0 ( $1.94 \times 10^9 \text{ cfu/ml}$  ที่ 36 ชั่วโมง)

เมื่อเปรียบเทียบผลกับการเพาะเลี้ยงแบบไม่ควบคุมพีเอช (พีเอชเริ่มต้นประมาณ 5.4) ซึ่งมีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ  $0.1763 \text{ h}^{-1}$  และได้ปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ  $2.50 \times 10^9 \text{ cfu/ml}$  ที่เวลา 36 ชั่วโมง พบว่าการเพาะเลี้ยงแบบควบคุมพีเอช มีอัตราการเติบโตจำเพาะสูงกว่ามากในทุกพีเอช และมีเซลล์สูงสุดสูงกว่าแบบไม่ควบคุมพีเอชในเวลาใกล้เคียงกัน ยกเว้นที่ควบคุมพีเอชเท่ากับ 5.0 ได้เซลล์สูงสุดน้อยกว่าแบบไม่ควบคุมพีเอชที่ 36 ชั่วโมง



ภาพที่ 19 ผลของพีเอชต่อการเติบโตของ B25

จากผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 19 พบว่าที่สภาวะควบคุมพีเอชเท่ากับ 6.0 B25 มีอัตราการเติบโตจำเพาะสูงที่สุดโดยมีค่าเท่ากับ  $0.4938 \text{ h}^{-1}$  ส่วนที่พีเอชเท่ากับ 5.0 มีอัตราการเติบโตจำเพาะสูงกว่าที่พีเอช 7.0 เล็กน้อยโดยมีค่าเท่ากับ 0.3725 และ  $0.3395 \text{ h}^{-1}$  ตามลำดับ ที่พีเอช 6.0 ให้ปริมาณเซลล์สูงสุด ( $5.05 \times 10^9$  cfu/ml ที่ 20 ชั่วโมง) สูงกว่าที่พีเอชเท่ากับ 5.0 และ 7.0 ( $1.39 \times 10^9$  cfu/ml ที่ 16 ชั่วโมง และ  $1.59 \times 10^9$  cfu/ml ที่ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ)

เมื่อเปรียบเทียบผลกับการเพาะเลี้ยงแบบไม่ควบคุมพีเอช (พีเอชเริ่มต้นประมาณ 5.34) ซึ่งมีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ  $0.1658 \text{ h}^{-1}$  และได้ปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ  $1.94 \times 10^9$  cfu/ml ที่เวลา 48 ชั่วโมง พบว่าการเพาะเลี้ยงแบบควบคุมทุกพีเอชมีอัตราการเติบโตจำเพาะสูงกว่ามาก ที่ควบคุมพีเอชเท่ากับ 5.0 และ 7.0 มีเซลล์สูงสุดสูงใกล้เคียงกับแบบไม่ควบคุมพีเอช แต่ใช้เวลาเติบโตน้อยกว่า

ในการทดลองนี้พบว่าฟิเอร์ที่เหมาะสมต่อการเติบโตของ B17 และ B21 เท่ากับ 6.0 และ 7.0 ส่วน B25 มีฟิเอร์ที่เหมาะสมต่อการเติบโตเท่ากับ 6.0 และการเติบโตของ B17, B21 และ B25 ในสถานะที่ควบคุมฟิเอร์ดีกว่าที่ไม่ควบคุม โดยดูได้จากค่าอัตราการเติบโตจำเพาะ และ ปริมาณเซลล์สูง และเวลาที่ใช้ในการเติบโต ฟิเอร์ที่เหมาะสมของแบคทีเรียทดสอบซึ่งใกล้เคียงกับ แบคทีเรียส่วนใหญ่ ที่มีค่าฟิเอร์ในอาหารที่เหมาะสมต่อการเติบโตอยู่ระหว่าง 6.5-7.5 (Waites *et al.*, 2001) ผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานของ Purivirojkul *et al.* (2005) ที่รายงานว่า *B. pumilus*, *B. sphaericus*, และ *B. subtilis* ที่แยกได้จากกึ่งกลางดำ สามารถเติบโตได้ที่ฟิเอร์ 4 ถึง 11

Moita *et al.* (2005) รายงานว่า *B. subtilis* CCM1 355 เติบโตได้ดีที่ฟิเอร์ 6 ส่วนที่ฟิเอร์ 8 เป็นสถานะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งเชื้อรา *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum*, *Trichoderma* spp., *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii* และ *Trichoderma virgatum* เช่นเดียวกับ Sen and Babub (2005) รายงานว่า *B. coagulans* RK-02 มีสถานะที่เหมาะสมต่อการเติบโตที่ฟิเอร์ เท่ากับ 6.65 และ Anthony *et al.* (2009) พบว่า *Bacillus licheniformis* AnBa9 มีฟิเอร์ที่เหมาะสมเท่ากับ 6.5

ในทำนองเดียวกัน *Bacillus* spp. YAS1, *B. flexus* DSM 1320, *B. megaterium* DSM 32, *B. bataviensis* DSM 1560, *B. niacini* DSM 2923 และ *B. firmus* DSM 12 มีฟิเอร์ที่เหมาะสมในการเติบโตเท่ากับ 7 (Abdelkafi *et al.*, 2005) และ *B. coagulans* เติบโตได้ดีใกล้เคียงกันที่ฟิเอร์ 6.0 และ 7.0 (Payot *et al.*, 1999) สอดคล้องกับ Syu และ Chen (1997) ที่รายงานว่าการเพาะเลี้ยง *B. amyloliquefaceins* แบบควบคุมฟิเอร์ที่ 5.5, 6.3 และ 7.0 พบว่า *B. amyloliquefaceins* เติบโตได้ดีใกล้เคียงกันที่ฟิเอร์เท่ากับ 6.3 และ 7.0 และเติบโตไม่ดีที่ฟิเอร์เท่ากับ 5.5 โดยมีค่าปริมาณเซลล์สูงสุดที่ฟิเอร์ 7.0 รองลงมาคือที่ฟิเอร์ 6.3 และ 5.5 ตามลำดับ นอกจากนี้ *B. pumilus* เติบโตที่ฟิเอร์เท่ากับ 7.0 ได้ดีกว่าที่ฟิเอร์เท่ากับ 5.6 (Marshall and Odame-Darkwah, 1995) เช่นเดียวกับ Douglas *et al.* (1995) ที่พบว่า *B. pumilus* มีฟิเอร์ที่เหมาะสมเท่ากับ 7.0

ฟิเอร์ของอาหารเลี้ยงเชื้อมีอิทธิพลต่อการควบคุมการสังเคราะห์สารชีวภาพต่างๆ ของ เซลล์ และระบบการขนส่งออกนอกเซลล์ (Mayo and Noike, 1996) รวมทั้งเสถียรภาพของโปรตีนหรือเอนไซม์ที่ผลิตออกจากเซลล์ (Rajakumara *et al.* (2008) ฟิเอร์มีผลโดยตรงต่อผนังเซลล์ซึ่งมีหมู่ carboxylate, phosphate, และ amino groups ที่คอยจับกับสารต่างๆ จากอาหารเลี้ยงเชื้อ (Claessens *et al.* (2006) ซึ่งประจุของหมู่เหล่านี้จะขึ้นกับฟิเอร์ของอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่

โดยทั่วไปจะมีประจุลบ เพื่อที่จะจับกับธาตุโลหะที่มีประจุบวก แล้วนำเข้าไปใช้ประโยชน์ในเซลล์ (Wightman and Fein, 2005) ในระหว่างที่แบคทีเรียเติบโตจะมีการเปลี่ยนแปลงพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อตลอดเวลา เนื่องจากการย่อยสารอาหารและสารที่แบคทีเรียผลิตออกมา การเปลี่ยนแปลงพีเอชจึงมีผลต่อการเติบโตของแบคทีเรีย ดังนั้นจึงต้องมีการควบคุมพีเอชเพื่อให้เหมาะสมต่อการเติบโตของแบคทีเรียแต่ละชนิด

## 5. ผลการศึกษาการทำแห้งแบบพ่นฝอยของ *Bacillus spp.* B17

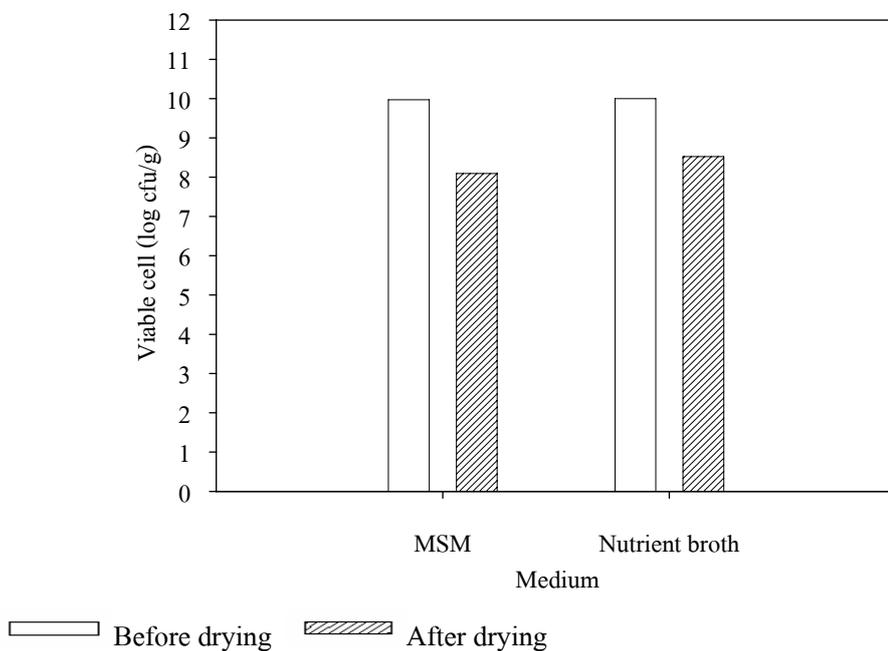
ในการทดลองนี้ศึกษาผลของชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อ ระยะเวลาเพาะเลี้ยงเชื้อ สารพาและสารป้องกันเซลล์ ต่อการรอดชีวิตของ B17 ระหว่างการทำแห้งแบบพ่นฝอยที่อุณหภูมิอากาศเข้าเท่ากับ 130°C และอุณหภูมิอากาศออกเท่ากับ 70°C

### 5.1 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อ

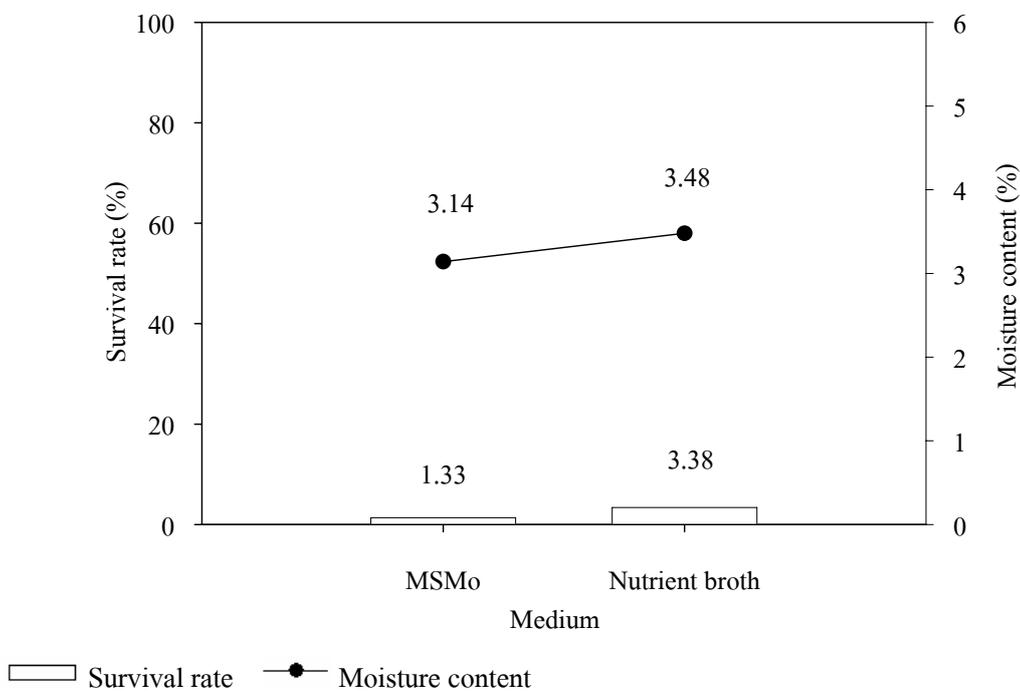
จากผลการทดลองในหัวข้อ 4 พบว่า MSMo เป็นอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิต B17 ในการทดลองนี้จึงศึกษาเปรียบเทียบถึงอิทธิพลของอาหารเลี้ยงเชื้อนี้กับ NB ต่อปริมาณเซลล์มีชีวิตของ B17 หลังการทำแห้งแบบพ่นฝอย

ภาพที่ 20 และ 21 แสดงผลของ MSMo และ NB ต่อปริมาณเซลล์มีชีวิตของ B17 ก่อนและหลังการทำแห้งแบบพ่นฝอย พบว่า B17 สามารถเติบโตได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิด หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 36 ชั่วโมง ปริมาณเซลล์ที่ได้ใกล้เคียงกันเท่ากับ  $9.30 \times 10^9$  และ  $9.90 \times 10^9$  cfu/g ตามลำดับ หลังการทำแห้งแบบพ่นฝอย พบว่า B17 ที่เพาะเลี้ยงใน MSMo มีอัตราการรอดชีวิต 1.33% (ปริมาณเซลล์มีชีวิตลดลงจาก  $9.30 \times 10^9$  เหลือ  $1.24 \times 10^8$  cfu/g) ในขณะที่ B17 ที่เพาะเลี้ยงใน NB มีอัตราการรอดชีวิต 3.38% (ปริมาณเซลล์มีชีวิตลดลงจาก  $9.90 \times 10^9$  เหลือ  $3.35 \times 10^8$  cfu/g) ซึ่งสูงกว่าที่เพาะเลี้ยงใน MSMo 2.5 เท่า

ความชื้นของเชื้อผงที่ได้จากการทำแห้ง B17 (ภาพที่ 21) มีค่าประมาณ 3% ซึ่งใกล้เคียงกับความชื้นของเชื้อผงอื่นๆ เช่น Ananta *et al.* (2005) ทำแห้ง *Lb. rhamnosus* ใช้ skim milk, dextrose และ raffinose เป็นสารพา พบว่าเชื้อผงมีความชื้นเท่ากับ 3.7, 3.3 และ 3.7% ตามลำดับ



ภาพที่ 20 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาณเซลล์มีชีวิตของ B17

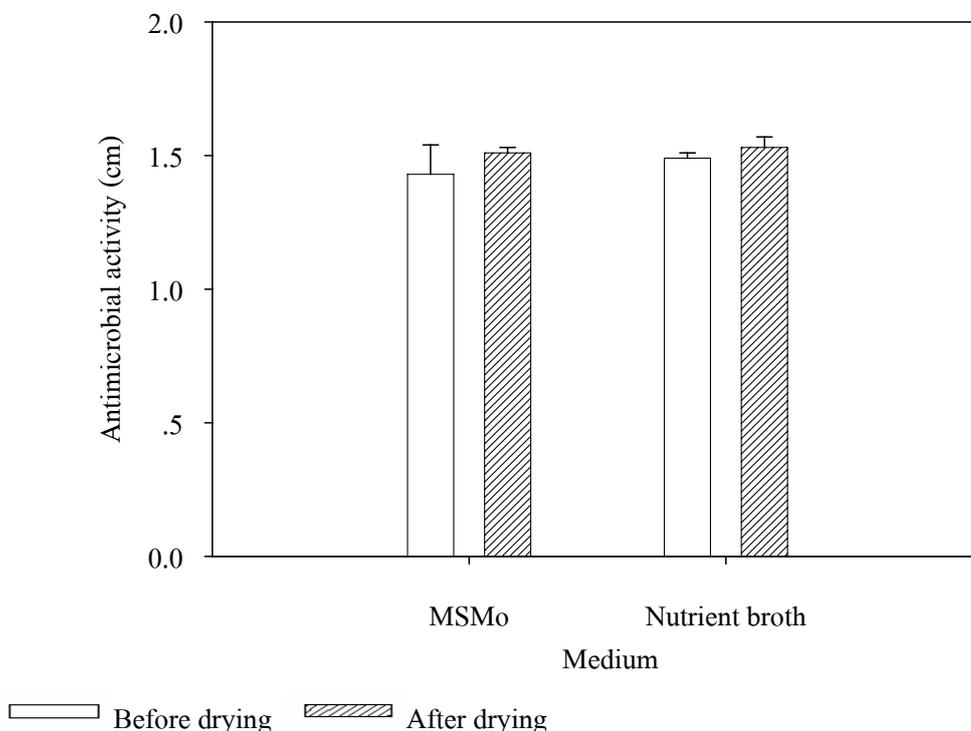


ภาพที่ 21 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่ออัตราการรอดชีวิตของ B17 และความชื้นของเชื้อผง

ในการทำนองเดียวกัน Corbanie *et al.* (2007) ทำแห้งไวรัส attenuated Newcastle disease virus เพื่อใช้เป็นวัคซีนป้องกันโรคทางเดินหายใจในสัตว์ปีก โดยใช้สารพาหชนิดต่างๆ ได้แก่ trehalose, polyvinylpyrrolidone (PVP), bovine serum albumin (BSA) พบว่าเชื้อผงมีความชื้น (moisture content: %) ดังนี้ trehalose (3.1%), trehalose-PVP (3.4%), trehalose-BSA (3.4%) และ trehalose-PVP-BSA (3.3%) และ Boza *et al.* (2004) ทำแห้ง *Beijerinckia* spp. ใช้ malt dextrin เป็นสารพาหพบว่ามีความชื้นของเชื้อผงเท่ากับ 3.74% และผง B17 มีความชื้นน้อยกว่าการทำแห้ง *Lb. rhamnosus* GG (LGG) และ *Lb. rhamnosus* E-97800 (E800) ที่ใช้ skim milk, tehalose และ trehalose ผสม MSG เป็นสารพาห โดยมีค่าความชื้นประมาณ 4.2% และ 4.43% ตามลำดับ (Sunny-Roberts และ Knorr, 2009)

การทำแห้งแบบพ่นฝอยเป็นวิธีที่ใช้อุณหภูมิสูง ความร้อนจะทำลายชั้นของฟอสโฟลิพิดที่เชื่อมเซลล์ของแบคทีเรีย ส่งผลให้เชื่อมเซลล์ร่วนและสารภายในเซลล์รวมทั้งน้ำเคลื่อนย้ายออกนอกเซลล์ได้ง่ายขึ้น ทำให้เซลล์ได้รับบาดเจ็บหรือตายได้ (Ananta *et al.*, 2005) จากผลการทดลองจึงเห็นได้ว่าปริมาณเซลล์มีชีวิตของ B17 ลดลงหลังจากการทำแห้งแบบพ่นฝอย ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิด และเนื่องจาก NB ประกอบด้วยโปรตีน 2 ชนิด คือ polypeptone และ beef extract จึงทำหน้าที่เป็นสารป้องกันเซลล์จากความร้อนระหว่างการทำแห้งแบบพ่นฝอยได้ โดยการเคลื่อนที่ผิวของแบคทีเรีย ทำให้เซลล์รอดชีวิตจากภาวะที่มีอุณหภูมิสูง (Meng *et al.*, 2008) ส่งผลให้ B17 ที่เลี้ยงใน NB ทนความร้อนได้ดีกว่าที่เพาะเลี้ยงใน MSMo

ดังภาพที่ 22 พบว่า การทำแห้งแบบพ่นฝอยไม่มีผลต่อกิจกรรมการยับยั้งเชื้อก่อโรคของ B17 ทั้งก่อนและหลังการทำแห้งของ B17 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารทั้งสองชนิด B17 ยังคงกิจกรรมการยับยั้ง VH05 และมีค่าใกล้เคียงกัน โดยให้ค่าบริเวณยับยั้งอยู่ในช่วง  $1.43 \pm 0.11$  ถึง  $1.53 \pm 0.04$  cm สอดคล้องผลงานวิจัยของ Hamsupo *et al.* (2005) ที่พบว่าการทำแห้งแบบพ่นฝอย *L. reuteri* KUBAC5 ไม่มีผลต่อการผลิตสารยับยั้ง อย่างไรก็ตาม Zhou *et al.* (2004) รายงานว่าหลังการทำแห้งแบบพ่นฝอย *B. thuringiensis* แสดงกิจกรรมการฆ่าแมลง *Plutella xylostella* ลดลง



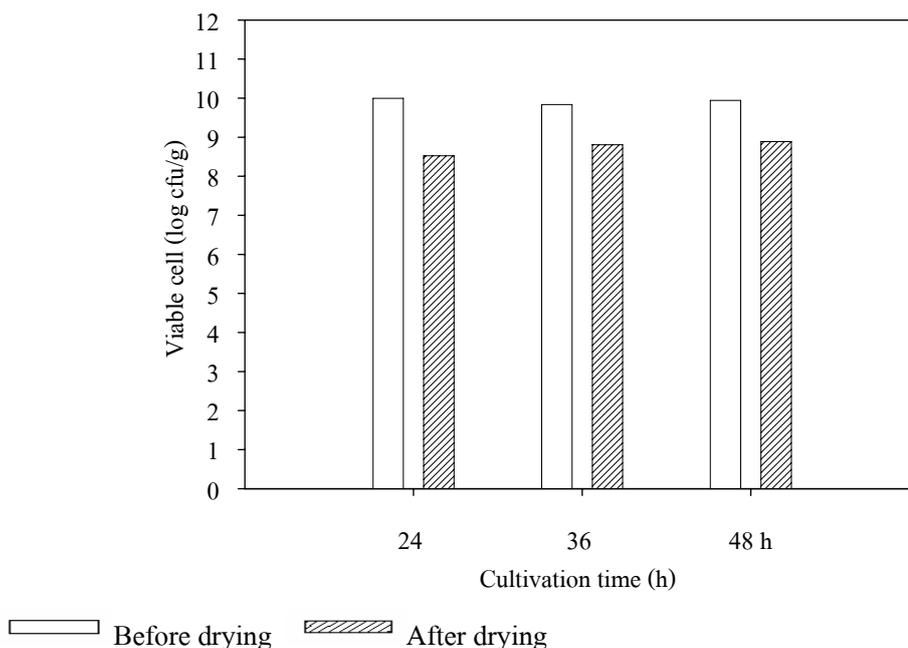
ภาพที่ 22 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อกิจกรรมการยับยั้ง VH05

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ มีผลต่ออัตราการรอดชีวิตของ B17 หลังการทำแห้งแบบพ่นฝอย เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลโดยตรงต่อเมตาบอลิซึมของเซลล์และอาจช่วยปกป้องเซลล์จากสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ตัวอย่างเช่น mannitol, sorbitol, glutamate, protein และ glycerol ในอาหารเลี้ยงเชื้อบางชนิด ช่วยให้ปริมาณเซลล์รอดชีวิตจากการทำแห้งเพิ่มขึ้นได้ (Wisselink *et al.*, 2002; Meng *et al.*, 2008; Panoff *et al.*, 2000) ในทำนองเดียวกัน Hamsupo *et al.* (2005) ศึกษาผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่ออัตราการรอดชีวิตของ *Lb. reuteri* KUBAC5 ในการทำแห้งแบบพ่นฝอย พบว่า *Lb. reuteri* KUBAC5 มีอัตราการรอดชีวิตหลังการทำแห้งแบบพ่นฝอยเมื่อเลี้ยงในอาหาร basal medium (92.5%) สูงกว่าเลี้ยงในอาหาร MRS broth (86.7%)

ในการศึกษาขั้นต่อไป จะเลือกใช้ NB สำหรับการเพาะเลี้ยง B17 เพื่อศึกษาปัจจัยอื่นที่มีผลต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์หลังการทำแห้งแบบพ่นฝอย

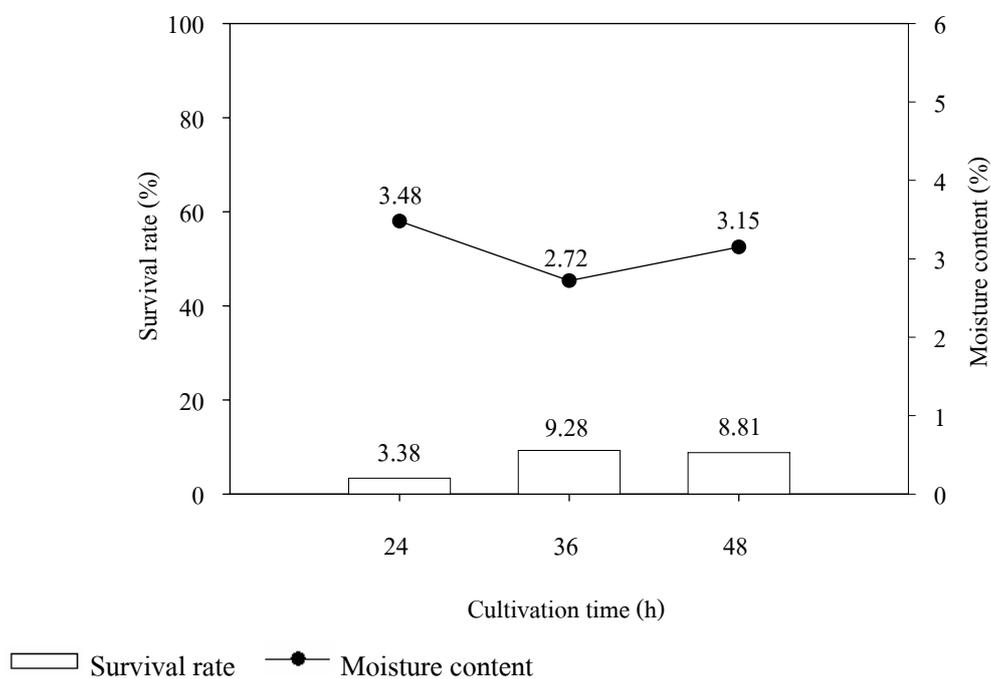
## 5.2 ผลของระยะเวลาเพาะเลี้ยงเชื้อ

ผลการศึกษาระยะเวลาเพาะเลี้ยงเชื้อ (24, 36 และ 48 ชั่วโมง) ต่อปริมาณเซลล์มีชีวิตของ B17 หลังการทำแห้งแบบพ่นฝอย แสดงในภาพที่ 23 ถึง 25

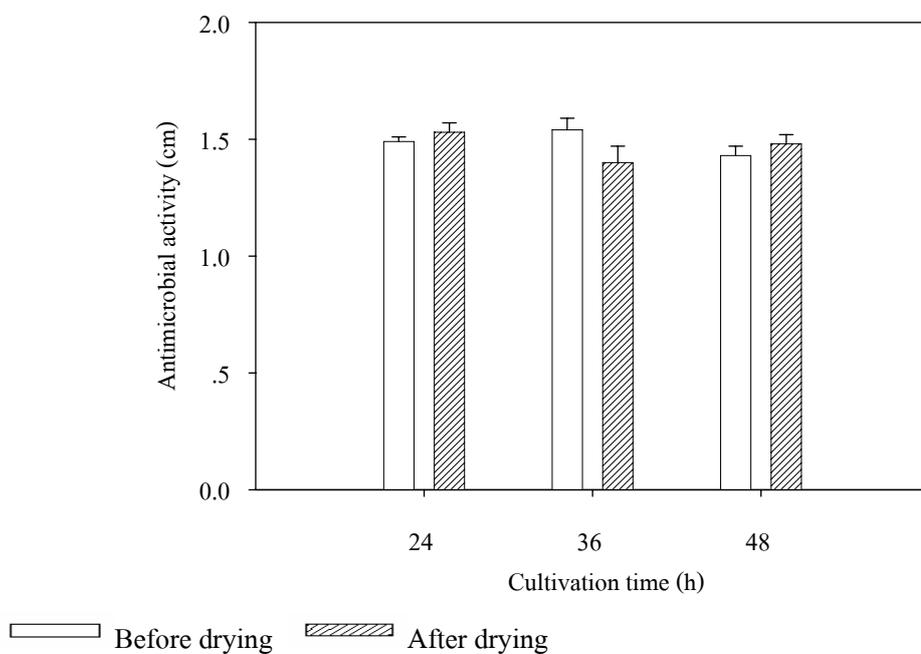


ภาพที่ 23 ผลของระยะเวลาเพาะเลี้ยงเชื้อต่อปริมาณเซลล์มีชีวิตของ B17

จากผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 23 พบว่า B17 ที่ใช้ระยะเวลาเพาะเลี้ยงต่างกันมีผลต่อปริมาณเซลล์มีชีวิตของ B17 หลังการทำแห้งแบบพ่นฝอย โดย B17 ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24, 36 และ 48 ชั่วโมง มีปริมาณเซลล์มีชีวิตเท่ากับ  $9.90 \times 10^9$ ,  $6.90 \times 10^9$  และ  $8.80 \times 10^9$  cfu/g ตามลำดับ หลังการทำแห้งแบบพ่นฝอยมีปริมาณเซลล์มีชีวิตเท่ากับ  $3.35 \times 10^8$ ,  $6.40 \times 10^8$  และ  $7.75 \times 10^8$  cfu/g ตามลำดับ ดังภาพที่ 24 จะเห็นว่าอัตราการรอดชีวิตของ B17 ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 36 ชั่วโมง (9.28%) สูงกว่าที่ 48 ชั่วโมง (8.81%) และ 24 ชั่วโมง (3.38%) ทั้งนี้เนื่องจาก B17 ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 36 และ 48 ชั่วโมงอยู่ในระยะที่มีสปอร์ ทำให้ทนต่อความร้อนในระหว่างการทำแห้งแบบพ่นฝอยได้ดีกว่าที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนความชื้นของเชื้อผงที่ได้มีค่าประมาณ 3% ซึ่งใกล้เคียงกับความชื้นของการทำแห้งเชื้อชนิดอื่นๆ (Corbanie *et al.*, 2007; Ananta *et al.*, 2005; Boza *et al.*, 2004)



ภาพที่ 24 ผลของระยะเวลาเพาะเลี้ยงเชื้อต่ออัตราการรอดชีวิตของ B17 และความชื้นของเชื้อผง



ภาพที่ 25 ผลของระยะเวลาเพาะเลี้ยงเชื้อต่อกิจกรรมการยับยั้ง VH05

กิจกรรมการยับยั้ง VH05 หลังการทำแห้งของ B17 ที่เพาะเลี้ยงใน NB ของทั้ง 3 ระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงมีค่าใกล้เคียงกัน และกิจกรรมการยับยั้ง VH05 ก่อนและหลังการทำแห้งของ B17 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารแต่ละระยะเวลาก็มีค่าใกล้เคียงกัน โดยมีบริเวณยับยั้งอยู่ในช่วง  $1.54 \pm 0.05$  ถึง  $1.40 \pm 0.07$  cm (ภาพที่ 25)

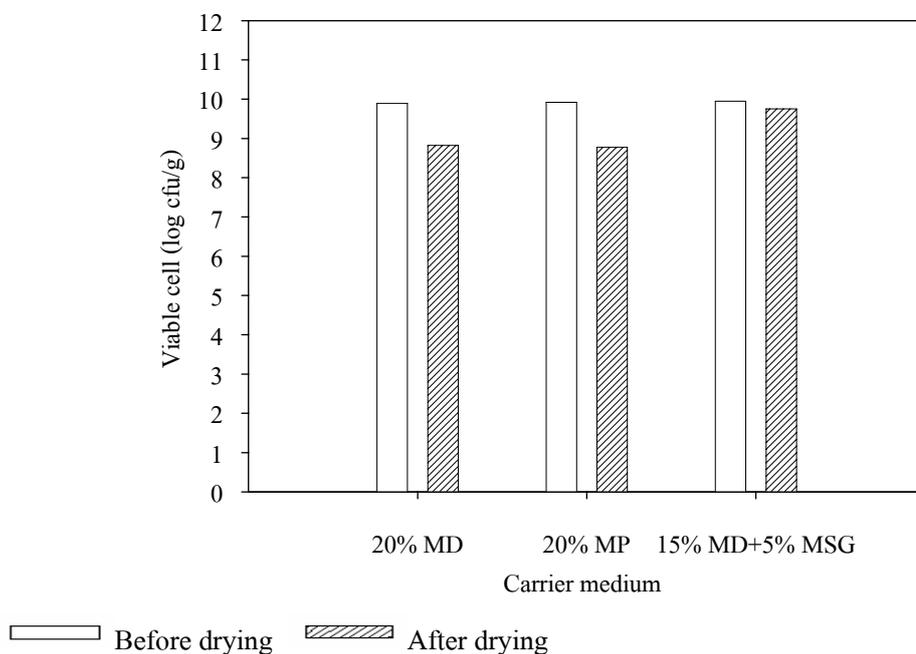
ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าระยะการเติบโตของเชื้อ มีผลต่ออัตราการรอดชีวิตของ B17 หลังการทำแห้งแบบพ่นฝอย โดย B17 ที่อยู่ในระยะสปอร์ (36 และ 48 ชั่วโมง) สามารถทนความร้อนจากการทำแห้งได้ดีกว่าในระยะที่ยังไม่สร้างสปอร์ สอดคล้องกับ Raso *et al.* (1995) ที่พบว่า *B. cereus* ในระยะสปอร์ทนอุณหภูมิ ( $85-95^{\circ}\text{C}$ ) ที่สูงกว่า ในระยะที่ยังไม่สร้างสปอร์ ( $50-60^{\circ}\text{C}$ ) (Byrne *et al.*, 2006) ในทำนองเดียวกัน *B. licheniformis* และ *B. cereus* strains Bce1 และ Bce9 ในระยะสปอร์สามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ  $90-100^{\circ}\text{C}$  ได้ (Laurent *et al.*, 1999)

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเชื้อที่เติบโตอยู่ในระยะ stationary phase จะทนต่อสิ่งแวดล้อมได้ดีกว่าในระยะ growth phase (Lorca and de Valdez, 1999; Morgan *et al.*, 2006; Gardiner *et al.*, 2000) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Bacillus* spp. ที่อยู่ในระยะสปอร์จะมีความทนต่อสิ่งแวดล้อม เช่น ความร้อน รังสี และความดันสูง ได้มากกว่าระยะที่ยังไม่เป็นสปอร์ (Elke *et al.*, 2001) ตัวอย่างเช่นการทำแห้งแบบพ่นฝอย *B. cereus* (ATCC 9139) ในระยะสปอร์ โดยใช้ลมผงเป็นสารตัวพาที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น ( $1.9 \times 10^7$  cfu/ml) พบว่ามีปริมาณเซลล์มีชีวิตหลังการทำแห้งสูงมาก ( $2.0 \times 10^7$  cfu/g) (Paul *et al.*, 1993)

ดังนั้นจากผลการทดลองจึงเลือกเพาะเลี้ยง B17 เป็นเวลาที่ 36 ชั่วโมง เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป เนื่องจากให้อัตราการรอดชีวิตหลังผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอยสูงที่สุด

### 5.3 ผลของสารพาและสารป้องกันเซลล์

ในการทดลองนี้ใช้สารพา ได้แก่ 20% maltodextrin (MD), 20% milk powder (MP) และ 15% maltodextrin ผสม 5% monosodium glutamate (MD+MSG) ผลแสดงในภาพที่ 26 ถึง 28



ภาพที่ 26 ผลของสารตัวพาและสารป้องกันเซลล์ต่อการทำแห้งแบบพ่นฝอยของ B17

จากภาพที่ 26 อัตราการรอดชีวิตของ B17 ที่ใช้มอลโทเดกซ์ทรินผสมโมโนโซเดียมกลูตาเมตเป็นสารพามีค่าสูงที่สุด(63.48%) รองลงมาคือมอลโทเดกซ์ทริน (8.53%) และนมผง (7.17%) เห็นได้ว่าการใช้นมผงเป็นสารตัวพา มีอัตราการรอดชีวิตหลังการทำแห้งแบบพ่นฝอยน้อยที่สุด เนื่องจากนมผงมีไขมันอยู่ในปริมาณที่สูง (26.6) (Kim *et al.*, 2002) ในขณะที่การทำแห้งแบบพ่นฝอย ผิวของอนุภาคจะประกอบด้วยไขมันประมาณ 98% (Kim *et al.*, 2005) ผิวของอนุภาคที่มีไขมันมากทำให้อนุภาคได้รับความร้อนมากด้วย (Nijdam and Langrish, 2006) ดังนั้นจึงเป็นสาเหตุที่ทำให้เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตน้อย

เมื่อเปรียบเทียบกับหางนม (skim milk) ที่นิยมใช้เป็นสารพาและสารปกป้องเซลล์ในการทำแห้งแบบพ่นฝอย หางนมมีไขมันเป็นองค์ประกอบเพียง (1%) เมื่อทำแห้งแบบพ่นฝอยอนุภาคของหางนมมีไขมันที่ผิวประมาณ 18% และโปรตีนจากหางนมยังช่วยปกป้องเซลล์ไม่ให้เกิดเจ็บ ด้วยการเคลือบผนังเซลล์แบคทีเรียทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เสถียรขึ้น (Meng *et al.*, 2008) ทำให้เมื่อใช้หางนมเป็นสารพาหรือสารป้องกันเซลล์จึงมีอัตราเซลล์รอดชีวิตที่สูง ตัวอย่างการใช้หางนมเป็นสารพาในการทำแห้งแบบพ่นฝอยเอนไซม์และแบคทีเรียโพรไบโอติก เช่น การทำแห้งแบบพ่นฝอยเอนไซม์ galactosidase ที่ผลิตโดย *Lb. delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* ATCC 11842 พบว่า

เอนไซม์มีกิจกรรมหลังผ่านการทำแห้ง 92.2% (Vasiljevic and Jelen, 2003) และการทำแห้ง *Lb. paracasei* NFBC 338 มีอัตราการรอดชีวิตสูงถึง 84.5% (Gardiner *et al.*, 2002) สอดคล้องกับ Lian *et al.* (2002) ทำแห้ง *Bifidobacterium infantis* CCRC 14633 มีเซลล์รอดชีวิต 82.6% แต่เนื่องจากหางนมมีราคาที่สูง จึงอาจไม่คุ้มทุนทางด้านการผลิต

B17 ที่ใช้มอลโทเดกซ์ทรินเป็นสารพา มีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าการใช้นมผง เนื่องจากมอลโทเดกซ์ทรินจะช่วยปกป้องเซลล์ในขณะที่ทำแห้งแบบพ่นฝอย โดยทำหน้าที่เหมือนสารป้องกันการถูกออกซิไดซ์ (antioxidant) เคลือบผนังเซลล์ ช่วยป้องกันการรั่วของเยื่อหุ้มเซลล์จากการถูกออกซิไดซ์ของไขมัน (Santivarangkna *et al.*, 2008) นอกจากนี้มอลโทเดกซ์ทรินยังเป็นสารพยานิยมใช้ในการทำแห้งทั้งเอนไซม์และแบคทีเรียโปรไบโอติก เนื่องจากราคาไม่แพงและให้เซลล์มีชีวิตหลังการทำแห้งแบบพ่นฝอยสูง

ตัวอย่างเช่นการทำแห้งเอนไซม์เซลล์ลูเลสที่ผลิตโดย *Penicillium occitanis* มีผลได้ของผลิตภัณฑ์ (yield) เท่ากับ 85% (Belghith *et al.*, 2001) การทำแห้ง *Beijerinckia* spp. มีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 14.17% (Boza *et al.*, 2004) นอกจากนี้ Rodriguez-Huezo *et al.* (2007) ใช้มอลโทเดกซ์ทรินเป็นสารป้องกันเซลล์ เพื่อเพิ่มอัตราการรอดชีวิตในการทำแห้งแบบพ่นฝอย *Bifidobacterium bifidum* พบว่าใช้สารพาผสม 50% gum arabic (GA) และ 50% mesquite gum (MG) มีอัตราการรอดชีวิต  $10^8$  cfu/g และเมื่อเติมมอลโทเดกซ์ทรินในสารพาผสม (17%GA-66%MG-17%MD) ทำให้มีอัตราการรอดชีวิตเพิ่มสูงขึ้นเป็น  $5.3 \times 10^{10}$  cfu/g

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า การใช้โมโนโซเดียมกลูตาเมตเป็นสารป้องกันเซลล์ร่วมกับสารพามอลโทเดกซ์ทริน ให้อัตราการรอดชีวิตของ B17 สูงขึ้นอย่างมากเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เฉพาะมอลโทเดกซ์ทรินและนมผงเป็นสารพา เนื่องจากสารป้องกันเซลล์จะช่วยปกป้องเซลล์จากกระบวนการทำแห้งได้ (Desmond *et al.*, 2002) โดย glutamate จะจับตัวกับกรดอะมิโนเกิดเป็นโปรตีนช่วยปกป้องเซลล์ไม่ให้ขาดเจ็บ ด้วยการเคลือบผนังเซลล์แบคทีเรียช่วยทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เสถียรขึ้น (Meng *et al.*, 2008)

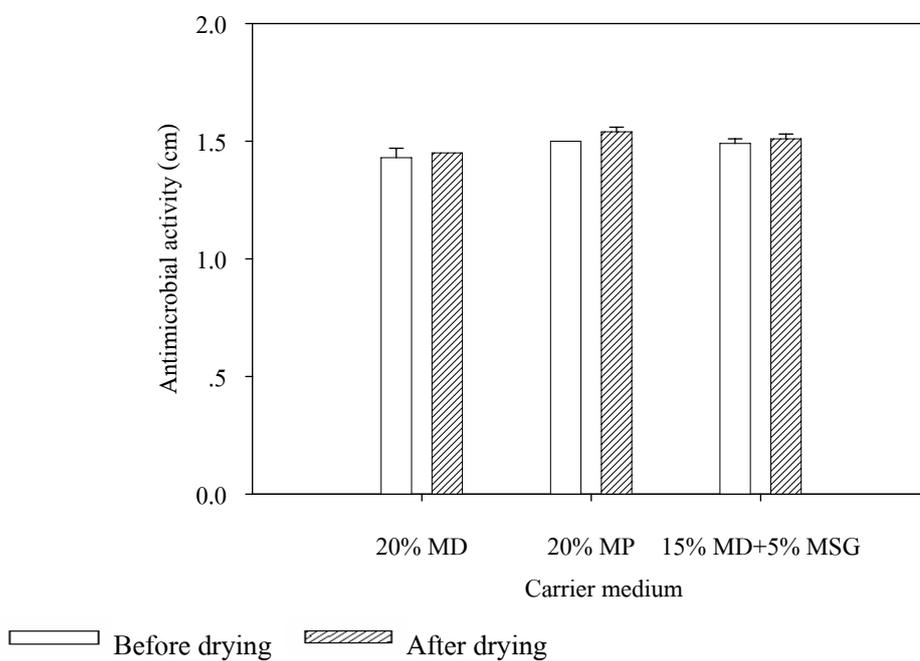
การทำแห้งแบบพ่นฝอยโดยใช้ โมโนโซเดียมกลูตาเมตเป็นสารปกป้องเซลล์ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Sunny-Roberts and Knorr (2009) ที่ศึกษาการใช้โมโนโซเดียมกลูตาเมตเป็นสารป้องกันเซลล์ในการทำแห้ง *Lb. rhamnosus* GG (LGG) และ *Lb. rhamnosus* E-97800

(E800) โดยใช้ trehalose 20% (w/w) และ trehalose 20% (w/w) ผสม 12.5 g/l monosodium glutamate (MSG) ผลการทดลองพบว่า *Lb. rhamnosus* GG ที่ใช้ tehalose มีเชลล์รอดชีวิต 70.58% และ trehalose ผสม MSG มีเชลล์รอดชีวิตเพิ่มขึ้นเป็น 91.04% สำหรับ *Lb. rhamnosus* E-97800 (E800) ที่ใช้ tehalose มีเชลล์รอดชีวิตเพียง 19.21% แต่เมื่อใช้ trehalose ผสม MSG มีเชลล์รอดชีวิตเพิ่มขึ้นอย่างมากเป็น 86.66%

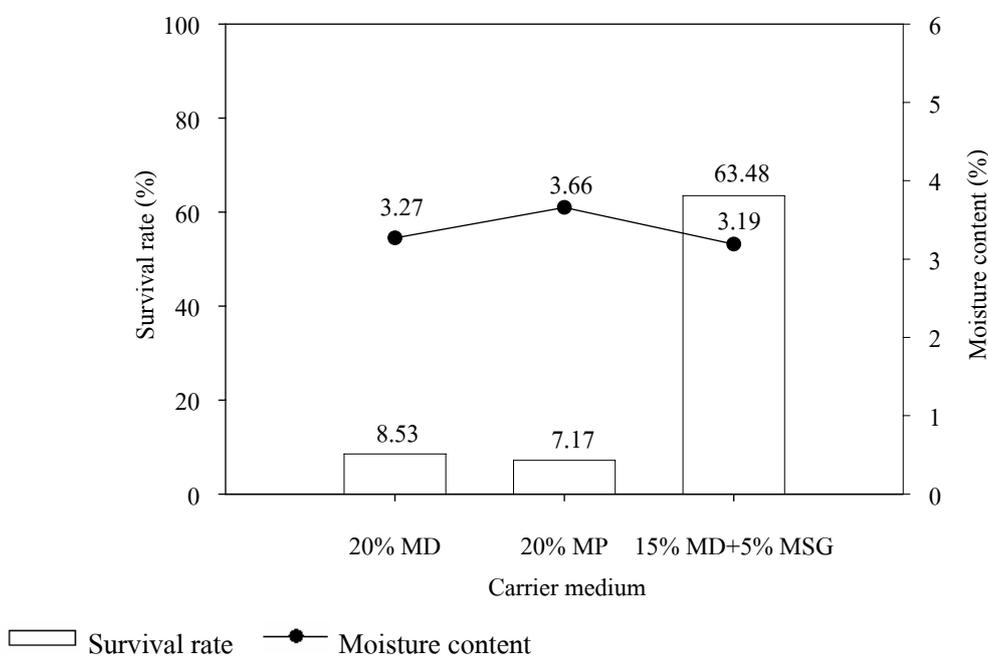
นอกจากนี้ Sunny-Roberts and Knorr (2009) ยังพบว่าเมื่อใช้หางนมเป็นสารพา *Lb. acillus rhamnosus* GG (LGG) และ *Lb. rhamnosus* E-97800 (E800) มีเชลล์รอดชีวิตเท่ากับ 75% และ 55% ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าการใช้ tehalose แต่น้อยกว่าการใช้ trehalose ผสม MSG เป็นสารป้องกันเชลล์ และจากงานวิจัยเดียวกันยังพบว่า MSG ช่วยเพิ่มความคงทนของผนังเชลล์ต่อการย่อยของเอนไซม์ lysozyme ได้ โดย *Lb. rhamnosus* GG (LGG) และ *Lb. rhamnosus* E-97800 (E800) ที่ใช้ tehalose เป็นสารตัวพา มีเชลล์รอดชีวิตจากการย่อยเท่ากับ 78.5% และ 3.1% ตามลำดับ ในขณะที่ใช้ trehalose ผสม MSG เป็นสารพา มีเชลล์รอดชีวิตจากการย่อยเพิ่มขึ้นเท่ากับ 94.4 และ 62.6% ตามลำดับ

ชนิดของจุลินทรีย์เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญ ต่ออัตราการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ หลังจากผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอย ตัวอย่างเช่น เมื่อใช้ skim milk เป็นสารตัวพาเหมือนกัน Gardiner *et al.* (2002) ทำแห้ง *Lb. paracasei* NFBC 338 มีอัตราการรอดชีวิตสูงถึง 84.5% สอดคล้องกับ Lian *et al.* (2002) ที่ทำแห้ง *B. longum* B6 พบว่า มีอัตราการรอดชีวิตสูงถึง 82.59% ในขณะที่ Costa *et al.* (2002) ทำแห้ง *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 มีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 50% และ Boza *et al.* (2004) ทำแห้งแบบพ่นฝอย *Beijerinckia* sp. มีเชลล์รอดชีวิตเท่ากับ 9.14% ส่วน Gardiner *et al.* (2000) ทำแห้ง *Lb. salivarius* UCC 118 มีอัตราการรอดชีวิตเพียง 1% เป็นต้น

นอกจากนี้จากผลการทดลองยังพบว่ากิจกรรมการยับยั้ง VH05 หลังการทำแห้งของ B17 โดยใช้สารพาทั้ง 3 ชนิดมีค่าใกล้เคียงกัน และกิจกรรมการยับยั้ง VH05 ก่อนและหลังการทำแห้งของ B17 ที่ใช้สารพาทั้ง 3 ชนิดมีค่าใกล้เคียงกัน (ภาพที่ 27)



ภาพที่ 27 ผลของสารตัวพาและสารป้องกันเซลล์ต่อกิจกรรมการยับยั้ง *V. harveyi* VH05



ภาพที่ 28 ผลของสารตัวพาและสารป้องกันเซลล์ต่ออัตราการรอดชีวิตของ B17 และความชื้นของเชื้อผง

ความชื้นของผง B17 จากการทำแห้งแบบพ่นฝอยด้วยสารพาชนิดต่างๆ มีค่าต่ำ (ภาพที่ 28) และใกล้เคียงกับการทำแห้งแบบพ่นฝอยเชื้อชนิดอื่นๆ (Corbanie *et al.*, 2007; Ananta *et al.*, 2005; Boza *et al.*, 2004)

#### 5.4 ผลการใช้ผง B17 เป็นหัวเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างง่าย

เพื่อความสะดวกและประหยัดในการนำผง B17 ไปใช้เป็นหัวเชื้อ เพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อไว้ใช้ผสมอาหารกึ่งกลาดำ จึงจำเป็นต้องศึกษาความสามารถเพิ่มจำนวนของเชื้อผง B17 ในอาหารราคาดูกชนิดต่างๆ ที่หาได้ง่ายและสะดวกในการเตรียม ที่ผ่านมามีการศึกษการเพิ่มจำนวน *Bacillus* ในระดับอุตสาหกรรมโดยใช้อาหารราคาดูกหลายชนิด เช่น น้ำมันฝรั่ง น้ำตาล น้ำถั่วเหลือง นมผง และน้ำข้าวโพด เป็นต้น (Prabakaran *et al.*, 2007; Ghribi *et al.*, 2007) สำหรับการทดลองนี้จะใช้ผง B17 เป็นหัวเชื้อ ในอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างง่าย 5 ชนิด ได้แก่ Normal saline (NS), Coconut juice (Coco), Shrimp feed medium (SF), Molass medium (Mo) Molass-sandril salt-monosodium glutamate medium (MSMo) และอาหารสำเร็จรูป Nutrient broth (NB)

#### ตารางที่ 9 ผลการใช้ผง B17 เป็นหัวเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างง่าย

อาหารเลี้ยงเชื้อ	ปริมาณเซลล์มีชีวิต			กิจกรรมการยับยั้ง	
	(cfu/ml)			VH05	
				(cm ± S.D.)	
	0 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	36 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	36 ชั่วโมง
Normal saline (NS)	$3.60 \times 10^6$	$4.95 \times 10^8$	$6.45 \times 10^8$	$1.40 \pm 0.07$	$1.38 \pm 0.04$
Nutrient broth (NB)	$3.95 \times 10^6$	$1.55 \times 10^9$	$1.88 \times 10^9$	$1.50 \pm 0.00$	$1.50 \pm 0.07$
Shrimp feed medium (SF)	$4.30 \times 10^6$	$1.26 \times 10^9$	$7.50 \times 10^8$	$1.48 \pm 0.04$	$1.45 \pm 0.00$
Molass medium (Mo)	$3.50 \times 10^6$	$7.90 \times 10^8$	$3.95 \times 10^8$	$1.43 \pm 0.04$	$1.43 \pm 0.04$
Molass-sandril salt-monosodium glutamate medium (MSMo)	$3.85 \times 10^6$	$1.48 \times 10^9$	$1.16 \times 10^9$	$1.50 \pm 0.00$	$1.48 \pm 0.04$
Coconut juice (Coco)	$4.60 \times 10^6$	$1.40 \times 10^9$	$1.08 \times 10^9$	$1.48 \pm 0.04$	$1.45 \pm 0.00$

ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 9 พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง B17 ใน NS และ Mo มีปริมาณเซลล์มีชีวิตประมาณ  $10^8$  cfu/ml ส่วน SF, MSMo และ Coco มีปริมาณเซลล์มีชีวิตใกล้เคียงกับ NB โดยมีเซลล์ประมาณ  $10^9$  cfu/ml สำหรับที่ 36 ชั่วโมงในอาหารทุกชนิดมีปริมาณเซลล์มีชีวิตใกล้เคียงกับที่ 24 ชั่วโมง ส่วนกิจกรรมการยับยั้ง VH05 หลังการเพิ่มจำนวนในอาหารทั้ง 5 ชนิด รวมทั้ง NB พบว่ามีกิจกรรมการยับยั้ง VH05 ใกล้เคียงกันทั้งที่ 24 ชั่วโมงและ 36 ชั่วโมง

ผลการทดลองจะเห็นได้ว่า ผง B17 สามารถใช้เป็นหัวเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างง่ายได้ทั้ง 5 ชนิด ให้ปริมาณเซลล์สูง ( $4.95 \times 10^8$  ถึง  $1.48 \times 10^9$  cfu/ml) ใกล้เคียงหรือเท่ากับเพาะเลี้ยงใน NB ( $1.55 \times 10^9$  cfu/ml) และใช้เวลาเพาะเลี้ยง (24 ชั่วโมง) เท่ากับการใช้เชื้อสดเป็นหัวเชื้อ สำหรับ NS ซึ่งมีแต่โซเดียมคลอไรด์เพียงอย่างเดียว B17 ก็สามารถเติบโตได้ ( $4.95 \times 10^8$  cfu/ml) เนื่องจากเชื้อใช้อาหารจากสารพา (มอลโทเดกซ์ทรินผสมโมโนโซเดียมกลูตาเมต) และโซเดียมคลอไรด์จาก NS ในการเติบโต แต่ปริมาณเซลล์ที่ได้ยังน้อยกว่าอาหารอย่างง่ายชนิดอื่นๆ

ผง B17 ที่เพาะเลี้ยงใน Mo ได้ปริมาณเซลล์มากกว่า ( $7.90 \times 10^8$  cfu/ml) เเพาะเลี้ยงใน NS เนื่องจากในกากน้ำตาลนอกจากมีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบหลายชนิดแล้ว ยังมีสารประกอบไนโตรเจนหลายชนิด รวมทั้งกรดอะมิโนและวิตามินที่เป็นประโยชน์ต่อการเติบโตของ B17 (Rodrigues *et al.*, 2006) ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับ Nakajima-Kambe *et al.* (1999) และ Kulpreecha *et al.* (2009) ที่รายงานว่า *Bacillus* spp. MD32 และ *B. megaterium* BA-019 สามารถเติบโตได้ในอาหารกากน้ำตาล เช่นเดียวกับ Shikha *et al.* (2007) ที่เพาะเลี้ยง *B. pantotheneticus* เพื่อผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากอาหารที่เตรียมจากกากน้ำตาล

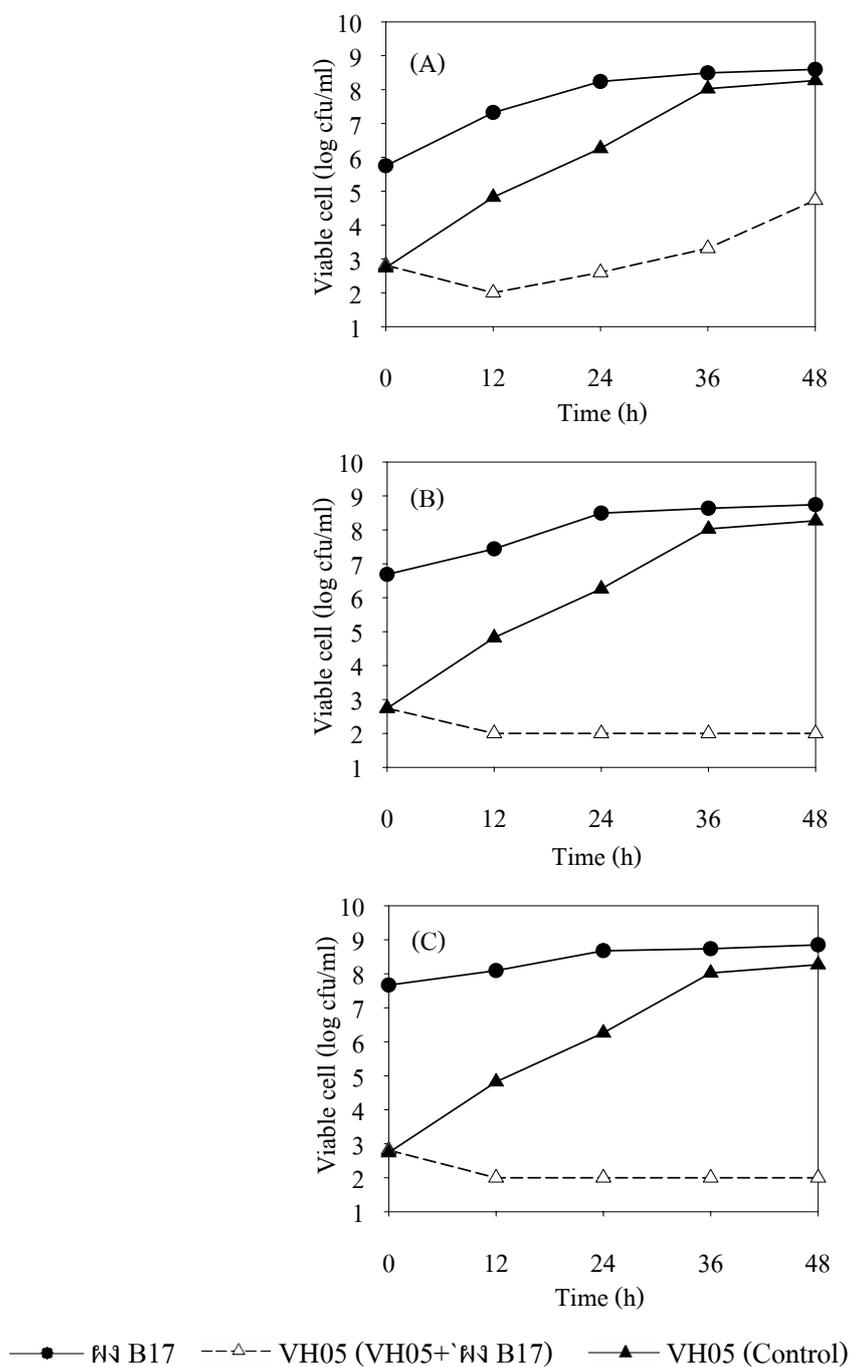
สำหรับ MSMo ที่ใช้ผง B17 เป็นหัวเชื้อ พบว่า B17 สามารถเติบโตได้ดี ( $1.48 \times 10^9$  cfu/ml) เนื่องจากมีกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน โมโนโซเดียมกลูตาเมตเป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนและมีเกลือ Sandril เป็นแหล่งแร่ธาตุ ในทำนองเดียวกัน B17 เติบโตได้ดีในน้ำมะพร้าว (Coco) ( $1.40 \times 10^9$  cfu/ml) เนื่องจากน้ำมะพร้าว มีสารอาหารหลายชนิดที่เป็นประโยชน์ต่อการเติบโตของเชื้อ เช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีนและไขมัน รวมทั้งแร่ธาตุต่างๆ โดยเฉพาะ phosphorus และ potassium (Walter *et al.*, 2009; Fonseca *et al.*, 2009) ผลการทดลองสอดคล้องกับ Prabakaran *et al.* (2008) ที่รายงานว่า *B. thuringiensis* เติบโตได้ดีมากในน้ำมะพร้าว ได้ปริมาณเซลล์เท่ากับ  $3.3 \times 10^{11}$  cfu/ml

B17 เติบโตใน SF ( $1.26 \times 10^9$  cfu/ml) ได้ดีใกล้เคียงกับ MSMo, Coco และ NB เนื่องจากอาหารกึ่งประกอบด้วยสารอาหารมากมาย เช่น ปลาป่น หัวกุ้งป่น ถั่วเหลืองป่น ข้าวโพดป่น และ น้ำมันปลา เป็นต้น (Rout and Bandyopadhyay, 1999; Cordova-Murueta and Garcia-Carreno, 2002) SF เตรียมได้ง่ายและราคาถูก โดยละลายอาหารกึ่งในน้ำซึ่งสะดวกและประหยัด นอกจากนี้การที่ B17 เติบโตในอาหารชนิดนี้ได้ดี แสดงให้เห็นว่าเชื้อนี้จะช่วยกำจัดอาหารกึ่งที่เหลืออยู่ในบ่อเลี้ยงกุ้งได้ ทำให้สามารถลดการเน่าเสียของน้ำในบ่อกุ้งได้

การใช้ผง B17 เป็นหัวเชื้อ นอกจาก B17 จะเติบโตได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างง่ายแล้ว B17 ที่ได้จากการขยายจำนวนยังคงมีกิจกรรมการยับยั้ง VH05 เหมือนเดิมอีกด้วย ยิ่งไปกว่านั้นสามารถใช้ผง *Bacillus* spp. เป็นหัวเชื้อได้ทันที โดยไม่ต้องนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อก่อน ซึ่งดีกว่าการใช้เชื้อผง *Lactobacillus* spp. ที่ต้องนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนนำไปใช้เป็นหัวเชื้อ เนื่องจากเซลล์ได้รับบาดเจ็บจากการทำแห้งจำนวนมาก ถ้านำไปใช้เป็นหัวเชื้อทันทีจะได้เซลล์ปริมาณต่ำและเซลล์เติบโตช้า เพราะต้องใช้เวลาในระยะ lag phase นาน (Boza *et al.*, 2004)

#### 5.5 ผลการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของผง B17 ที่ยับยั้ง VH05 โดยวิธี co-culture

ดังแสดงในภาพที่ 29 พบว่าเมื่อใช้ผง B17 ปริมาณเชื้อเริ่มต้น  $10^5$  cfu/ml สามารถยับยั้งการเติบโตของ VH05 ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น  $10^2$  cfu/ml ได้ภายในเวลา 12 ชั่วโมงและต่อเนื่องไปจนถึง 24 ชั่วโมง แต่ในชั่วโมงที่ 24 จนถึง 48 พบว่า VH05 สามารถกลับมาเติบโตได้อีก ส่วนการใช้ผง B17 ปริมาณเชื้อเริ่มต้น  $10^6$  และ  $10^7$  cfu/ml สามารถยับยั้งการเติบโตของ VH05 ได้ภายในเวลา 12 ชั่วโมงและต่อเนื่องไปจนครบ 48 ชั่วโมง ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับรายงานของ Vaseeharan and Ramasamy (2003) ที่พบว่า *V. harveyi* ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น  $10^2$  cfu/ml เมื่อใช้ *B. subtilis* BT23 ปริมาณเชื้อเริ่มต้น  $10^5$  cfu/ml ไม่สามารถยับยั้งการเติบโตของ *V. harveyi* ได้ต้องใช้ *B. subtilis* BT23 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นตั้งแต่  $10^7$  cfu/ml ถึง  $10^9$  cfu/ml จึงจะสามารถยับยั้งได้

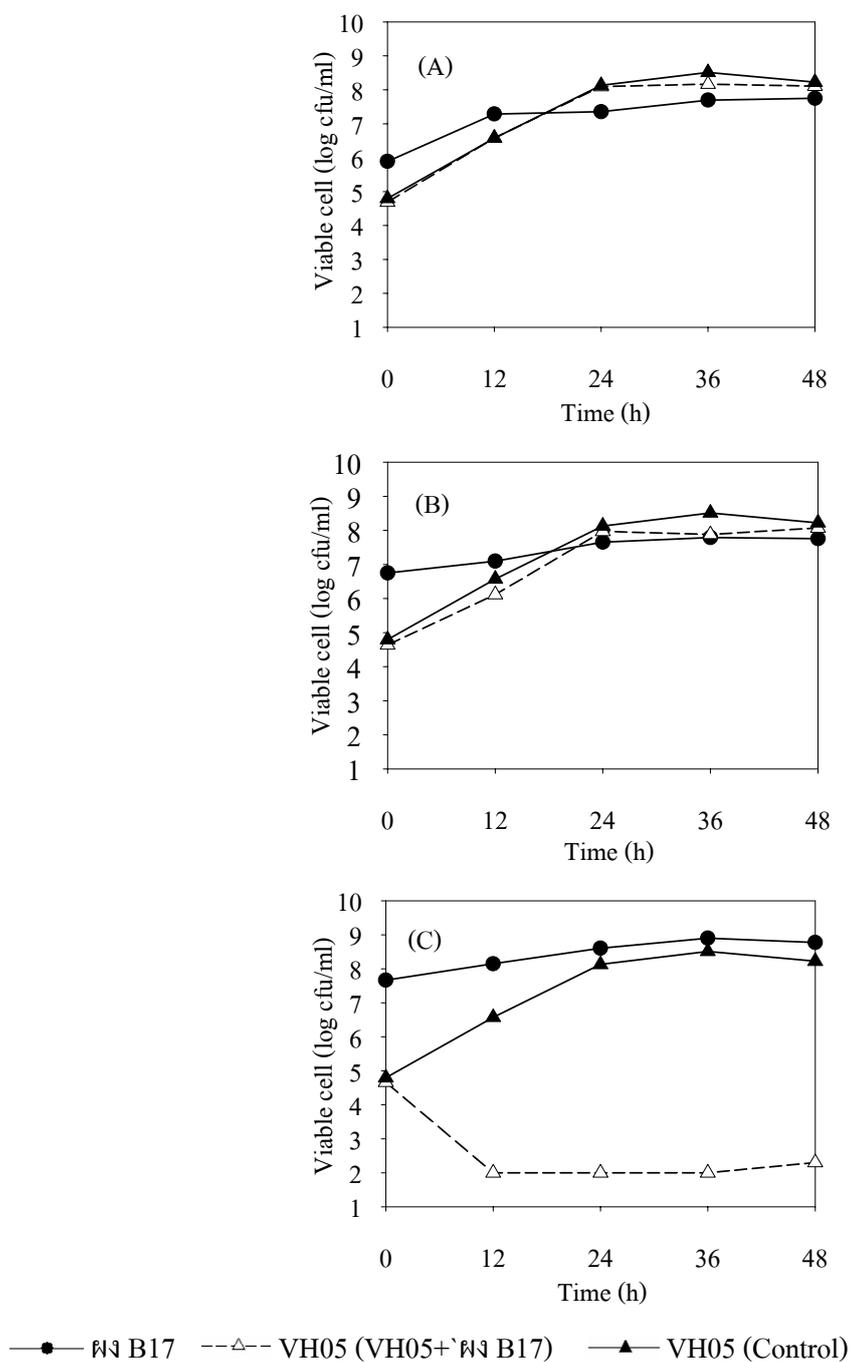


ภาพที่ 29 ผลของความเข้มข้นของผง B17 ต่อการยับยั้งการเติบโตของ VH05 ที่ความเข้มข้น  $10^2$  cfu/ml)

A: ผง B17 ที่ความเข้มข้น ปริมาณ  $10^5$  cfu/ml

B: ผง B17 ที่ความเข้มข้น ปริมาณ  $10^6$  cfu/ml

C: ผง B17 ที่ความเข้มข้น ปริมาณ  $10^7$  cfu/ml

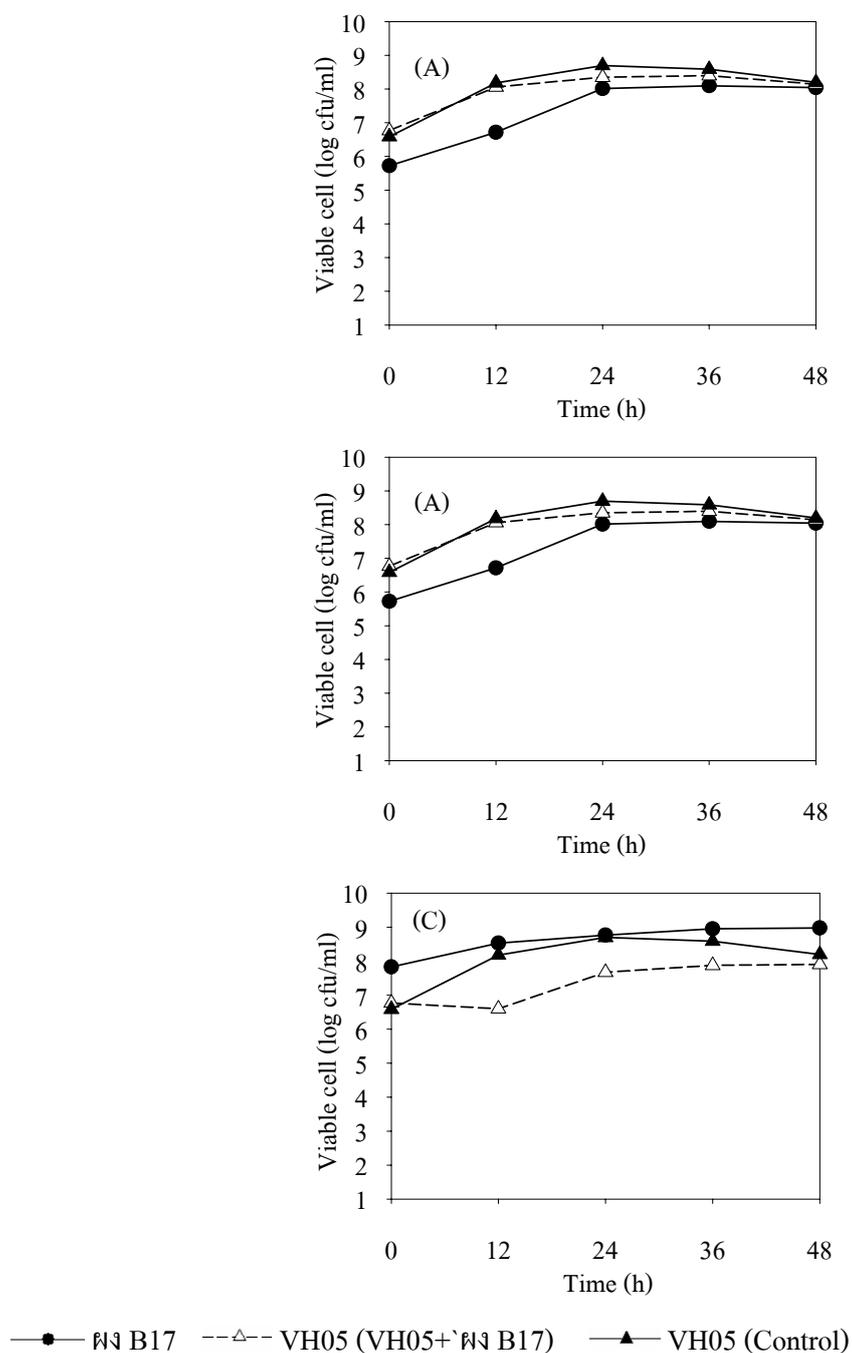


ภาพที่ 30 ผลของความเข้มข้นของผง B17 ต่อการยับยั้งการเติบโตของ VH05 ที่ความเข้มข้น  $10^4$  cfu/ml

A: ผง B17 ที่ความเข้มข้น ปริมาณ  $10^5$  cfu/ml

B: ผง B17 ที่ความเข้มข้น ปริมาณ  $10^6$  cfu/ml

C: ผง B17 ที่ความเข้มข้น ปริมาณ  $10^7$  cfu/ml



ภาพที่ 31 ผลของความเข้มข้นของผง B17 ต่อการยับยั้งการเติบโตของ VH05 ที่ความเข้มข้น  $10^6$  cfu/ml

A: ผง B17 ที่ความเข้มข้น ปริมาณ  $10^5$  cfu/ml

B: ผง B17 ที่ความเข้มข้น ปริมาณ  $10^6$  cfu/ml

C: ผง B17 ที่ความเข้มข้น ปริมาณ  $10^7$  cfu/ml

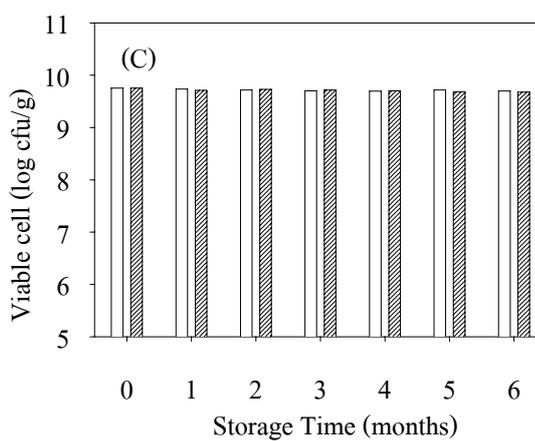
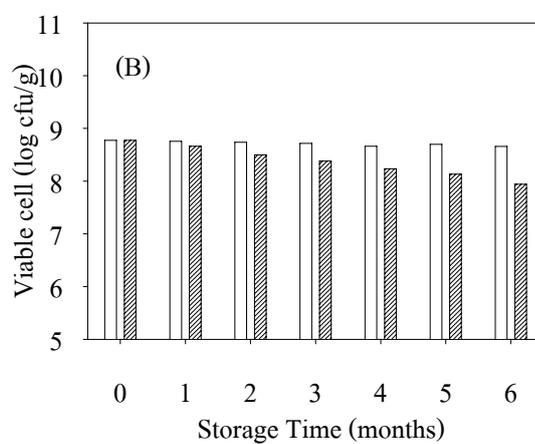
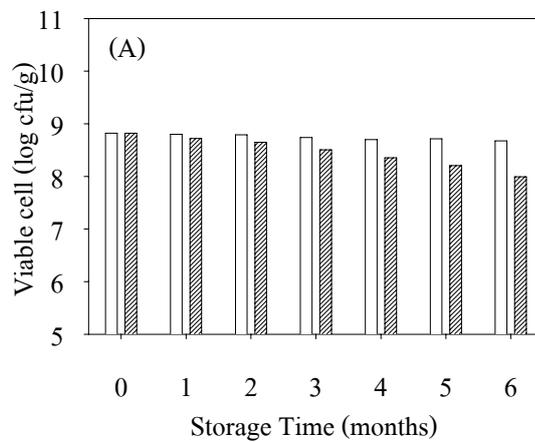
ที่ VH05 ปริมาณเชื้อเริ่มต้น  $10^4$  cfu/ml (ภาพที่ 30) การใช้ผง B17 ปริมาณเชื้อเริ่มต้น  $10^5$  และ  $10^6$  cfu/ml ไม่สามารถยับยั้ง VH05 แต่การใช้ผง B17 ปริมาณเชื้อเริ่มต้น  $10^7$  cfu/ml ยับยั้ง VH05 ได้ภายในเวลา 12 ชั่วโมงและต่อเนื่องไปจนถึง 36 ชั่วโมง ในชั่วโมงที่ 48 พบว่า VH05 สามารถกลับมาเติบโตได้อีก สำหรับที่ VH05 ปริมาณเชื้อเริ่มต้น  $10^6$  cfu/ml (ภาพที่ 31) B17 ปริมาณเชื้อเริ่มต้น  $10^5$ ,  $10^6$  และ  $10^7$  cfu/ml ไม่สามารถยับยั้งการเติบโตของ VH05

ดังนั้นค่าความเข้มข้นต่ำสุดของการใช้ผง B17 ยับยั้งการเติบโตของ VH05 ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น  $10^2$  cfu/ml เท่ากับ  $10^6$  cfu/ml และ VH05 ที่  $10^4$  cfu/ml เท่ากับ  $10^7$  cfu/ml ส่วน VH05 ที่  $10^6$  cfu/ml ไม่สามารถหาได้เนื่องจากปริมาณเชื้อของผง B17 เริ่มต้นที่ใช้ ( $10^7$  cfu/ml) น้อยเกินไป จะเห็นได้ว่าผลการทดลองใช้ผง B17 ยับยั้ง VH05 โดยวิธี co-culture ใน NB ใกล้เคียงกับผลการทดลองที่ได้ในหัวข้อที่ 3 ซึ่งใช้เชื้อสดยับยั้งการเติบโตของ VH05 แสดงให้เห็นว่าผง B17 ที่ได้จากการทำแห้งแบบพ่นฝอยยังคงมีประสิทธิภาพเช่นเดียวกับเชื้อสดและสามารถใช้แทนเชื้อสดได้

5.6 ผลของสารพา สารป้องกันเซลล์และอุณหภูมิต่ออัตราการรอดชีวิตของ B17 ในช่วงการเก็บรักษา

ภาพที่ 32 แสดงผลของสารพา สารป้องกันเซลล์ และอุณหภูมิที่เก็บรักษาเชื้อผงต่อปริมาณเซลล์มีชีวิตของ B17 ในช่วงการเก็บรักษา พบว่าชนิดของสารพา สารป้องกันเซลล์ และอุณหภูมิที่เก็บรักษา มีผลต่อปริมาณเซลล์มีชีวิตของ B17 เป็นอย่างมาก โดยผง B17 ที่ใช้มอลโทเดกซ์ทรินเป็นสารพาและเก็บที่อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$  มีปริมาณเซลล์มีชีวิตของ B17 ลดลงอย่างช้าๆ โดยมีปริมาณเซลล์มีชีวิตลดลงจาก  $6.65 \times 10^8$  เหลือ  $4.75 \times 10^8$  cfu/g ส่วนที่เก็บที่  $30^{\circ}\text{C}$  ปริมาณเซลล์มีชีวิตของ B17 ลดลงเร็วกว่าที่  $4^{\circ}\text{C}$  โดยลดลงจาก  $6.65 \times 10^8$  เหลือ  $9.85 \times 10^7$  cfu/g ในเดือนที่ 6

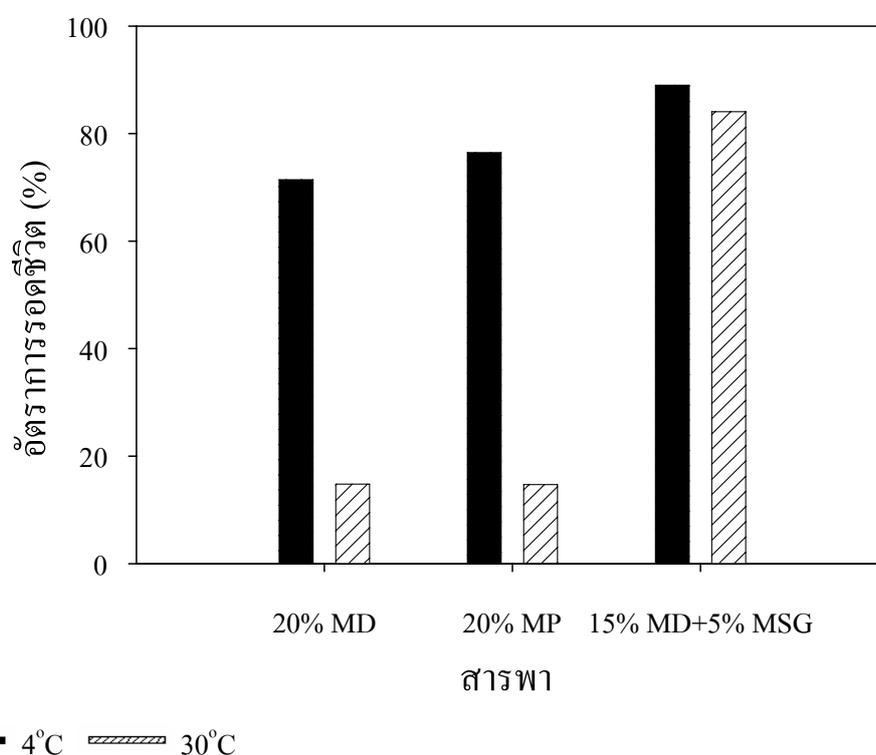
ผง B17 ที่ใช้นมผงเป็นสารพาและเก็บที่อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$  มีปริมาณเซลล์มีชีวิตของ B17 ลดลงอย่างช้าๆ เช่นเดียวกับใช้มอลโทเดกซ์ทรินเป็นสารพา โดยมีปริมาณเซลล์มีชีวิตลดลงจาก  $5.95 \times 10^8$  เหลือ  $4.55 \times 10^8$  cfu/g ส่วนที่เก็บที่  $30^{\circ}\text{C}$  ปริมาณเซลล์มีชีวิตของ B17 ลดลงเร็วกว่าที่  $4^{\circ}\text{C}$  และลดลงมากกว่าใช้มอลโทเดกซ์ทรินเป็นสารพา โดยลดลงจาก  $5.95 \times 10^8$  เหลือ  $8.75 \times 10^7$  cfu/g



□ 4°C    ▨ 30°C

ภาพที่ 32 ผลของ 20% Maltodextrin (A), 20% milk powder (B), 15% maltodextrin ผสม 5% monosodium glutamate (C) และอุณหภูมิต่อปริมาณเซลล์มีชีวิตของ B17 ในช่วงการเก็บรักษา

สำหรับ ผง B17 ที่ใช้มอลโทเดกซ์ทรินผสมโมโนโซเดียมกลูตาเมตเป็นสารพาและเก็บที่อุณหภูมิ 4°C มีปริมาณเซลล์มีชีวิตของ B17 ก่อนข้างคงที่ตลอด 6 เดือน โดยมีปริมาณเซลล์มีชีวิตลดลงจาก  $5.65 \times 10^9$  เหลือ  $5.00 \times 10^9$  cfu/g ส่วนที่เก็บที่ 30°C ปริมาณเซลล์มีชีวิตของ B17 ลดลงน้อยมาก โดยเฉพาะเมื่อเทียบกับการใช้มอลโทเดกซ์ทรินและนมผงเป็นสารพา โดยลดลงจาก  $5.65 \times 10^9$  เหลือ  $4.75 \times 10^9$  cfu/g



ภาพที่ 33 ผลของสารพา สารป้องกันเซลล์และอุณหภูมิต่ออัตราการรอดชีวิตของ B17 ในช่วงการเก็บรักษา

ดังแสดงในภาพที่ 33 พบว่า การใช้มอลโทเดกซ์ทรินผสมโมโนโซเดียมกลูตาเมตเป็นสารพามีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุดทั้งที่เก็บที่อุณหภูมิ 4°C (88.50%) และ 30°C (84.07%) ส่วนการใช้นมผงเป็นสารพามีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าการใช้มอลโทเดกซ์ทรินเป็นสารพา เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4°C โดยมีค่าเท่ากับ 76.47% และ 71.43% ตามลำดับ ส่วนการเก็บที่อุณหภูมิ 30°C การใช้นมผงและมอลโทเดกซ์ทรินเป็นสารพามีอัตราการรอดชีวิตใกล้เคียงกัน โดยมีค่าเท่ากับ 14.70% และ 14.81% ตามลำดับ

ส่วนกิจกรรมการยับยั้ง VH05 หลังการเก็บรักษาผง B17 โดยใช้สารพาห้ทั้ง 3 ชนิดมีค่าใกล้เคียงกัน และกิจกรรมการยับยั้ง VH05 ก่อนและหลังการเก็บรักษาของ B17 ที่ใช้สารตัวพาแต่ละชนิดก็มีค่าใกล้เคียงกัน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการทำแห้งแบบพ่นฝอยของ Mauriello *et al.* (1999) ที่ไม่พบการสูญเสียกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *L. lactis* ssp. *Lactis* 140 หลังจากผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอยและหลังการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 2 เดือน

Sunny-Roberts and Knorr (2009) ใช้โมโนโซเดียมกลูตาเมตเป็นสารป้องกันเซลล์ เช่นเดียวกับการทดลองนี้ โดยทำแห้ง *Lb. rhamnosus* GG (LGG) และ *Lb. rhamnosus* E-97800 (E800) หลังจากเก็บรักษาเชื้อผงไว้ที่อุณหภูมิ 25 และ 37°C เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าเชื้อทั้งสองชนิดมีเซลล์รอดชีวิตไปในทำนองเดียวกัน โดยเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 25°C และใช้ tehalose เป็นสารตัวพามีเซลล์รอดชีวิตประมาณ  $10^4$ - $10^5$  cfu/ml ในขณะที่ใช้ trehalose ผสม monosodium glutamate มีเซลล์รอดชีวิตเพิ่มขึ้นเป็น  $10^8$  cfu/ml ส่วนเชื้อผงที่เก็บในอุณหภูมิ 37°C และใช้ tehalose เป็นสารตัวพามีเซลล์รอดชีวิตประมาณ  $10^4$ - $10^5$  cfu/ml ในขณะที่ใช้ trehalose ผสม monosodium glutamate มีเซลล์รอดชีวิตประมาณ  $10^4$ - $10^6$  cfu/ml จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าการโมโนโซเดียมกลูตาเมต ช่วยปกป้องเซลล์ในระหว่างการทำแห้งแบบพ่นฝอย และช่วยปกป้องเซลล์ในระหว่างการรักษาที่อุณหภูมิ 25°C สำหรับความชื้นพบว่าหลังการทำแห้งแบบพ่นฝอย ความชื้นของเชื้อทั้งสองชนิด เมื่อใช้ trehalose เป็น carrier เท่ากับ 4.1% (w/w) และ trehalose ผสม monosodium glutamate มีความชื้นลดลงเหลือ 3.79% (w/w)

นอกจากนี้ B17 ที่ใช้สารตัวพาทั้ง 3 ชนิด หลังจากเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 6 เดือน มีอัตราการรอดชีวิตของ B17 สูงกว่ารายงานของ Wang *et al.* (2004) ที่ทำแห้งแบบพ่นฝอย *S. thermophilus* และ *B. infantis* แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 4 เดือน โดยมีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 29.5% และ 57.7% ตามลำดับ และมีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่ารายงานของ Gardiner *et al.* (2000) ที่เก็บรักษา *Lb. paracasei* NFBC 338 และ *Lb. salivarius* UCC 118 ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 2 เดือน ที่มีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 66% ส่วนเชื้อผง B17 ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 6 เดือนนั้นเห็นได้ชัดเจนว่า B17 ที่ใช้มอลโทเดกซ์ทรินผสมโมโนโซเดียมกลูตาเมตเป็นสารตัวพา สามารถเก็บไว้ได้นาน โดยที่เซลล์ยังมีชีวิตและยังคงมีกิจกรรมการยับยั้ง VH05 อยู่เหมือนเดิมโดยไม่ต้องแช่ตู้เย็น ซึ่งดีกว่ารายงานของ Sunny-Roberts and Knorr (2009) ที่ทำแห้ง *Lb. rhamnosus* GG (LGG) และ *Lb. rhamnosus* E-97800 (E800) โดยใช้ trehalose ผสม monosodium

glutamate เป็นสารตัวพา แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าปริมาณเซลล์มีชีวิตลดลงเป็นจำนวนมาก

ในทำนองเดียวกัน Carvalho et al. (2004) รายงานการทำแห้งแบบ freeze-dried แบบที่เรียผลิตรวดแลกดก ได้แก่ *Lb. bulgaricus*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus*, *Ent. faecalis* และ *Ent. durans* โดยใช้โมโนโซเดียมกลูตาเมตเป็นสารป้องกันเซลล์ พบว่าสามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิตในขณะเก็บรักษาเชื้อได้ โดย amino groups ในโมโนโซเดียมกลูตาเมตจะจับกับ carboxyl groups ของโปรตีนที่เยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อ ทำให้โปรตีนที่เยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อเสถียรขึ้น

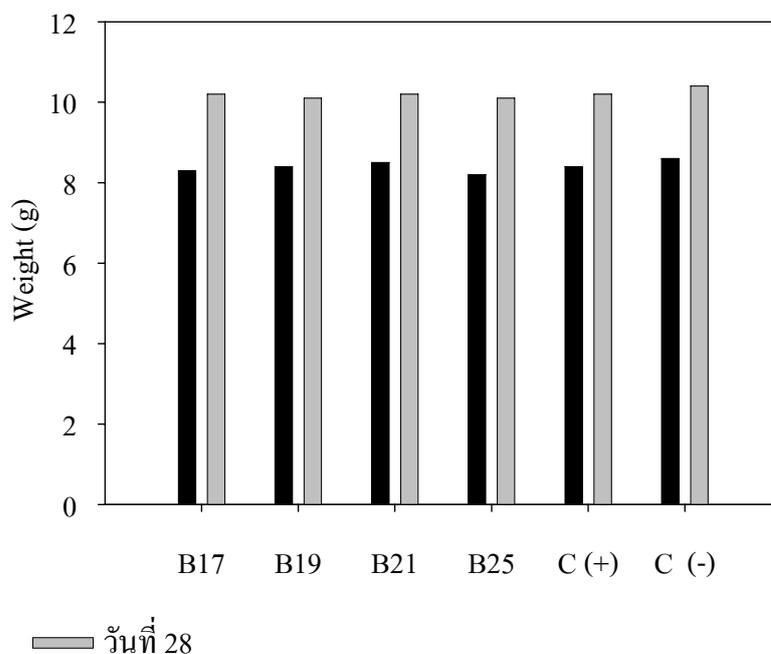
นอกจากคุณสมบัติของสารพา อุณหภูมิในการเก็บก็มีผลเป็นอย่างมากต่อปริมาณเซลล์มีชีวิตของเชื้อผงที่เก็บรักษา เช่นการศึกษาของ Kearney et al. (2009) ที่ทำแห้ง *Lb. paracasei* NFBC 338, *S. thermophilus* และ *Lb. delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* ใน yoghurt โดยใช้อุณหภูมิอากาศเข้า 170°C และอุณหภูมิอากาศออก 80 ถึง 85°C และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4, 15 และ 37°C เป็นเวลา 42 วัน พบว่าหลังการทำแห้ง *Lb. paracasei* NFBC 338, *S. thermophilus* และ *Lb. delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* มีเซลล์รอดชีวิตเท่ากับ  $3.4 \times 10^8$ ,  $1.2 \times 10^8$  และ  $4.0 \times 10^5$  cfu/g ตามลำดับ และหลังเก็บรักษาไว้ 42 วัน พบว่า *Lb. paracasei* NFBC 338 และ *S. thermophilus* มีเซลล์รอดชีวิตที่ 4 และ 15°C ประมาณ  $10^7$  cfu/g ในขณะที่ *Lb. delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* มีเซลล์รอดชีวิตน้อยกว่า  $10^7$  cfu/g และลดลงเรื่อยๆ ในขณะที่ 37°C มีเซลล์รอดชีวิตน้อยมาก

## 6. ผลการศึกษาประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp. ยับยั้ง *Vibrio* spp. ก่อโรคในกุ้งกุลาดำโดยวิธีเติมลงน้ำ

### 6.1 ผลของ *Bacillus* spp. ต่อน้ำหนักกุ้งกุลาดำ

ภาพที่ 34 แสดงน้ำหนักของกุ้งกุลาดำที่ได้รับ *Bacillus* spp. โดยการเติมลงน้ำให้มีความเข้มข้นประมาณ  $10^5$  cfu/ml หลังจากเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำเป็นเวลา 28 วัน พบว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับ B17 และ B25 มีน้ำหนักเพิ่มขึ้นมากกว่ากุ้งกลุ่มควบคุม (เพิ่มขึ้น 22.57 และ 22.58% ตามลำดับ) กุ้งกุลาดำที่ได้รับ B19 และ B21 มีน้ำหนักเพิ่มขึ้นใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม (เพิ่มขึ้น 20.07 และ 19.84% ตามลำดับ) ส่วนกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับโปรไบโอติกมีน้ำหนักเพิ่มขึ้น 20.88% ผลการทดลองสอดคล้องกับ Ziaei-Nejad et al. (2006) ที่เพาะเลี้ยง *Fenneropenaeus indicus* ที่ได้รับ commercial

*Bacillus* probiotic ประกอบด้วย *Bacillus* spp. 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. polymyxa*, *B. laterosporus* และ *B. circulans* โดยวิธีเติมลงน้ำให้มีปริมาณ  $10^6$  cfu/ml เป็นเวลา 90 วัน พบว่ากึ่งมีน้ำหนักเพิ่มขึ้น (8-22 %) เมื่อเทียบกับกึ่งที่ไม่ได้รับโปรไบโอติก

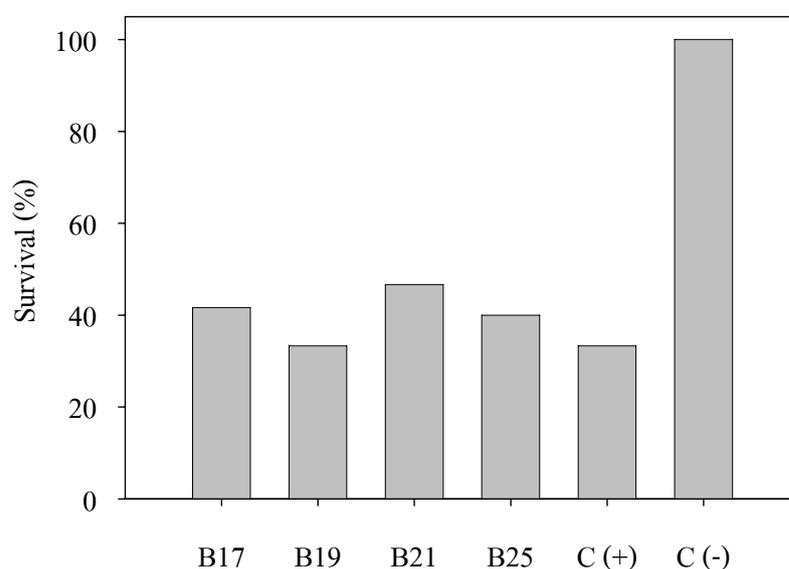


ภาพที่ 34 ผลของ *Bacillus* spp. โดยวิธีเติมลงน้ำต่อน้ำหนักกึ่งกุลาดำ กำหนดให้ ควบคุม (+) เป็นกลุ่มที่ทำให้ติดโรคด้วย VH05 ควบคุม (-) เป็นกลุ่มที่ไม่ทำให้ติดโรคด้วย VH05

#### 6.2 ผลของ *Bacillus* spp ต่ออัตราการรอดชีวิตของกึ่งกุลาดำ

ภาพที่ 35 แสดงอัตราการรอดชีวิตของกึ่งกุลาดำ พบว่ากึ่งกลุ่มที่เติม B17, B19, B21 และ B25 มีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 41.67, 33.33, 46.67 และ 40.00% ตามลำดับ ส่วนกลุ่มควบคุมที่ทำให้ติดโรคมีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 33.33% และกลุ่มควบคุมที่ไม่ทำให้ติดโรคเท่ากับ 100% จะเห็นได้ว่ากลุ่มที่เติม B17, B21 และ B25 มีผลต่อการยับยั้งการเกิดโรคในกึ่งกุลาดำ ทำให้มีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ทำให้ติดโรค

ผลการทดลองสอดคล้องกับ Moriarty (1998) ที่พบว่าโปรไบโอติก *Bacillus* spp. ที่เติมลงน้ำปริมาณ  $10^5$  cfu/ml เป็นเวลา 160 วัน ช่วยควบคุมปริมาณเชื้อก่อโรคในน้ำและช่วยป้องกันโรค vibriosis ในกุ้งได้ โดยตรวจพบปริมาณ *Vibrio* spp. ในลำไส้และในน้ำน้อยมาก และไม่พบ *V. harveyi* ที่ก่อให้เกิดโรคเรืองแสงเลย และ Vaseeharan and Ramasamy (2003) ที่รายงานว่าการเติมโปรไบโอติก *B. subtilis* BT23 ปริมาณ  $10^6$ - $10^8$  cfu/ml ในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ทุกวันเป็นเวลา 5 วัน แล้วทำให้ติดโรคด้วย *V. harveyi* พบว่ากุ้งกุลาดำมีอัตราการรอดชีวิตประมาณ 60 % ในขณะที่กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับโปรไบโอติกมีอัตราการรอดชีวิตเพียง 20%

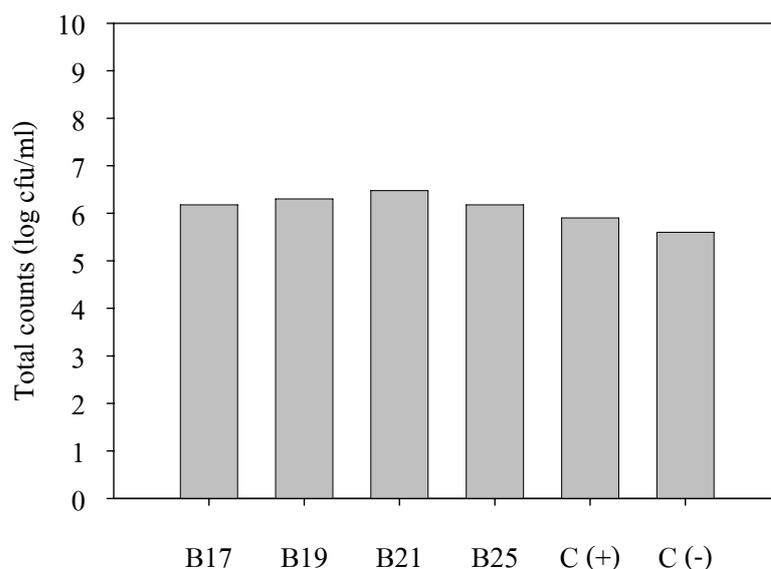


ภาพที่ 35 ผลของ *Bacillus* spp. โดยวิธีเติมลงน้ำต่อการรอดชีวิตของกุ้งกุลาดำ  
กำหนดให้ ควบคุม (+) เป็นกลุ่มที่ทำให้ติดโรคด้วย VH05  
ควบคุม (-) เป็นกลุ่มที่ไม่ทำให้ติดโรคด้วย VH05

ในทำนองเดียวกัน Zhou *et al.* (2009) รายงานว่ากุ้งมีอัตราการรอดชีวิตเพิ่มสูงขึ้นเมื่อให้โปรไบโอติกโดยวิธีเติมลงน้ำ โดยให้ *B. coagulans* SC8168 ความเข้มข้น  $1.0 \times 10^5$ ,  $5.0 \times 10^5$  และ  $1.0 \times 10^6$  cfu/ml ในบ่อเลี้ยง *Penaeus vannamei* พบว่ากุ้งมีอัตราการรอดชีวิต  $81.67 \pm 2.08\%$ ,  $86.33 \pm 1.53\%$ ,  $85.67 \pm 1.15\%$  และ 78% ตามลำดับ สูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เติม *B. coagulans* SC8168 และมีอัตราการรอดชีวิตเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ *B. coagulans* SC8168 ที่ให้ด้วย ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองนี้ สำหรับกุ้งกลุ่มที่เติม B19 ไม่สามารถช่วยยับยั้งการเกิดโรคในกุ้งกุลาดำได้ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม อาจเนื่องจากปริมาณของเชื้อที่ใช้้น้อยเกินไป

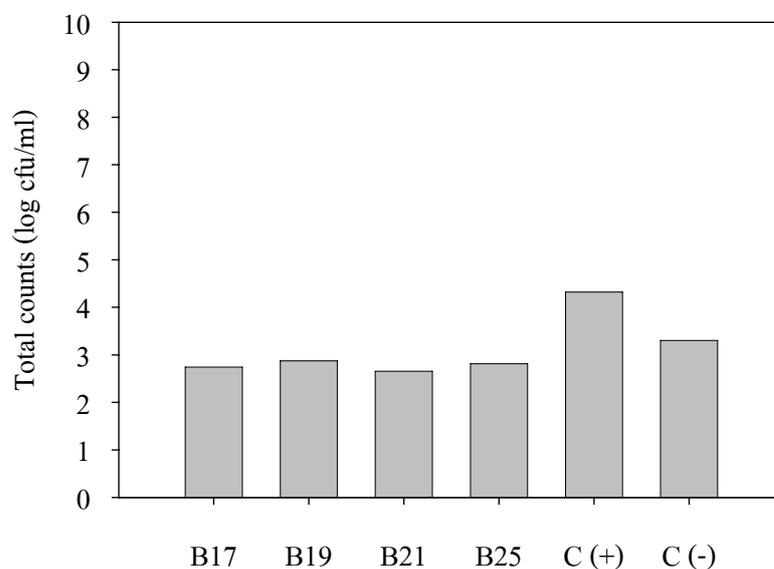
### 6.3 ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและ *Vibrio* spp. ในตับกุ้งกุลาดำ

หลังจากทำให้กุ้งกุลาดำติดโรคด้วย VH05 แล้ว ติดตามผลเป็นเวลา 10 วัน นำตัวอย่างกุ้งที่รอดชีวิตมาหาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและปริมาณ *Vibrio* spp. ในตับกุ้งกุลาดำ



**ภาพที่ 36** ผลของ *Bacillus* spp. โดยวิธีเติมลงน้ำต่อปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในตับกุ้งกุลาดำที่รอดชีวิตจากการทำให้กุ้งกุลาดำติดโรค  
กำหนดให้ ควบคุม (+) เป็นกลุ่มที่ทำให้ติดโรคด้วย VH05  
ควบคุม (-) เป็นกลุ่มที่ไม่ทำให้ติดโรคด้วย VH05

ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 36 พบว่าปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในตับกุ้งของทุกกลุ่มการทดลองที่เติม *Bacillus* spp. มีค่าเท่ากับ  $1.50 \times 10^6$  ถึง  $3.00 \times 10^6$  cfu/g กลุ่มควบคุมที่ทำให้ติดโรคมียปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดเท่ากับ  $8.00 \times 10^5$  cfu/g ส่วนกลุ่มควบคุมที่ไม่ทำให้ติดโรคเท่ากับ  $4.00 \times 10^5$  cfu/g จะเห็นว่าปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในตับกุ้งของทุกกลุ่มการทดลองที่เติม *Bacillus* spp. มีค่ามากกว่ากลุ่มควบคุมทั้ง 2 กลุ่มเล็กน้อย จึงอาจเป็นไปได้ว่ามีการสะสมของ *Bacillus* spp. ในตับกุ้งโดยผ่านน้ำและผิวหนังของกุ้ง



**ภาพที่ 37** ผลของ *Bacillus* spp. โดยวิธีเติมลงน้ำต่อปริมาณ *Vibrio* spp. ในตับของกุ้งกุลาดำที่รอดชีวิตจากการทำให้กุ้งกุลาดำติดโรค  
กำหนดให้ ควบคุม (+) เป็นกลุ่มที่ทำให้ติดโรคด้วย VH05  
ควบคุม (-) เป็นกลุ่มที่ไม่ทำให้ติดโรคด้วย VH05

สำหรับปริมาณ *Vibrio* spp. ในตับกุ้ง (ภาพที่ 37) พบว่าปริมาณ *Vibrio* spp. ของทุกกลุ่มการทดลองที่เติม *Bacillus* spp. มีค่าเท่ากับ  $4.50 \times 10^2$  ถึง  $7.50 \times 10^2$  cfu/g กลุ่มควบคุมที่ทำให้ติดโรคมียปริมาณ *Vibrio* spp. เท่ากับ  $2.10 \times 10^4$  cfu/g ส่วนกลุ่มควบคุมที่ไม่ทำให้ติดโรคมียปริมาณ *Vibrio* spp. เท่ากับ  $2.00 \times 10^3$  cfu/g

จะเห็นว่ากลุ่มการทดลองที่เติม *Bacillus* spp. จะมีส่วนช่วยให้ปริมาณ *Vibrio* spp. ในตับลดลงทำให้กุ้งรอดชีวิตจากการทำให้กุ้งติดโรค ในขณะที่กลุ่มควบคุมที่รอดชีวิตจากการทำให้ติดโรคมียปริมาณ *Vibrio* spp. ในตับสูงซึ่งเป็นไปได้ว่ากุ้งน่าจะกำลังป่วยหรือใกล้ตาย ส่วนกลุ่มควบคุมที่ไม่ทำให้ติดโรคมียปริมาณ *Vibrio* spp. อยู่ในระดับที่สูงพอสมควรแต่กุ้งไม่เป็นโรคหรือตาย อาจเนื่องจาก *Vibrio* spp. ที่ตรวจพบไม่ใช่สายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคในกุ้ง โดยทั่วไป *Vibrio* spp. ในตับกุ้งควรควบคุมให้มีปริมาณไม่เกิน  $10^2$  cfu/g ถ้ามีปริมาณ *Vibrio* spp. ในตับกุ้งมากกว่า  $10^4$  cfu/g จะทำให้กุ้งเริ่มทยอยตาย (Sung *et al.*, 2001; Gomez-Gil *et al.*, 1998)

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการใช้ B17, B21 และ B25 ในการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ด้วยวิธีเดิมลงน้ำ จุลินทรีย์ทดสอบสามารถช่วยให้กุ้งกุลาดำรอดชีวิต หลังจากทำให้กุ้งกุลาดำติดโรค ด้วย VH05 ในปริมาณที่ทำให้กุ้งตายได้ แต่อัตราการรอดชีวิตยังต่ำ สาเหตุอาจเป็นเพราะการใช้ *Bacillus* spp. ในการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำด้วยวิธีเดิมลงน้ำ กุ้งจะได้รับเชื้อจากการกินน้ำและทาง ผิวหนังในปริมาณที่น้อย ดังนั้นการศึกษาต่อไปจึงเปลี่ยนวิธีการใช้ B17, B21 และ B25 ในการ เพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำเป็นการให้ด้วยวิธีผสมอาหาร

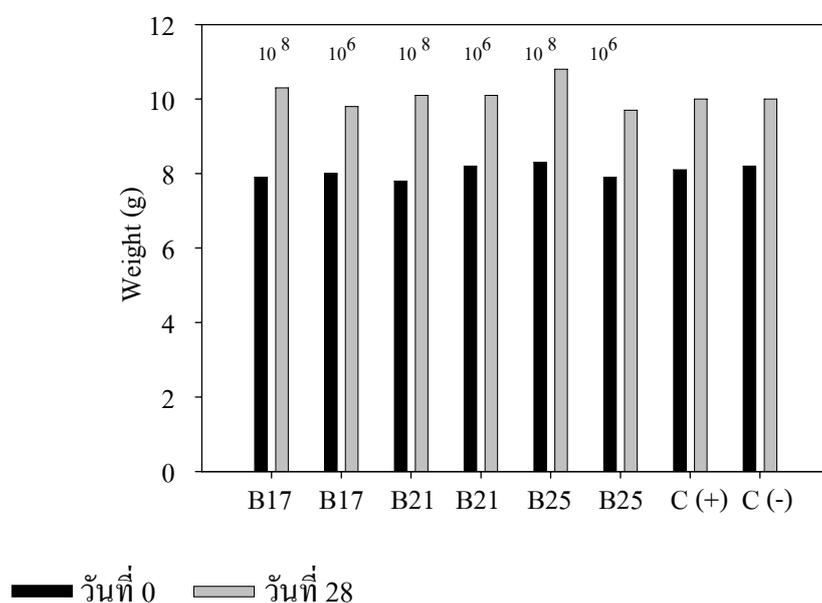
## 7. ผลการศึกษาประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp. ยับยั้ง *Vibrio* spp. ก่อโรคในกุ้งกุลาดำโดยวิธีผสมอาหาร

### 7.1 ผลของ *Bacillus* spp. ต่อน้ำหนักกุ้งกุลาดำ

หลังจากให้กุ้งกุลาดำกิน B17, B21 และ B25 ผสมอาหารทุกวัน เป็นเวลา 28 วัน ซึ่ง น้ำหนักกุ้งในทุกกลุ่มทดลอง ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 38 พบว่ากุ้งกุลาดำกลุ่มที่ได้รับ *Bacillus* spp. ความเข้มข้น  $10^6$  cfu/g มีน้ำหนักเพิ่มขึ้น 22.26, 23.96 และ 21.87% ตามลำดับ กลุ่มที่ได้รับ ความเข้มข้น  $10^8$  cfu/g มีน้ำหนักเพิ่มขึ้น 30.60, 28.95 และ 30.28% ตามลำดับ ส่วนกลุ่มควบคุม เท่ากับ 22.63% จะเห็นได้ว่าการให้ *Bacillus* spp. ผสมอาหารความเข้มข้น  $10^8$  cfu/g มีผลต่อการ ส่งเสริมการเติบโตของกุ้งกุลาดำอย่างมากเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่กลุ่มที่ให้ความ เข้มข้น  $10^6$  cfu/g และกลุ่มควบคุมมีการเติบโตใกล้เคียงกัน

ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับหลายงานวิจัย เช่น Balcazar *et al.* (2007b) รายงานว่า *Litopenaeus vannamei* ที่ได้รับโปรไบโอติก *B. subtilis* UTM126 ผสมอาหารเป็นเวลา 28 วัน มี น้ำหนักเพิ่มขึ้น 1.64 g มากกว่ากลุ่มควบคุมที่มีน้ำหนักเพิ่มขึ้นเพียง 1.26 g เช่นเดียวกับ Devaraja *et al.* (2002) ที่เพาะเลี้ยงกุ้งโดยใช้โปรไบโอติกที่ประกอบด้วย *Bacillus* spp. และ *Saccharomyces* spp. เป็นเวลา 110 วัน พบว่าน้ำหนักกุ้งที่ได้ต่อบ่อที่ใช้โปรไบโอติกสูงกว่ากลุ่มควบคุม และ Deeseenthum *et al.* (2007) พบว่า Giant prawns ที่ได้รับโปรไบโอติกมีน้ำหนักมากกว่า (3.32 g) กลุ่มควบคุม (2.1 g) เมื่อได้รับอาหารที่ผสม *Bacillus* KKU02 และ *Bacillus* KKU03 ( $10^6$  cfu/g) เป็นเวลา 120 วัน

จากงานวิจัยของ Wang (2007) พบว่า *Penaeus vannamei* ที่ได้รับโปรไบโอติกผสมระหว่าง photosynthetic bacteria และ *Bacillus* spp. ปริมาณ 10 g/kg เป็นเวลา 28 วัน พบว่ากุ้งมีการเติบโตที่ดีมีน้ำหนักเพิ่มขึ้นเฉลี่ย 1.71 g เมื่อเทียบกับกุ้งที่ไม่ได้รับโปรไบโอติกที่มีน้ำหนักเฉลี่ยเพียง 1.57 g ในทำนองเดียวกัน Rengpipat *et al.* (1998) ทดลองให้กุ้งกุลาดำกินโปรไบโอติก *Bacillus* S11 ผสมอาหารเป็นเวลา 100 วัน พบว่ากุ้งที่ได้รับโปรไบโอติกมีการเติบโตและรอดชีวิตสูงกว่ากุ้งที่ไม่ได้รับโปรไบโอติก



**ภาพที่ 38** ผลของ *Bacillus* spp. โดยวิธีผสมอาหาร ต่อน้ำหนักกุ้งกุลาดำ กำหนดให้ ควบคุม (+) เป็นกลุ่มที่ทำให้ติดโรคด้วย VH05 ควบคุม (-) เป็นกลุ่มที่ไม่ทำให้ติดโรคด้วย VH05

จากผลการทดลองจะเห็นว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับ B17, B21 และ B25 มีน้ำหนักมากกว่ากลุ่มควบคุม อาจเนื่องจาก *Bacillus* สามารถสร้างเอนไซม์ที่ช่วยในการย่อยอาหารได้หลายชนิด เช่น proteases, amylases และ lipases เป็นต้น (Mukerjea *et al.*, 2006; Ochoa-Solano และ Olmos-Soto, 2006; Amoa-Awua *et al.*, 2006) โดยเอนไซม์เหล่านี้ช่วยทำให้กุ้งสามารถย่อยอาหารและนำสารอาหารไปใช้เพื่อการเติบโตได้ดีขึ้น สอดคล้องกับรายงานของ Ziaei-Nejad *et al.* (2006) ที่วิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ในทางเดินอาหารของกุ้งที่ได้รับ *Bacillus* พบว่ามีปริมาณของเอนไซม์ช่วยย่อย ได้แก่ amylase, protease และ lipase มากกว่ากลุ่มควบคุม เช่นเดียวกับ Zhou *et al.* (2009)

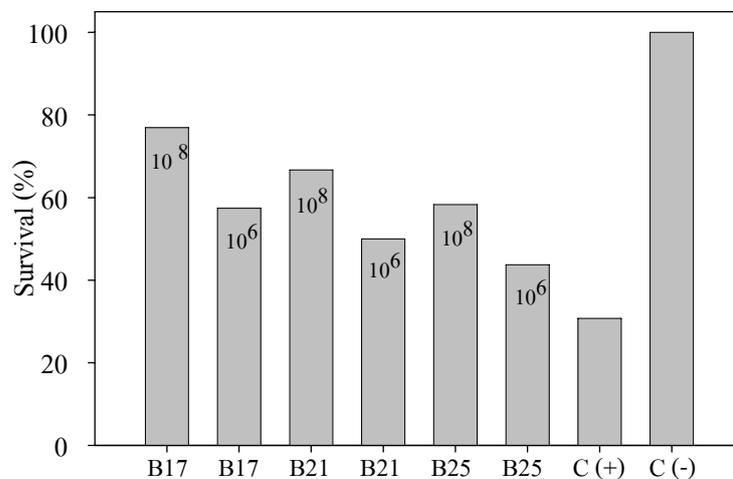
ที่พบว่ากุ้งที่ได้รับ *B. coagulans* SC8168 ความเข้มข้น  $5.0 \times 10^5$  และ  $1.0 \times 10^6$  cfu/ml มีกิจกรรมของเอนไซม์ amylase และ lipase สูงกว่ากลุ่มควบคุม และ Wang (2007) รายงานว่า *Penaeus vannamei* ที่ได้รับโปรไบโอติกผสมระหว่าง photosynthetic bacteria และ *Bacillus* มี protease, amylase, lipase และ cellulase activity ในระบบทางเดินอาหารสูงกว่ากลุ่มควบคุม

#### 7.2 ผลของ *Bacillus* spp. ต่อการรอดชีวิตของกุ้งกุลาดำ

ภาพที่ 39 แสดงอัตราการรอดชีวิตของกุ้งกุลาดำที่ได้รับ B17, B21 และ B25 ผสมอาหาร หลังจากทำให้กุ้งกุลาดำติดโรคด้วย VH05 และติดตามผลเป็นเวลา 10 วัน พบว่ากุ้งที่ได้รับ *Bacillus* spp. ความเข้มข้น  $10^6$  มีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 57.14, 50.00 และ 43.75 % ตามลำดับ และกลุ่มที่ได้รับความเข้มข้น  $10^8$  cfu/g มีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 76.92, 66.67 และ 58.33% ตามลำดับ ส่วนกลุ่มควบคุมที่ทำให้ติดโรคเท่ากับ 30.77% และกลุ่มควบคุมที่ไม่ทำให้ติดโรคเท่ากับ 100% จะเห็นได้ว่ากลุ่มที่ให้ B17, B21 และ B25 มีผลต่อการยับยั้งการเกิดโรคในกุ้งกุลาดำ ทำให้มีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ทำให้ติดโรค และ B17 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคในกุ้งกุลาดำสูงกว่า B21 และ B25 ตามลำดับ นอกจากนี้ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่ากุ้งที่ได้รับโปรไบโอติกความเข้มข้นสูงกว่า ให้อัตราการรอดชีวิตของกุ้งกุลาดำหลังจากทำให้ติดโรคสูงกว่าด้วย

ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับ Rengpipat *et al.* (1998) ที่รายงานว่าหลังจากทำให้กุ้งติดเชื้อด้วย *V. harveyi* กุ้งกุลาดำที่ได้รับโปรไบโอติก *Bacillus* S11 มีอัตราการรอดชีวิต 100% ส่วนกุ้งที่ไม่ได้รับโปรไบโอติกมีอัตราการรอดชีวิตเพียง 26% ในทำนองเดียวกัน *Litopenaeus vannamei* ที่ได้รับโปรไบโอติก *B. subtilis* UTM126 ( $10^6$  fu/g) หลังจากทำให้กุ้งติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* มีอัตราการรอดชีวิต 81% สูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับโปรไบโอติก (67%) (Balcazar *et al.*, 2007)

*Bacillus* spp. นอกจากมีบทบาทช่วยปกป้องกุ้งจากเชื้อก่อโรค โดยแย่งจับบริเวณผนังทางเดินอาหารของกุ้ง แย่งสารอาหารจากเชื้อก่อโรค รวมทั้งสร้างสารยับยั้งเชื้อก่อโรคแล้ว (Balcazar *et al.*, 2006; Gomez-Gil *et al.*, 2000) ยังมีรายงานว่า *Bacillus* spp. สามารถส่งเสริมภูมิคุ้มกันโรคให้กับกุ้งได้ ตัวอย่างเช่น Gullian *et al.* (2004) รายงานการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งด้วย *Bacillus* P64 และ Rengpipat *et al.* (2000) รายงานการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งด้วย *Bacillus* S11 ในกุ้งกุลาดำเมื่อให้กุ้งกินอาหารผสม *Bacillus* S11 เป็นเวลา 90 วัน พบว่ากุ้งมีภูมิคุ้มกันสูงขึ้น



**ภาพที่ 39** ผลของ *Bacillus* spp. โดยวิธีผสมอาหาร ต่อการรอดชีวิตของกุ้งกุลาดำ กำหนดให้ ควบคุม (+) เป็นกลุ่มที่ทำให้ติดโรคด้วย VH05 ควบคุม (-) เป็นกลุ่มที่ไม่ทำให้ติดโรคด้วย VH05

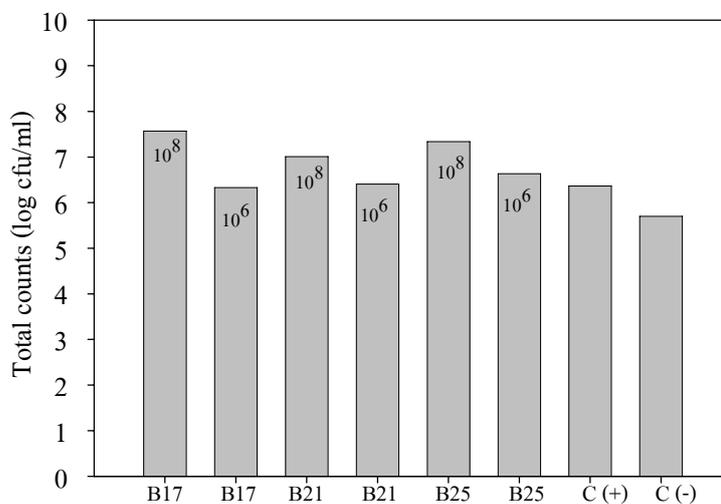
เช่นเดียวกับ Purivirojkul *et al.* (2005) ให้การกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) โดยให้กินอาหารผสม *B. pumilus*, *B. sphaericus* และ *B. subtilis* ความเข้มข้นประมาณ  $10^9$  cfu/g เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่ากุ้งกุลาดำมีระดับภูมิคุ้มกันเพิ่มสูงขึ้นในทุกกลุ่มทดลอง (total hemocytes, phenol oxidase และ superoxide) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

สอดคล้องกับงานวิจัยของ Itami *et al.* (1998) ที่ศึกษาผลของ peptidoglycan ที่แยกได้จาก *Bifidobacterium thermophilum* ต่อการต้านทานโรคในกุ้ง พบว่ากุ้งที่ได้รับ peptidoglycan โดยการผสมอาหารเป็นเวลา 2 เดือน มีอัตราการรอดชีวิตหลังจากถูกทำให้ติดโรคด้วย *Vibrio* spp. และเชื้อไวรัส white spot syndrome baculovirus สูงกว่ากลุ่มควบคุม นอกจากนี้ Itami *et al.* (1998) ยังได้ศึกษา phagocytic activity ของกุ้งพบว่าเซลล์ granulocytes ของกุ้งกลุ่มที่ได้รับ peptidoglycan มี phagocytic activity สูงกว่ากลุ่มควบคุม ซึ่งรายงานนี้สามารถใช้อธิบายเรื่องการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งด้วย *Bacillus* spp. ได้ เนื่องจาก *Bacillus* spp. เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มี peptidoglycan เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ ในทำนองเดียวกัน Purivirojkul *et al.* (2006) ใช้ peptidoglycan ผสมอาหารให้กุ้งกุลาดำกินปริมาณ 0.18 g/kg/week เป็นเวลา 10 สัปดาห์ พบว่ากุ้งมีภูมิคุ้มกันเพิ่มมากขึ้น โดยดูจากปริมาณ hemocytes, phenoloxidase และ superoxide anion

### 7.3 ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและปริมาณ *Vibrio* spp. ในดับกึ่งกลาดำ

#### 7.3.1 ผลของ *Bacillus* spp. ต่อปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและ *Vibrio* spp. ในดับกึ่งกลาดำที่รอดชีวิต

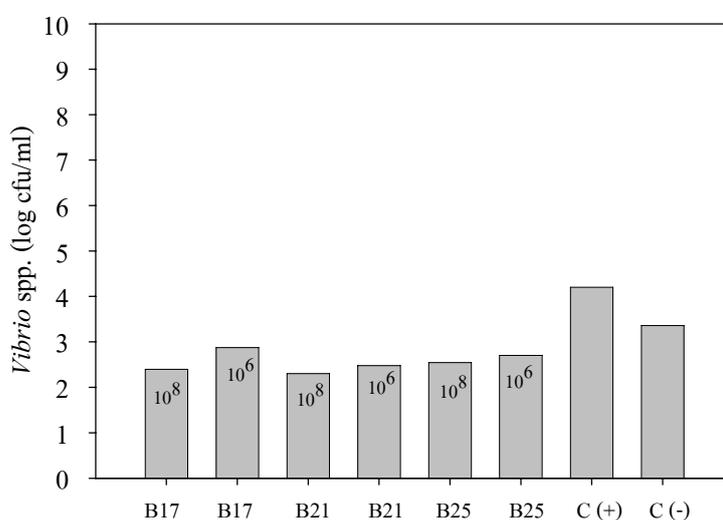
หลังจากทำให้กึ่งกลาดำติดโรคด้วย VH05 นำตัวอย่างกึ่งที่รอดชีวิตมาหาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและปริมาณ *Vibrio* spp. ในดับกึ่งกลาดำ ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 40 พบว่ากึ่งกลาดำกลุ่มที่ให้ *Bacillus* spp. ความเข้มข้น  $10^6$  cfu/g ทุกกลุ่มมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในดับกึ่งเท่ากับ  $2.15 \times 10^6$  ถึง  $4.30 \times 10^6$  cfu/g กลุ่มที่ให้ความเข้มข้น  $10^8$  cfu/g เท่ากับ  $1.02 \times 10^7$  ถึง  $3.70 \times 10^7$  cfu/g กลุ่มควบคุมที่ทำให้ติดโรคเท่ากับ  $2.30 \times 10^6$  cfu/g และกลุ่มควบคุมที่ไม่ทำให้ติดโรคเท่ากับ  $5.00 \times 10^5$  cfu/g จากผลการทดลองจะเห็นกึ่งที่ให้ *Bacillus* spp. ผสมอาหารความเข้มข้น  $10^8$  cfu/g มีแบคทีเรียทั้งหมดในดับกึ่งที่รอดชีวิต มากกว่ากลุ่มที่ให้ความเข้มข้น  $10^6$  cfu/g และกลุ่มควบคุมทั้งสองกลุ่ม ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากเกิดการสะสมของ *Bacillus* spp. ที่ผสมมากับอาหาร



ภาพที่ 40 ผลของ *Bacillus* spp. โดยวิธีผสมอาหาร ต่อปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในดับของกึ่งกลาดำที่รอดชีวิตจากการทำให้กึ่งกลาดำติดโรค  
กำหนดให้ ควบคุม (+) เป็นกลุ่มที่ทำให้ติดโรคด้วย VH05  
ควบคุม (-) เป็นกลุ่มที่ไม่ทำให้ติดโรคด้วย VH05

สำหรับปริมาณ *Vibrio* spp. ในตับกุ้งแสดงดังภาพที่ 41 พบว่ากุ้งกุลาดำกลุ่มที่ให้ *Bacillus* spp. ผสมอาหารความเข้มข้น  $10^6$  cfu/g ทุกกลุ่มมีปริมาณ *Vibrio* spp. ในตับกุ้งเท่ากับ  $3.00 \times 10^2$  ถึง  $7.50 \times 10^2$  cfu/g กลุ่มที่ให้ความเข้มข้น  $10^8$  cfu/g เท่ากับ  $2.00 \times 10^2$  ถึง  $3.50 \times 10^2$  cfu/g กลุ่มควบคุมที่ทำให้ติดโรคเท่ากับ  $1.60 \times 10^4$  cfu/g และกลุ่มควบคุมที่ไม่ทำให้ติดโรคเท่ากับ  $2.30 \times 10^3$  cfu/g

จากผลการทดลองจะเห็นว่าปริมาณ *Vibrio* spp. ในตับกุ้งที่รอดชีวิตของทุกกลุ่ม การทดลองที่ให้ *Bacillus* spp. ผสมอาหารความเข้มข้น  $10^8$  cfu/g และความเข้มข้น  $10^6$  cfu/g มีปริมาณ *Vibrio* spp. ในตับกุ้งใกล้เคียงกันและมีปริมาณน้อยกว่ากลุ่มควบคุมทั้งสองกลุ่ม แสดงว่าการให้ *Bacillus* spp. ผสมอาหารสามารถช่วยลดปริมาณ *Vibrio* spp. ในตับกุ้งได้ และสามารถทำให้กุ้งรอดชีวิตจากการทำให้ติดโรค ในขณะที่กลุ่มควบคุมที่รอดชีวิตจากการทำให้ติดโรคมียังมีปริมาณ *Vibrio* spp. ในตับสูงซึ่งเป็นไปได้ว่ากุ้งน่าจะกำลังป่วยหรือใกล้ตาย ส่วนกลุ่มควบคุมที่ไม่ทำให้ติดโรคมียังมีปริมาณ *Vibrio* spp. อยู่ในระดับที่สูงพอสมควรแต่กุ้งไม่เป็นโรคหรือตาย อาจเนื่องจาก *Vibrio* spp. ที่ตรวจพบไม่ใช่สายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคในกุ้ง



ภาพที่ 41 ผลของ *Bacillus* spp. โดยวิธีผสมอาหาร ต่อปริมาณ *Vibrio* spp. ในตับของกุ้งกุลาดำที่รอดชีวิตหลังจากการทำให้กุ้งกุลาดำติดโรค  
กำหนดให้ ควบคุม (+) เป็นกลุ่มที่ทำให้ติดโรคด้วย VH05  
ควบคุม (-) เป็นกลุ่มที่ไม่ทำให้ติดโรคด้วย VH05

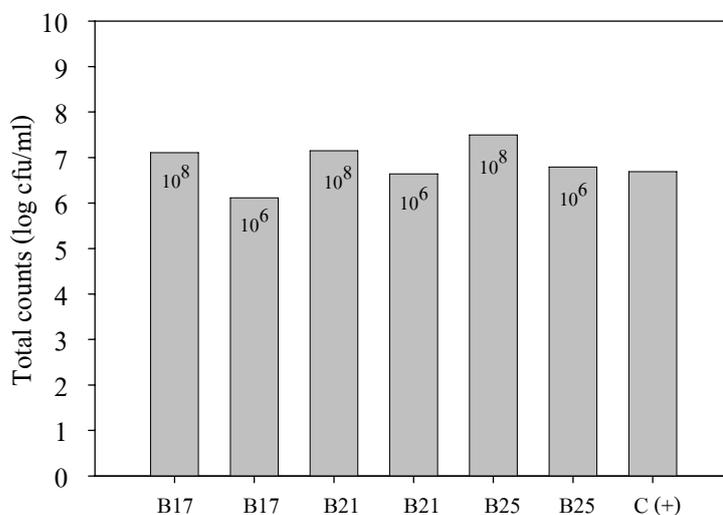
ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับรายงานของ Rengpipat *et al.* (1998) ที่เลี้ยงกุ้งกุลาดำด้วยอาหารผสม *Bacillus* S11 ความเข้มข้นประมาณ  $10^{10}$  cfu/g เป็นเวลา 100 วัน แล้วทำให้กุ้งกุลาดำติดโรคด้วย *V. harveyi* D331 พบว่ากุ้งที่ได้รับ *Bacillus* spp. มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในตับกุ้งรอดชีวิตประมาณ  $10^7$  cfu/g ส่วนกลุ่มควบคุมที่ทำให้ติดโรคมียังมีประมาณ  $10^6$  cfu/g สำหรับปริมาณ *Vibrio* spp. ในตับกุ้งพบว่ากลุ่มที่ให้ *Bacillus* spp. มีปริมาณ *Vibrio* spp. ประมาณ  $10^2$  cfu/g และกลุ่มควบคุมที่ทำให้ติดโรคมียังมีประมาณ  $10^5$  cfu/g

Purivirojkul *et al.* (2005) ศึกษาการใช้โปรไบโอติก *Bacillus* spp. ในกุ้งกุลาดำ โดยให้กุ้งกุลาดำกินอาหารผสม *Bacillus* spp. ความเข้มข้นประมาณ  $10^9$  cfu/g เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับ *Bacillus* spp. ชนิดต่างๆ ได้แก่ *B. pumilus*, *B. sphaericus* และ *B. subtilis* มีปริมาณ *Vibrio* spp. ในลำไส้กุ้งกุลาดำเท่ากับ  $2.33 \pm 1.53$  ถึง  $32.00 \pm 3.61$  cfu/g ซึ่งน้อยกว่าในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ให้ *Bacillus* spp. ( $970.00 \pm 285.13$ ) cfu/g

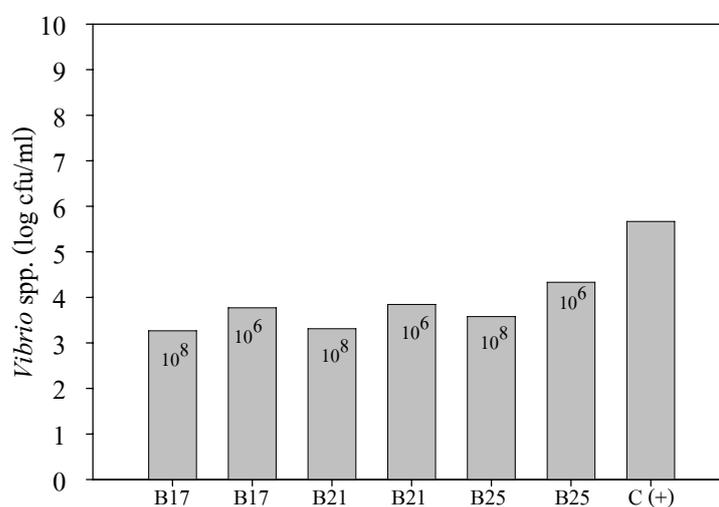
7.3.2 ผลของ *Bacillus* spp. ต่อปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและ *Vibrio* spp. ในตับกุ้งกุลาดำที่ตาย

หลังจากทำให้กุ้งกุลาดำติดโรคด้วย VH05 กุ้งกลุ่มที่ได้รับ B17, 21, 25 ผสมอาหารความเข้มข้น  $10^6$  cfu/g มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในตับกุ้งเท่ากับ  $1.30 \times 10^6$  ถึง  $6.20 \times 10^6$  cfu/g และกลุ่มที่ได้รับ *Bacillus* spp. ความเข้มข้น  $10^8$  cfu/g เท่ากับ  $1.29 \times 10^7$  ถึง  $3.15 \times 10^7$  cfu/g กลุ่มควบคุมที่ทำให้ติดโรคเท่ากับ  $4.90 \times 10^6$  cfu/g จากผลการทดลองจะเห็นว่า ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในตับกุ้งของทุกกลุ่มที่ให้ *Bacillus* spp. ผสมอาหารความเข้มข้น  $10^8$  cfu/g มีค่ามากกว่ากลุ่มที่ให้ความเข้มข้น  $10^6$  cfu/g และกลุ่มควบคุม ตามลำดับ (ภาพที่ 42)

กุ้งที่ให้ *Bacillus* spp. ผสมอาหารความเข้มข้น  $10^6$  cfu/g ทุกกลุ่มมีปริมาณ *Vibrio* spp. ในตับกุ้งที่ตาย (ภาพที่ 43) เท่ากับ  $5.90 \times 10^3$  ถึง  $2.14 \times 10^4$  cfu/g กุ้งที่ให้ความเข้มข้น  $10^8$  cfu/g มีปริมาณเท่ากับ  $1.85 \times 10^3$  ถึง  $3.80 \times 10^3$  cfu/g กลุ่มควบคุมที่ทำให้ติดโรคมียังมีปริมาณเท่ากับ  $4.65 \times 10^5$  cfu/g



ภาพที่ 42 ผลของ *Bacillus* spp. โดยวิธีผสมอาหาร ต่อปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในระดับของกึ่ง  
 กล้วยาค้าที่ตายหลังจากการทำให้กึ่งกล้วยาค้าติดโรค  
 กำหนดให้ ควบคุม (+) เป็นกลุ่มที่ทำให้ติดโรคด้วย VH05



ภาพที่ 43 ผลของ *Bacillus* spp. โดยวิธีผสมอาหาร ต่อปริมาณ *Vibrio* spp. ในระดับของกึ่งกล้วยาค้าที่  
 ตายหลังจากการทำให้กึ่งกล้วยาค้าติดโรค  
 กำหนดให้ ควบคุม (+) เป็นกลุ่มที่ทำให้ติดโรคด้วย VH05

จากผลการทดลองจะเห็นว่าปริมาณ *Vibrio* spp. ในดับกึ่งของทุกกลุ่มการทดลองที่ให้ *Bacillus* spp. ความเข้มข้น  $10^8$  cfu/g มีค่าน้อยกว่าทุกกลุ่มที่ให้  $10^6$  cfu/g และกลุ่มควบคุม และทุกกลุ่มที่ให้ความเข้มข้น  $10^6$  cfu/g ก็มีปริมาณ *Vibrio* spp. ในดับกึ่งน้อยกว่ากลุ่มควบคุม แสดงว่าการ *Bacillus* spp. ผสมอาหารสามารถช่วยลดปริมาณ *Vibrio* spp. ในดับกึ่งได้ แต่ปริมาณ *Vibrio* spp. ที่ตรวจพบในกึ่งตายของทุกกลุ่มที่ให้ *Bacillus* spp. ผสมอาหารยังมีปริมาณสูงคือมากกว่า  $10^3$  cfu/g เนื่องจากกึ่งอาจจะมีสุขภาพที่ไม่ดีอยู่แล้วหรืออาจกำลังบาดเจ็บเนื่องจากการกักกันของกึ่ง หรือการถูกทำร้ายจากกึ่งตัวอื่นเมื่อกำลังลอกคราบ รวมทั้งในขณะที่ทำให้กึ่งติดโรคกึ่งกำลังอยู่ในช่วงลอกคราบอยู่ ทำให้กึ่งมีสุขภาพอ่อนแอกว่ากึ่งตัวอื่นและตายไปในที่สุด

## 8. ผลการศึกษาประสิทธิภาพของผง *Bacillus* spp. ยับยั้ง *Vibrio* spp. ก่อโรคในกึ่งกุลาดำโดยวิธีผสมอาหาร

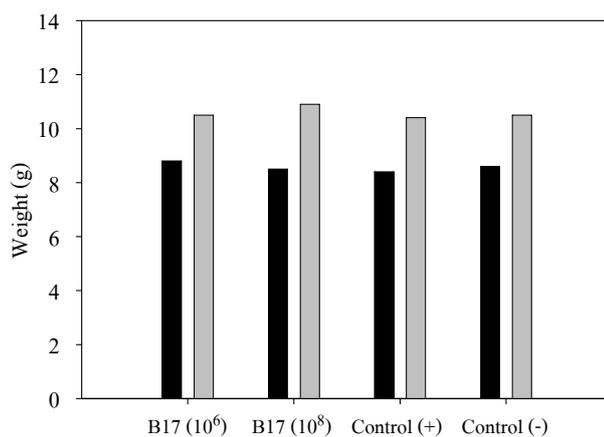
### 8.1 ผลของผง B17 ต่อน้ำหนักกึ่งกุลาดำ

ดังแสดงในภาพที่ 44 พบว่าน้ำหนักกึ่งที่เพิ่มขึ้นในกึ่งกลุ่มที่ให้ผง B17 ผสมอาหาร ความเข้มข้น  $10^6$  cfu/g เป็นเวลา 28 วัน เท่ากับ 19.27% กลุ่มที่ให้ผง B17 ผสมอาหารความเข้มข้น  $10^8$  cfu/g มีน้ำหนักเพิ่มขึ้นเท่ากับ 28.17% ส่วนกลุ่มควบคุมมีน้ำหนักเพิ่มขึ้นเท่ากับ 22.76% จะเห็นได้ว่าการให้ผง B17 ผสมอาหารความเข้มข้น  $10^8$  cfu/g มีผลต่อการส่งเสริมการเติบโตของกึ่งกุลาดำเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่กลุ่มการทดลองที่ให้ผง B17 ผสมอาหารความเข้มข้นประมาณ  $10^6$  cfu/g และกลุ่มควบคุมมีการเติบโตใกล้เคียงกัน

### 8.2 ผลของผง B17 ต่อการรอดชีวิตของกึ่งกุลาดำ

ดังแสดงในภาพที่ 45 หลังจากทำให้กึ่งกุลาดำติดโรคด้วย VH05 พบว่ากึ่งกลุ่มที่ให้ผง B17 ผสมอาหารความเข้มข้น  $10^6$  cfu/g มีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 54.55% กลุ่มที่ให้ผง B17 ผสมอาหารความเข้มข้น  $10^8$  cfu/g มีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 70.83% ส่วนกลุ่มควบคุมที่ทำให้ติดโรคมีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 21.74% และกลุ่มควบคุมที่ไม่ทำให้ติดโรคมีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 100% จะเห็นได้ว่ากลุ่มที่ให้ผง B17 ผสมอาหารมีผลต่อการยับยั้งการเกิดโรคในกึ่งกุลาดำ ทำให้มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ทำให้ติดโรค และกึ่งที่ได้รับโปรไบโอติกความเข้มข้นสูงกว่าสามารถช่วยป้องกันโรคจาก VH05 ได้ดีกว่า ทำให้มีอัตราการรอดชีวิตที่สูงกว่า

ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับ Castex *et al.* (2009) ที่รายงานว่า *Litopenaeus stylirostris* ที่ได้รับโปรไบโอติก *Pediococcus acidilactici* MA18/5M ในรูปของเชื้อผงผสมอาหาร ปริมาณ  $9.5 \times 10^6$  cfu/g เป็นเวลา 22 วัน สามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิต จากการทำให้กุ้งติดเชื้อด้วย *V. nigripulchritudo* โดยพบว่ากุ้งที่ได้รับโปรไบโอติกมีอัตราการรอดชีวิต 67% ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีอัตราการรอดชีวิตเพียง 47%

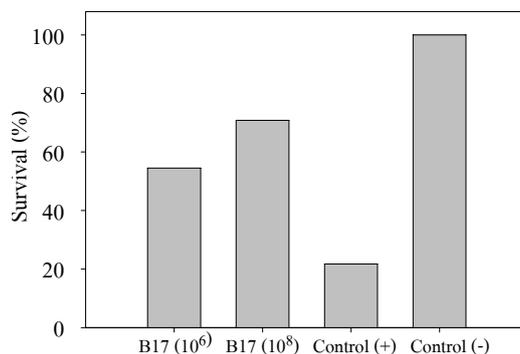


■ วันที่ 0    ■ วันที่ 28

#### ภาพที่ 44 ผลของผง B17 ต่อน้ำหนักกุ้งกุลาดำ

กำหนดให้ ควบคุม (+) เป็นกลุ่มที่ทำให้ติดโรคด้วย VH05

ควบคุม (-) เป็นกลุ่มที่ไม่ทำให้ติดโรคด้วย VH05



#### ภาพที่ 45 ผลของผง B17 ต่อการรอดชีวิตของกุ้งกุลาดำ

กำหนดให้ ควบคุม (+) เป็นกลุ่มที่ทำให้ติดโรคด้วย VH05

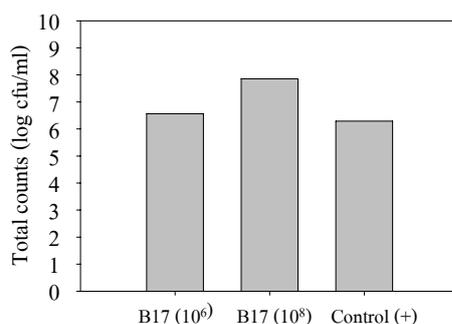
ควบคุม (-) เป็นกลุ่มที่ไม่ทำให้ติดโรคด้วย VH05

นอกจากนี้ Tseng *et al.* (2009) รายงานว่า *Litopenaeus vannamei* ที่ได้รับ *B. subtilis* E20 ในรูปเชื้อผสมอาหาร สามารถช่วยเพิ่มภูมิคุ้มกันและช่วยป้องกันโรคจาก *V. alginolyticus* ได้ โดยกุ้งที่กิน *B. subtilis* E20 ความเข้มข้น  $10^6$ ,  $10^7$ , และ  $10^8$  cfu/kg มีอัตราการรอดชีวิตหลังจากทำให้ติดเชื้อด้วย *V. alginolyticus* เท่ากับ 76.6, 80.0 และ 83.3% ตามลำดับ ส่วนกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับ *B. subtilis* E20 มีอัตราการรอดชีวิต เท่ากับ 63.3% และพบว่ากุ้งที่ได้รับ *B. subtilis* E20 มีระดับภูมิคุ้มกันที่เพิ่มสูงขึ้น (phenoloxidase activity และ phagocytic activity) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

### 8.3 ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและปริมาณ *Vibrio* spp. ในดักกุ้งกุลาดำ

8.3.1 ผลของผง B17 ต่อปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและ *Vibrio* spp. ในดักของกุ้งกุลาดำที่ตาย

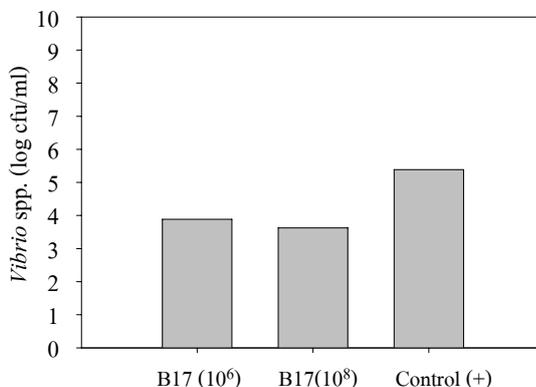
ดังแสดงในภาพที่ 46 พบว่ากุ้งกุลาดำกลุ่มที่ให้ผง B17 ผสมอาหารความเข้มข้น  $10^6$  cfu/g มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในดักกุ้งที่ตายเท่ากับ  $3.65 \times 10^6$  cfu/g กลุ่มที่ให้ผง B17 ผสมอาหารความเข้มข้น  $10^8$  cfu/g มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในดักกุ้งเท่ากับ  $7.15 \times 10^7$  cfu/g กลุ่มควบคุมที่ทำให้ติดโรคมียปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดเท่ากับ  $1.96 \times 10^6$  cfu/g



**ภาพที่ 46** ผลของผง B17 ต่อปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในดักของกุ้งกุลาดำที่ตายหลังจากการทำให้กุ้งกุลาดำติดโรค  
กำหนดให้ ควบคุม (+) เป็นกลุ่มที่ทำให้ติดโรคด้วย VH05

จากผลการทดลองจะเห็นว่า ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในดักกุ้งของกลุ่มการทดลองที่ให้ผง B17 ผสมอาหารความเข้มข้น  $10^8$  cfu/g มีค่ามากกว่ากลุ่มการทดลองที่ให้ผง B17

ผสมอาหารความเข้มข้น  $10^6$  cfu/g และกลุ่มควบคุม ตามลำดับ โดยกลุ่มการทดลองที่ให้ผง B17 ผสมอาหารความเข้มข้น  $10^6$  cfu/g มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในระดับกึ่งมากกว่ากลุ่มควบคุมเล็กน้อย

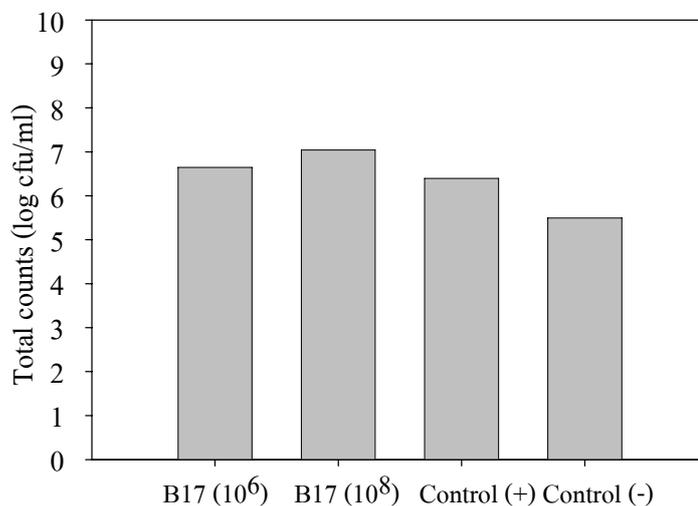


**ภาพที่ 47** ผลของผง B17 ต่อปริมาณ *Vibrio* spp. ในระดับของกึ่งกุลาดำที่ตายหลังจากการทำให้กึ่งกุลาดำติดโรค กำหนดให้ ควบคุม (+) เป็นกลุ่มที่ทำให้ติดโรคด้วย VH05

ดังแสดงในภาพที่ 47 พบว่ากึ่งกลุ่มที่ให้ผง B17 ผสมอาหารความเข้มข้น  $10^6$  cfu/g มีปริมาณ *Vibrio* spp. ในระดับกึ่งที่ตายเท่ากับ  $7.65 \times 10^3$  cfu/g กลุ่มที่ให้ผง B17 ผสมอาหารความเข้มข้น  $10^8$  cfu/g มีปริมาณ *Vibrio* spp. ในระดับกึ่งเท่ากับ  $4.25 \times 10^3$  cfu/g กลุ่มควบคุมที่ทำให้ติดโรคมีปริมาณ *Vibrio* spp. ในระดับกึ่งเท่ากับ  $2.42 \times 10^5$  cfu/g จากผลการทดลองจะเห็นว่าปริมาณ *Vibrio* spp. ในระดับกึ่งของกลุ่มการทดลองที่ให้ผง B17 ผสมอาหารความเข้มข้น  $10^8$  cfu/g มีค่าน้อยกว่ากลุ่มการทดลองที่ให้ผง B17 ผสมอาหารความเข้มข้น  $10^6$  cfu/g และกลุ่มควบคุม ในขณะที่เดียวกันกึ่งที่ให้ผง B17 ผสมอาหารความเข้มข้น  $10^6$  cfu/g มีปริมาณ *Vibrio* spp. ในระดับกึ่งน้อยกว่ากลุ่มควบคุม

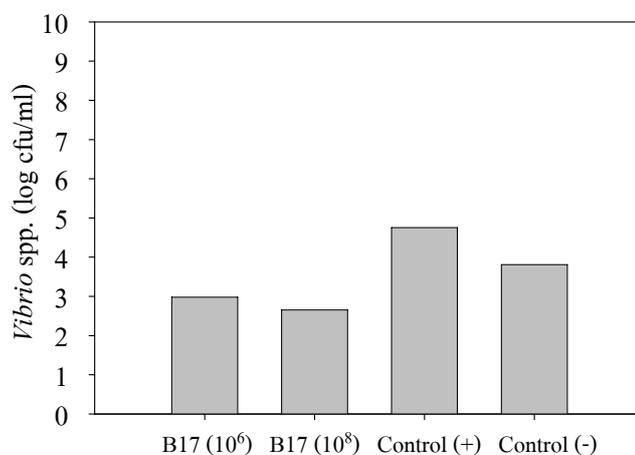
การให้ผง B17 ผสมอาหารสามารถช่วยลดปริมาณ *Vibrio* spp. ในระดับกึ่งได้ แต่ปริมาณ *Vibrio* spp. ที่ตรวจพบในกึ่งตายของทุกกลุ่มการทดลองที่ให้ผง *Bacillus* spp. ผสมอาหารยังมีปริมาณสูง คือมากกว่า  $10^3$  cfu/g ซึ่งทำให้กึ่งป่วยและตาย ถึงแม้กึ่งที่ตายจะได้รับผง B17 ผสมอาหารเหมือนกึ่งตัวอื่นๆ ที่รอดชีวิต แต่กึ่งอาจจะมีสุขภาพที่ไม่ดีอยู่แล้วหรืออาจกำลังบาดเจ็บเนื่องจากการกักกันของกึ่ง หรือการถูกทำร้ายจากกึ่งตัวอื่นเมื่อกำลังลอกคราบ รวมทั้งในขณะที่ทำให้กึ่งติดโรคงัดกึ่งกำลังอยู่ในช่วงลอกคราบอยู่ ทำให้กึ่งมีสุขภาพอ่อนแอกว่ากึ่งตัวอื่นและตายในที่สุด

### 8.3.2 ผลของผง B17 ต่อปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและ *Vibrio* spp. ในตับของกุ้งกุลาดำที่รอดชีวิต



**ภาพที่ 48** ผลของผง B17 ต่อปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในตับของกุ้งกุลาดำที่รอดชีวิตจากการทำให้กุ้งกุลาดำติดโรค  
กำหนดให้ ควบคุม (+) เป็นกลุ่มที่ทำให้ติดโรคด้วย VH05  
ควบคุม (-) เป็นกลุ่มที่ไม่ทำให้ติดโรคด้วย VH05

ดังแสดงในภาพที่ 48 พบว่ากุ้งกลุ่มที่ให้ผง B17 ผสมอาหารความเข้มข้น  $10^6$  cfu/g มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในตับกุ้งที่รอดชีวิตเท่ากับ  $4.45 \times 10^6$  cfu/g กลุ่มที่ให้ผง B17 ผสมอาหารความเข้มข้น  $10^8$  cfu/g มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในตับกุ้งเท่ากับ  $1.10 \times 10^7$  cfu/g กลุ่มควบคุมที่ทำให้ติดโรคมียปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดเท่ากับ  $2.49 \times 10^6$  cfu/g กลุ่มควบคุมที่ไม่ทำให้ติดโรคมียปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดเท่ากับ  $3.15 \times 10^5$  cfu/g จากผลการทดลองจะเห็นว่าปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในตับกุ้งของกลุ่มการทดลองที่ให้ผง B17 ผสมอาหารความเข้มข้น  $10^8$  cfu/g มีค่ามากกว่ากลุ่มการทดลองที่ให้ผง B17 ผสมอาหารความเข้มข้น  $10^6$  cfu/g และกลุ่มควบคุมทั้งสองกลุ่ม และกลุ่มควบคุมที่ทำให้ติดโรคมียปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดมากกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ทำให้ติดโรค



**ภาพที่ 49** ผลของผง B17 ต่อปริมาณ *Vibrio* spp. ในตับของกุ้งกุลาดำที่รอดชีวิตจากการทำให้กุ้งกุลาดำติดโรค

กำหนดให้ ควบคุม (+) เป็นกลุ่มที่ทำให้ติดโรคด้วย VH05

ควบคุม (-) เป็นกลุ่มที่ไม่ทำให้ติดโรคด้วย VH05

ดังแสดงในภาพที่ 49 พบว่ากุ้งกลุ่มที่ให้ผง B17 ผสมอาหารความเข้มข้น  $10^6$  cfu/g มีปริมาณ *Vibrio* spp. ในตับกุ้งที่รอดชีวิตเท่ากับ  $9.50 \times 10^2$  cfu/g กลุ่มที่ให้ผง B17 ผสมอาหารความเข้มข้น  $10^8$  cfu/g มีปริมาณ *Vibrio* spp. ในตับกุ้งเท่ากับ  $4.50 \times 10^3$  cfu/g กลุ่มควบคุมที่ทำให้ติดโรคมีปริมาณ *Vibrio* spp. ในตับกุ้งเท่ากับ  $5.70 \times 10^4$  cfu/g กลุ่มควบคุมที่ไม่ทำให้ติดโรคมีปริมาณ *Vibrio* spp. ในตับกุ้งเท่ากับ  $6.45 \times 10^3$  cfu/g

ปริมาณ *Vibrio* spp. ในตับกุ้งของกลุ่มที่ให้ผง B17 ผสมอาหารความเข้มข้น  $10^8$  cfu/g น้อยกว่ากลุ่มที่ให้ผง B17 ผสมอาหารความเข้มข้น  $10^6$  cfu/g และมีปริมาณน้อยกว่ากลุ่มควบคุมทั้งสองกลุ่ม และกลุ่มควบคุมที่ทำให้ติดโรคมีปริมาณ *Vibrio* spp. ในตับกุ้งมากกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ทำให้ติดโรค แสดงว่าการให้ผง B17 ผสมอาหารสามารถช่วยลดปริมาณ *Vibrio* spp. ในตับกุ้งได้ และสามารถทำให้กุ้งรอดชีวิตจากการทำให้ติดโรค ในขณะที่กลุ่มควบคุมที่รอดชีวิตจากการทำให้ติดโรคมีปริมาณ *Vibrio* spp. ในตับสูงซึ่งเป็นไปได้ว่ากุ้งน่าจะกำลังป่วยหรือใกล้ตาย ส่วนกลุ่มควบคุมที่ไม่ทำให้ติดโรคมีปริมาณ *Vibrio* spp. อยู่ในระดับที่สูงพอสมควรแต่กุ้งไม่เป็นโรคหรือตาย อาจเนื่องจาก *Vibrio* spp. ที่ตรวจพบไม่ใช่สายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคในกุ้ง

จากผลการทดลอง กุ้งกุลาดำที่ได้รับเชื้อผง B17 ผสมอาหาร มีการเติบโตและอัตราการรอดชีวิตหลังจากถูกทำให้ติดเชื้อด้วย VH05 สูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับโปรไบโอติก และมีปริมาณ *Vibrio* spp. ในตับกุ้งต่ำกว่ากลุ่มควบคุมที่ถูกทำให้เกิดโรค ซึ่งสอดคล้องกับการใช้เชื้อสดผสมในอาหารให้กับกุ้ง (หัวข้อที่7) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า B17 ในรูปของเชื้อผงที่ผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอย ยังคงมีประสิทธิภาพเหมือนเชื้อสด ในการส่งเสริมการเติบโตของกุ้ง และยับยั้งการเติบโตของ VH05 ในกุ้งกุลาดำ

## สรุปผลการทดลอง

ผลจากการศึกษานี้สามารถคัดเลือก *B. amyloliquefaciens* B17, *B. pumilus* B19, *B. amyloliquefaciens* B21 และ *B. megaterium* B25 จากตักกึ่งกลุ่ดาค่าที่มีกิจกรรมยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในกึ่งกลุ่ดาค่า *Vibrio* spp. จำนวน 10 สายพันธุ์ ด้วยวิธี agar well diffusion ซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเฉลี่ยอยู่ในช่วง  $1.03 \pm 0.04$  ถึง  $2.20 \pm 0.07$  cm และมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเท่ากับ  $5.0 \times 10^7$ ,  $5.0 \times 10^7$ ,  $5.0 \times 10^7$  และ  $5.0 \times 10^6$  cfu/ml ตามลำดับ นอกจากนี้ยังหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งด้วยวิธี co-culture ใน nutrient broth พบว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ B17 และ B21 ที่ยับยั้งการเติบโตของ *V. harveyi* VH05 เท่ากับ  $5.0 \times 10^6$  และ  $5.0 \times 10^7$  cfu/ml ตามลำดับ ส่วน B25 พบว่าในช่วงความเข้มข้น  $10^6$  ถึง  $10^8$  cfu/ml ไม่สามารถหาค่าได้

ผลการศึกษการเพาะเลี้ยง B17, B19, B21 และ B25 ในพลาสติกแบบเขย่า พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อดัดแปรโมลาสที่มีส่วนผสมของ Sandril salt และ 5% โมโนโซเดียมกลูตาเมต ร่วมกับการเติมโซเดียมคลอไรด์ปริมาณ 0 ถึง 15 g/l เหมาะสมกับการเติบโตของแบคทีเรียทดสอบทุกสายพันธุ์ ที่อุณหภูมิ 30 ถึง 37°C เมื่อเพาะเลี้ยง B17, B21 และ B25 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่มีการควบคุมพีเอชในช่วง 5.0-7.0 พบว่า B17, B21 และ B25 เติบโตได้ดีที่พีเอช 6.0 โดยให้อัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.4985, 0.4387 และ 0.4938 h<sup>-1</sup> ตามลำดับ

การศึกษการทำแห้งแบบพ่นฝอยของ B17 พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อและระยะการเติบโตมีผลต่ออัตราการรอดชีวิต โดย B17 ที่เพาะเลี้ยงใน NB มีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าที่เพาะเลี้ยงใน MSMo ประมาณ 2.5 เท่า เซลล์ที่การเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 36, 48 และ 24 ชั่วโมง มีอัตราการรอดชีวิตหลังการทำแห้งแบบพ่นฝอยเท่ากับ 9.28, 8.81 และ 3.38% ตามลำดับ นอกจากนี้อัตราการรอดชีวิตของ B17 หลังการทำแห้งแบบพ่นฝอยขึ้นกับชนิดของสารพาและสารป้องกันเซลล์ พบว่า 15% มอลโทเดกซ์ทรินผสม 5% โมโนโซเดียมกลูตาเมตพามีอัตราการรอดชีวิต (63.48%) สูงที่สุด รองลงมาคือ 20% มอลโทเดกซ์ทริน (8.53%) และ 20% นมผง (7.17%)

หลังการเก็บรักษาผง B17 เป็นเวลา 6 เดือน พบว่าการเก็บที่อุณหภูมิ 4°C มีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าที่ 30°C และการใช้ 15% มอลโทเดกซ์ทรินผสม 5% โมโนโซเดียมกลูตาเมตเป็นสารพามีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุดทั้งที่เก็บที่อุณหภูมิ 4°C และ 30°C เท่ากับ 88.50% และ 84.07% ตามลำดับ ส่วนการใช้ 20% นมผงเป็นสารพามีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่า 20% มอลโทเดกซ์ทรินเมื่อ

เก็บที่อุณหภูมิ 4°C โดยมีค่าเท่ากับ 76.47% และ 71.43% ตามลำดับ และมีอัตราการรอดชีวิตใกล้เคียงกันเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 30°C มีค่าเท่ากับ 14.70% และ 14.81% ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ ระยะเวลาเติบโตของ B17 สารพา สารป้องกันเซลล์ และการเก็บรักษาไม่มีผลต่อกิจกรรมการยับยั้ง VH05

การใช้ผง B17 เป็นหัวเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างง่าย 5 ชนิด ได้แก่ NS, Mo, SF, MSMo และ Coco พบว่าที่ 36 ชั่วโมง มีปริมาณเซลล์ใกล้เคียงกับที่ 24 ชั่วโมง และใกล้เคียงกับ NB โดยมีเซลล์ประมาณ  $10^9$  cfu/ml และยังคงมีกิจกรรมการยับยั้ง VH05 เหมือนเดิม ผง B17 มีค่า MIC เท่ากับ  $10^6$  และ  $10^7$  cfu/ml ที่สามารถยับยั้ง VH05 ที่  $10^2$  และ  $10^4$  cfu/ml ตามลำดับโดยวิธี co-culture

ผลการศึกษาการใช้ *Bacillus* spp. ในสัตว์ทดลองโดยการเติมลงในน้ำให้มีปริมาณเชื้อในน้ำเท่ากับ  $10^5$  cfu/ml ทุกวันเป็นเวลา 28 วัน จากนั้นทำให้กึ่งกลาดำติดโรคด้วย VH05 พบว่ากึ่งกลาดำกลุ่มที่ได้รับ B17, B21 และ B25 มีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่ากลุ่มควบคุม โดยมีค่าเท่ากับ 41.67, 46.67 และ 40.00% ตามลำดับ ส่วนกลุ่มที่ได้รับ B19 มีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับกลุ่มควบคุม มีค่าเท่ากับ 33.33% นอกจากนี้ยังศึกษาผลของ B17, B21 และ B25 ต่อการรอดชีวิตของกึ่งกลาดำ โดยใส่เซลล์ของแบคทีเรียทดสอบในอาหารกึ่งที่ความเข้มข้น  $10^8$  และ  $10^6$  cfu/g

หลังจากทำให้กึ่งติดโรค พบว่ากลุ่มที่ได้รับเชื้อ B17, B21 และ B25 ปริมาณ  $10^8$  cfu/g มีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่า กลุ่มที่ได้รับเชื้อปริมาณ  $10^6$  cfu/g และสูงกว่ากลุ่มควบคุม โดยมีค่าเท่ากับ 58.33-76.92%, 43.75-57.14% และ 30.77% ตามลำดับ จากผลการทดลองจะเห็นว่า B17 มีศักยภาพด้านการยับยั้งเชื้อก่อโรคสูงสุด กลุ่มที่ได้รับ B17 ลดอัตราการตายเหลือ 23.08-42.86% ซึ่งขึ้นกับความเข้มข้นของเชื้อ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีอัตราการตายเท่ากับ 69.23% ผลการทดลองเป็นไปในทำนองเดียวกันกับการใช้ B17 ที่ผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอย พบว่ากึ่งกลาดำมีการรอดชีวิตที่ไม่แตกต่างกัน (70.83-54.55%)

## เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กรมประมง. 2532. สรุปบททวนผลงานวิชาการเรื่องกุ้ง 25-27 มกราคม 2532 ณ สถาบันเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งทะเล จ.สงขลา. กรมประมง. กรุงเทพฯ.
- ชลอ ลิมสุวรรณ. 2543. กุ้งไทย 2000. โรงพิมพ์เจริญรัฐการพิมพ์. กรุงเทพฯ.
- ดอกรัก ชัยสาร, ปารีต๊ะ สาเหาะ, ประดิษฐ์ ตั้งสกุล, นกคณ สุกระกาญจน์ และนุกูล อินทรสังขา. 2547. การศึกษาประสิทธิภาพการมิใช้แบคทีเรียโปรไบโอติกในการควบคุมคุณภาพน้ำในการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล. เอกสารประกอบการประชุมวิชาการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ ครั้งที่ 3. 481-488.
- พรเลิศ จันทร์รัชชกุล, เทอร์นบอด เจ เอฟ และ ชลอ ลิมสุวรรณ. 2537. คู่มือการเลี้ยงและป้องกันโรคกุ้งกุลาดำ. สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ กรมประมง. กรุงเทพฯ.
- ศุภชัย ประพัศพร. 2538. แบคทีเรียในดินบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ และการดื้อของเชื้อ *Vibrio* spp. ต่อยาต้านจุลชีพ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งจันทบุรี, กรมประมง. 2549. การตรวจหาแบคทีเรียบาซิลลัสและแลคโตบาซิลลัสในดิน น้ำ เนื้อกุ้ง ของบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ จังหวัดตราด. เอกสารวิชาการฉบับที่ 44/2549.
- เสาวนีย์ ธรรมสถิต. 2547. แบคทีเรียทางเทคโนโลยีชีวภาพ เซลล์และผลิตภัณฑ์ของเซลล์. สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล. โรงพิมพ์สถาบันพัฒนาสาธารณสุขอาเซียน. นครปฐม.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2545. สถิติการเกษตรของประเทศไทย ปีการเพาะปลูก 2544/2545. เอกสารสถิติการเกษตร เลขที่ 3/2545. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

- Abdelkafi, S., M. Chamkha, L. Casalot, S. Sayadi and M. Labat. 2005. Isolation and characterization of a novel *Bacillus* sp., strain YAS1, capable of transforming tyrosol under hypersaline conditions. **FEMS Microbiol. Lett.** 252: 79-84.
- Ahern, M., S. Verschueren, D. van Sinderen. 2003. Isolation and characterisation of a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* strain B439. **FEMS Microbiol. Lett.** 220: 127-131.
- Alapide-Tendencia, E.V. and L.A. Dureza. 1997 Isolation of *Vibrio* spp. from *Penaeus monodon* (Fabricius) with red disease syndrome. **Aquaculture.** 154: 107-114.
- Alavandi, S.V., K.K. Vijayan, T.C. Santiago, M. Poornima, K.P. Jithendran, S.A. Ali and J.J.S. Rajan. 2004. Evaluation of *Pseudomonas* sp. PM17 on immune indices of tiger shrimp, *Penaeus monodon*. **Fish Shellfish Immunol.** 17: 115-120.
- Amoa-Awua, W.K, N.N. Terlabie, E. Sakyi-Dawson. 2006. Screening of 42 *Bacillus* isolates for ability to ferment soybeans into dawadawa. **Int. J. Food Microbiol.** 106: 343-347.
- Ananta, E., M. Volkert and D. Knorr. 2005. Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. **Int. Dairy J.** 15: 399-409.
- Anthony, T., T. Rajesh, N. Kayalvizhi, P. Gunasekaran. 2009. Influence of medium components and fermentation conditions on the production of bacteriocin(s) by *Bacillus licheniformis* AnBa9. **Biores. Technol.** 100: 872-877.
- Asha-Devi, N. K., K. Balakrishnan, R. Gopal, S. Padmavathy. 2008. *Bacillus clausii* MB9 from the east coast regions of India: Isolation, biochemical characterization and antimicrobial potentials. **Current science.** 95 (5): 627-636.
- Austin, B. 1988. **Methods in aquatic bacteriology.** Wiley, Chichester.

- Baffone, W., B. Citterio, E. Vittoria, A. Casaroli, A. Pianetti, R. Campana and F. Bruscolini. 2001. Determination of several potential virulence factors in *Vibrio* spp. isolated from seawater. **Food Microbiol.** 18: 479-488.
- Balcazar, J.L., I. de Blas, I. Ruiz-Zarzuela, D. Cunningham, D. Vendrell and J.L. Muzquiz. 2006. The role of probiotics in aquaculture. **Vet. M.** 114: 173-186.
- Balcazar, J.L., D. Vendrell, I. de Blas, I. Ruiz-Zarzuela, O. Girones, J.L. Muzquiz. 2007a. In vitro competitive adhesion and production of antagonistic compounds by lactic acid bacteria against fish pathogens. **Vet. Microb.** 122: 373–380.
- Balcazar, J.L., T. Rojas-Luna, D.P. Cunningham. 2007b. Effect of the addition of four potential probiotic strains on the survival of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following immersion challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. **J. Invertebrate Patho.** 96: 147-150.
- Balcazar, J.L., D. Vendrell, I. de Blas, I. Ruiz-Zarzuela, O. Girones, J.L. Muzquiz. 2007c. In vitro competitive adhesion and production of antagonistic compounds by lactic acid bacteria against fish pathogens. **Vet. Microb.** 122: 373–380.
- Barboza-Corona, J.E., N. de la Fuente-Salcido, N. Alva-Murillo, A. Ochoa-Zarzosa, J.E. Lopez-Meza. 2009. Activity of bacteriocins synthesized by *Bacillus thuringiensis* against *Staphylococcus aureus* isolates associated to bovine mastitis. **Vet. Microb.** 138: 179–183.
- Belghith, H., S.E. Chaabouni and A. Gargouri. 2001. Stabilization of *Penicillium occitanis* cellulases by spray drying in presence of Maltodextrin. **Enzyme Microb. Technol.** 28: 253–258.

- Berkeley, R., M. Heyndrickx, N. Logan, P. De Vos. 2002. **Applications and systematics of *Bacillus* and relatives**. Blackwell science Ltd. UK.
- Bhaskar, N., E.S. Sudeepa, H.N. Rashmi, A. Tamil Selvi. Partial purification and characterization of protease of *Bacillus proteolyticus* CFR3001 isolated from fish processing waste and its antibacterial activities. **Biores. Technol.** 98: 2758–2764.
- Boza, Y., D. Barbin, A.R.P. Scamparini. 2004. Effect of spray-drying on the quality of encapsulated cells of *Beijerinckia* sp. **Process Biochem.** 39: 1275–1284.
- Byrne, B., G. Dunne, D.J. Bolton. 2006. Thermal inactivation of *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* vegetative cells and spores in pork luncheon roll. **Food Microb.** 23: 803–808.
- Carvalho, A.S., J. Silva, P. Ho, P. Teixeira, F.X. Malcata, P. Gibbs. 2004. Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. **Int. Dairy Journal.** 14: 835–847.
- Castex, M., L. Chim, D. Pham, P. Lemaire, N. Wabete, J.L. Nicolas, P. Schmidely, C. Mariojouis. 2008. Probiotic *P. acidilactici* application in shrimp *Litopenaeus stylirostris* culture subject to vibriosis in New Caledonia. **Aquaculture.** 275: 182–193.
- Castex, M., P. Lemaire, N. Wabete, L. Chim. 2009. Effect of dietary probiotic *Pediococcus acidilactici* on antioxidant defences and oxidative stress status of shrimp *Litopenaeus stylirostris*. **Aquaculture.** 294: 306–313.
- Chythanya R., I. Karunasagar and I. Karunasagar. 2002. Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by a marine *Pseudomonas* I-2. **Aquaculture.** 208: 1-10.
- Cladera-Olivera, F., G.R. Caron and A. Brandelli. 2004a. Bacteriocin-like substance production by *Bacillus licheniformis* strain P40. **Lett. Appl. Microbiol.** 38: 251-256.

- Claessens, J., Y. van Lith, A.M. Laverman, P. Van Cappellen. 2006. Acid–base activity of live bacteria: Implications for quantifying cell wall charge. **Geoc. et Cos. Acta.** 70: 267–276.
- Corbanie, E.A., J.P. Remon, K. Van Reeth, W.J.M. Landman, J.H.H. van Eck, C. Vervaet. 2007. Spray drying of an attenuated live Newcastle disease vaccine virus intended for respiratory mass vaccination of poultry. **Vaccine.** 25: 8306–8317.
- Cordova-Murueta, J.H., F.L. Garcia-Carreno. 2002. Nutritive value of squid and hydrolyzed protein supplement in shrimp feed. **Aquaculture.** 210: 371–384.
- Daw, M.A., F.R. Falkiner. 1996. Bacteriocins: Nature, Function and Structure. **Micron.** 27 (6): 467-479.
- Deeseenthum, S., V. Leelavatcharamas, J.D. Brooks. 2007. Effect of feeding *Bacillus* spp. as probiotic bacteria on growth of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). **J. Biol. Sci.** 10 (9): 1481-1485.
- Defoirdt, T., N. Boon, P. Sorgeloos, W. Verstraete and P. Bossier. 2007. Alternatives to antibiotics to control bacterial infections: luminescent vibriosis in aquaculture as an example. **Trends in Biotech.** 25 (10): 472-479.
- Desmond, C., C. Stanton, G.F. Fitzgerald, K. Collins and R.P. Ross. 2002. Environmental adaptation of probiotic lactobacilli towards improvement of performance during spray drying. **Int. Dairy J.** 12 (2-3): 183-190.
- Devaraja, T.N., F.M. Yusoff and M. Shariff. 2002. Changes in bacterial populations and shrimp production in ponds treated with commercial microbial products. **Aquaculture.** 206: 245-256.

- Dharmsthiti, S. C., S. Pantuwatana, A. Bhumiratana. 1985. Poduction of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* strain 1593 on media using a byproduct from monosodium glutamate factory. **J. of Invertebrate Patho.** 46 (3): 231-238.
- Douglas, L. M., J.K. Odame-Darkwah. 1995. Influence of pH and NaCl on growth and survival of *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*, *Bacillus pumilus*, and *Saccharomyces cerevisiae* in broth media. **Lebensm. Wiss. u. Technol.** 28: 222-226.
- Duc, L.H., H.A. Hong, T.M. Barbosa, A.O. Henriques and S.M. Cutting. 2004. Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use. **Appl. Environ. Microbiol.** 70 (4): 2161-2171.
- Elkordy, A.A., R.T. Forbes and B.W. Barry. 2004. Stability of crystallized and spray-dried lysozyme. **Int. J. Pharm.** 278: 209-219.
- Encinas, J.P, J. Sanz-Gbmez, M.L. Garcia-Lbpez, M.R. Garcia-Armesto, A.Otero. 1996. Evaluation of Different Systems for the Identification of *Bacillus* Strains Isolated from Spanish Fermented Sausages. **Meat Sci.** 42 (2): 127-131.
- FAO/WHO. 2001. Evaluation of health and nutritional properties of powder milk with live lactic acid bacteria. **Report from FAO/WHO expert consultation.** 1-4.
- Fukamizo, T., T. Ohkawa, Y. Ikeda and S. Goto. 1994. Specificity of chitosanase from *Bacillus pumilus*. **Bioc. et Biop. A.** 1205 (2): 183-188.
- Fuller, R., 1989. Probiotics in man and animals. **J. Appl. Bact.** 66: 365-378.
- Gardiner, G., E. O' Sullivan, J. Kelly, M.A.E. Auty, G.F. Fitzgerald, J.K. Collins, R.P. Ross, and C. Stanton. 2000. Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus*

- paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray drying. **Appl. Environ. Microbiol.** 66 (6): 2605-2612.
- Gardiner, G.E., P. Bouchier, E. O'Sullivan, J. Kelly, J.K. Collins, G. Fitzgerald, R.P. Ross and C. Stanton. 2002. A spray-dried culture for probiotic Cheddar cheese manufacture. **Int. Dairy J.** 12: 749–756.
- Gatesoupe, F.J. 1999. The use of probiotics in aquaculture. **Aquaculture.** 180: 147-165.
- George, S., V. Raju, V. Krishnan, T.V. Subramanain and K. Jayaraman. 1995. Production of protease by *Bacillus amyloliquefaceins* in solid-state fermentation and its application in the unhairing of hides and skins. **Process Biochem.** 30 (5): 457-462.
- Ghribi, D., N. Zouari, W. Trigui, S. Jaoua. Use of sea water as salts source in starch and soya bean-based media for the production of *Bacillus thuringiensis* bioinsecticides. **Process Biochem.** 42: 374–378.
- Gomez-Gil, B., A. Roque and J.F. Turnbull. 2000. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. **Aquaculture.** 191: 259-240.
- Gomez, R.G., J.L. Balcazar and S. MA. 2007. Probiotic as control agents in aquaculture. **J. Ocean U. Cina.** 6 (1): 76-79.
- Gopal, S., S.K. Otta, S. Kumar, I. Karunasagar, M. Nishibuchi and I. Karunasagar. 2005. The occurrence of *Vibrio* species in tropical shrimp culture environments; implications for food safety. **Int. J. Food Microbiol.** 102: 151-159.
- Gouda, M.K., A.E. Swellam and S.H. Omar. 2001. Production of PHB by *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources. **Microbiol. Res.** 156: 201-207.

- Green, D.H., P.R. Wakeley, A. Page, A. Barnes, L. Baccigalupi, E. Ricca and S.M. Cutting. 1999. Characterization of two *Bacillus* probiotics. **Appl. Environ. Microbiol.** 65 (9) : 4288-4291.
- Gullian, M., F. Thompson and J. Rodriguez. 2004. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. **Aquaculture.** 233: 1-14.
- Hai, N.V, R. Fotedar, N. Buller. 2007. Selection of probiotics by various inhibition test methods for use in the culture of western king prawns, *Penaeus latisulcatus* (Kishinouye). **Aquaculture.** 272: 231-239.
- Hamsupo, K, P. Sukyai, G. Loiseau, S. Nitisinprasert, D. Montet, P. Wanchaitanawong. 2005a. Prediction on the Stability of Spray-Dried *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 by Arrhenius Equation for Long-Term Storage. **J. Microbiol. Biotech.** 15 (6): 1178-1182.
- Hamsupo, K., P. Sukyai, S. Nitisinprasert, P. Wanchaitanawong. 2005b. Different Growth Media and Growth Phases Affecting on Spray Drying and Freeze Drying of *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5. **Kasetsart J. (Nat. Sci.).** 39: 718-724.
- Harwood, C.R. 1989. **Bacillus : Biotechnology handbook Volume 2.** Plenum Press, New York.
- Hosseini, H., A.M. Cheraghali, R. Yalfani and V. Razavilar. 2004. Incidence of *Vibrio* spp. In shrimp caught off the south coast of Iran. **Food Contr.** 15: 187-190.
- Huitric, M.,C. Folke and N. Kautsky. 2002. Development and government policies of the shrimp farming industry in Thailand in relation to mangrove ecosystems. **Ecolo. Econo.** 40: 441–455.
- Hyesook, K, Y. YI, G.J. CHOI, K.Y. CHO, Y. LIM. 2006. Antifungal Activity of *Bacillus* sp. Against *Phytophthora infestans*. **J. Microbiol. Biotech.** 16 (3): 487-490.

- Immanuel, G., V.C. Vincybai, V. Sivaram, A. Palavesam, M.P. Marian. 2004. Effect of butanolic extracts from terrestrial herbs and seaweeds on the survival, growth and pathogen (*Vibrio parahaemolyticus*) load on shrimp *Penaeus indicus* juveniles. **Aquaculture**. 236: 53–65.
- Indyk, H., V. Littlejohn and D. C. Woollard. 1996. Stability of vitamin D3 during spray-drying of milk. **Food Chem.** 57 (2): 283-286.
- Ingraham, J.L. and C.A. Ingraham. 2000. **Introduction to microbiology**. Second edition. Brooks/Cole, Australia.
- Itami, T., M. Asano, K. Tokushige, K. Kubono, A. Nakagawa, N. Takeno, H. Nishimura, M. Maeda, M. Kondo and Y. Takahashi. 1998. Enhancement of disease resistance of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, after oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. **Aquaculture**. 164: 277-288.
- Jaouadi, B., S. Ellouz-Chaabouni, M. Rhimi, S. Bejar. Biochemical and molecular characterization of a detergent stable serine alkaline protease from *Bacillus pumilus* CBS with high catalytic efficiency. **Biochem.** 90: 1291-1305.
- Johnvesly, B, G.R. Naik. 2001. Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium. **Process Biochem.** 37: 139-144.
- Jung, Y.J., J.K. Lee, C.G. Sung, T.K. Oh and H.K. Kim. 2003. Nonionic detergent-induced activation of an esterase from *Bacillus megaterium* 20-1. **J. Mol. Catal. B Enzym.** 26: 223-229.
- Kamra, D. N., S. K. Srivastava. 1991. Effect of organic acids and ensiling of cattle dung on the growth of *Clostridium perfringens*. **Biores. Technol.** 37: 115-119.

- Kearney, N., X.C. Meng, C. Stanton, J. Kelly, G.F. Fitzgerald, R.P. Ross. 2009. Development of a spray dried probiotic yoghurt containing *Lactobacillus paracasei* NFBC 338. **Int. Dairy J.** 1–6.
- Kim, E.H.J., X.D. Chen and D. Pearce. 2002. Surface characterization of four industrial spray-dried dairy powders in relation to chemical composition, structure and wetting property. **Colloids Surf. B Bioint.** 26: 197–212.
- Kim, E.H.-J, X.D. Chen and D. Pearee. 2005. Effect of surface composition on the flowability of industrial spray-dried dairy powders. **Colloids Surf. B Bioint.** 46: 182-187.
- Kubo, M., J. Hiroe, M. Murakami, H. Fukami and T. Tachiki. 2001. Treatment of hypersaline-containing wastewater with salt-tolerant microorganisms. **J. Biosci. Bioeng.** 91 (2): 222-224.
- Kulpreecha, S., A. Boonruangthavorn, B. Meksiriporn, N. Thongchul. 2009. Inexpensive fed-batch cultivation for high poly(3-hydroxybutyrate) production by a new isolate of *Bacillus megaterium*. **J. Biosci. Bioeng.** 107 (3): 240–245.
- Kumar, C.G. 2002. Purification and characterization of a thermostable alkaline protease from alkalophilic *Bacillus pumilus*. **Lett. Appl. Microbiol.** 34: 13-17.
- Laurent, Y., S. Arino, L. Rosso. 1999. A quantitative approach for studying the effect of heat treatment conditions on resistance and recovery of *Bacillus cereus* spores. **Int. J. Food Microb.** 48: 149–157.
- Leano, E. M., C.R. Lavilla-Pitogo and M. G. Paner. 1998. Bacterial flora in the hepatopancreas of pond-reared *Penaeus monodon* juveniles with luminous vibriosis. **Aquaculture.** 164: 367-374.

- Lee, K.K., S.R. Yu and P.C. Liu. 1997. Alkaline serine protease is an exotoxin of *Vibrio alginolyticus* in Kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. **Current Microbiol.** 34: 110-117.
- Lee, K.K., Y.L. Chen and P.C. Liu. 1999. Hemostasis of tiger prawn *Penaeus monodon* affected by *Vibrio harveyi*, extracellular products, and toxic cysteine protease. **Blood cells Dis.** 25 (13): 180-192.
- Lee, K.K., S.R. Yu, F.R. Chen, T.I. Yang and P.C. Liu. 1996. Virulence of *Vibrio alginolyticus* Isolated from Diseased Tiger Prawn, *Penaeus monodon*. **Current Microbiol.** 32: 229-231.
- Leung, P.S., C. Engle. 2006. **Shrimp culture: economic, market and trade.** Blackwell publishing, USA.
- Li, J., B. Tan, K. Mai, Q. Ai, W. Zhang, W. Xu, Z. Liufu and H. Ma. 2006. Comparative study between probiotic bacterium *Arthrobacter* XE-7 and chloramphenicol on protection of *Penaeus chinensis* post-larvae from pathogenic vibrios. **Aquaculture.** 253: 140-147.
- Li, J., B. Tan, K. Mai. 2009. Dietary probiotic *Bacillus* OJ and isomaltooligosaccharides influence the intestine microbial populations, immune responses and resistance to white spot syndrome virus in shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Aquaculture.** 291: 35-40.
- Lian, W.C., H.C. Hsiao and C.C. Chou. 2002. Survival of bifidobacteria after spray-drying. **Int. J. Food Microbiol.** 74: 79-86.
- Lima, V.M.G., N. Krieger, D.A. Mitchell, J.C. Baratti, I. de Filippis and J.D. Fontana. 2004. Evaluation of the potential for use in biocatalysis of a lipase from a wild strain of *Bacillus megaterium*. **J. Mol. Catal. B Enzym.** 31: 53-61.
- Liu, P.C., K.K. Lee, K.C. Yü, G.H. Kou and S.N. Chen. 1996. Isolation of *Vibrio harveyi* from disease kuruma prawns *Penaeus japonicus*. **Current Microbiol.** 33: 129-132.

- Liu, P.C., K.K. Lee, C.C. Tu and S.N. Chen. 1997. Purification and characterization of a cysteine protease produced by pathogenic luminous *Vibrio harveyi*. **Current Microbiol.** 35: 32-39.
- Lorca, G.L., G.F. de Valdez. 1999. The effect of suboptimal growth temperature and growth phase on resistance of *Lactobacillus acidophilus* to environmental stress. **Cryobiology.** 39: 144-149.
- Luna-Solano, G., M.A. Salgado-Cervantes, G.C. Rodriguez-Jimenes, M.A. Garcia-Alvarado. 2005. Optimization of brewer's yeast spray drying process. **J. Food Eng.** 68: 9-18.
- Lyver, A., J.P. Smith, J. Austin and B. Blanchfield. 1998. Competitive inhibition of *Clostridium botulinum* type E by *Bacillus* species in a value-added seafood product packaged under a modified atmosphere. **Food Res. Int.** 31 (4): 311-319.
- Mabrouk, S.S., A.M. Hashem, N.M.A. El-Shayeb, A.-M.S. Ismail, A.F. Abdel-Fattah. 1999. Optimization of alkaline protease productivity by *Bacilluslicheniformis* ATCC 21415. **Biores. Tech.** 69: 155-159.
- Maketon, M and K. Masawang. 2004. Efficacies of some beneficial bacteria on the colonization and inhibition of *Vibrio harveyi* in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) larvae. **Kasetsart J. (Nat. Sci.)**. 38: 393-399.
- Makras, L., L. De Vuyst. 2006. The in vitro inhibition of Gram-negative pathogenic bacteria by bifidobacteria is caused by the production of organic acids. **Int. Dairy Journal.** 16: 1049-1057.
- Mari, M, M. Guizzardi, M. Brunelli, A. Folchi. 1996. Postharvest biological control of grey mould (*Botrytis cinerea* Pers.: Fr.) on fresh-market tomatoes with *Bacillus amyloliquefacien*. **Crop Prot.** 15 (8): 699-705.

- Marshall, D.L. and J.K. Odame-Darkwah. 1995. Influence of pH and NaCl on growth and survival of *Propionibacterium frudenreichii* subsp. *shermanii*, *Bacillus pumilus*, and *Saccharomyces cerevisiae* in broth media. **Lebensm. Wiss. U. Technol.** 28: 222-226.
- Mauriello, G., M. Aponte, R. Andolfi, G. Moschetti and F. Villani. 1999. Spray-drying of bacteriocin-producing Lactic Acid Bacteria. **J. Food Prot.** 62 (7): 773-777.
- Mayo, A.W., T. Noike. 1996. Effects of temperature and pH on the growth of heterotrophic bacteria in waste stabilization ponds. **Wat. Res.** 30 (2): 447-455.
- Meng, X.C., C. Stanton, G.F. Fitzgerald, C. Daly, R.P. Ross. 2008. Anhydrobiotics: The challenges of drying probiotic cultures. **Food Chem.** 106: 1406–1416.
- Meunpol, O., K. Lopinyosiri and P. Menasveta. 2003. The effect of ozone and probiotics on the survival of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Aquaculture.** 220: 437-448.
- Michelson, T., K. Kask, E. Jogi, E. Talpsep, I. Suitso, A. Nurka. L(+)-Lactic acid producer *Bacillus coagulans* SIM-7 DSM 14043 and its comparison with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* DSM 20073. **Enzyme Microb. Technol.** 39: 861–867.
- Millqvist-Fureby, A., M. Malmsten and B. Bergenstahl. 1999. Spray-drying of trypsin surface characterisation and activity preservation. **Int. J. Pharm.** 188 (2): 243-253.
- Moita, C., S.S. Feio, L. Nunes, M.J.M. Curto, J.C. Roseiro. 2005. Optimisation of physical factors on the production of active metabolites by *Bacillus subtilis* 355 against wood surface contaminant fungi. **Int. Biodeter. Biodegrad.** 55: 261–269.
- Montville, T.J., K. Winkowski, R.D. Ludescher. 1995. Models and Mechanisms for Bacteriocin Action and Application. **Int. Dairy Journal.** 5: 797-814.

- Morgan, C.A., N. Herman, P.A. White, G. Vesey. 2006. Preservation of micro-organisms by drying: A review. **J. Microb. Methods.** 66: 183–193.
- Moriarty, D.J.W. 1997. The role of microorganisms in aquaculture ponds. **Aquaculture.** 151:333-349.
- Moriarty, D.J.W. 1998. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. **Aquaculture.** 164 : 351-358.
- Moriarty, D.J.W. 1999. Disease Control in Shrimp Aquaculture with Probiotic Bacteria, particularly the Microbial interactions in Aquaculture. In: C.R. Bell, M. Brylinsky and P. Johnson-Green(eds.), **Microbial Biosystems:New Frontiers, Proceedings of the 8<sup>th</sup> International Symposium on Microbial Ecology.** Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada.
- Morcel, C., and K. Biedermann. 1994. Coupling of fermentation and microfiltration for  $\alpha$ -amylase production from *Bacillus amyloliquefaciens*. **FEMS Microbiol. Rev.** 14 (1): 57-61.
- Mujumdar, A.S. 2004. **Guide to industrial drying: Principles, equipment and new developments.** Vindhya press, Mumbai.
- Mukerjea, R, G. Slocum, R. Mukerjea, J.F. Robyt. 2006. Significant differences in the activities of  $\alpha$ -amylases in the absence and presence of polyethylene glycol assayed on eight starches solubilized by two methods. **Carbohydrate Res.** 341: 2049-2054.
- Nakajima-Kambe, T., M. Shimomura, N. Nomura, T. Chanpornpong, T. Nakahara. 1999. Decolorization of Molasses Wastewater by *Bacillus* sp. under thermophilic and anaerobic conditions. **J. Biosci. Bioeng.** 87 (1): 119-121.

- Nekolny, D. and J. Chaloupka. 2000. Protein catabolism in growing *Bacillus megaterium* during adaptation to salt stress. **FEMS Microbiol. Lett.** 182: 173-177.
- Nijdam, J.J. and T.A.G. Langrish. 2006. The effect of surface composition on the functional properties of milk powders. **J. Food Eng.** 77: 919-925.
- Nikoskelainen, S, A.C. Ouwehand, G. Bylund, S. Salminen, E.M. Lilius. 2003. Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). **Fish Shellfish Immunol.** 15: 443-452.
- Ochoa-Solano, J.L. and J. Olmos-Soto. 2006. The functional property of *Bacillus* for shrimp feeds. **Food Microbiol.** 23: 519-525.
- Oggioni, M.R., A. Ciabattini, A.M. Cuppone, G. Pozzi. 2003. *Bacillus* spores for vaccine delivery. **Vaccine.** 21: 96-101.
- Ohara, H., M. Yahata. 1996. L-Lactic acid production by *Bacillus* sp. in anaerobic and aerobic culture. **J. Ferm. Bioeng.** 81 (3): 272-274.
- O'Riordan, K, D. Andrews, K. Buckle, P. Conway. 2001. Evaluation of microencapsulation of a *Bifidobacterium* strain with starch as an approach to prolonging viability during storage. **J. Appl. Microbiol.** 91: 1059-1066.
- Ottaviani, D., I. Bacchiocchi, L. Masini, F. Leoni, A. Carraturo, M. Giammarioli, G. Sbaraglia. 2001. Antimicrobial susceptibility of potentially pathogenic halophilic vibrios isolated from seafood. **Int. J. Antimicrob. Agents.** 18: 135-140.
- Palomino, M.M., C. Sanchez-Rivas, S.M. Ruzal. 2009. High salt stress in *Bacillus subtilis*: involvement of PBP4 as a peptidoglycan hydrolase. **Res. Microb.** 160: 117-124.

- Panoff, J. M., B. Thammavongs, M. Gueguen. 2000. Cryoprotectants lead to phenotypic adaptation to freeze–thaw stress in *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CIP 101027T. **Cryobiology**. 40: 264-269.
- Patel, A.K., J.J. Ahire, S.P. Pawar, B.L. Chaudhari, S.B. Chincholkar. Comparative accounts of probiotic characteristics of *Bacillus* spp. isolated from food wastes. **Food Res. Int.** 42: 505-510.
- Patel, R., M. Dodia and S.P. Singh. 2005. Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp.: production and optimization. **Process Biochem.** 40:3569-3575.
- Paul H.I.V., P.S.S. Soentoro, S.H.W. Notermans. 1993. Properties of *Bacillus cereus* spores in reference materials prepared from artificially contaminated spray dried milk. **Int. J. Food Microb.** 20: 23-36.
- Payot, T., Z. Chemaly and M. Fick. 1999. Lactic acid production by *Bacillus coagulans*-kinetic studies and optimization of culture medium for batch and continuous fermentations. **Enzyme Microb. Technol.** 24: 191-199.
- Pereira, P, A. Nesci, M. Etcheverry. 2007. Effects of biocontrol agents on *Fusarium verticillioides* count and fumonisin content in the maize agroecosystem: Impact on rhizospheric bacterial and fungal groups. **Biol. Contr.** 42: 281-287.
- Peterson, B., K. Stovall, P. Monian, J.L. Franklin, B.S. Cummings. 2008. Alterations in phospholipid and fatty acid lipid profiles in primary neocortical cells during oxidant-induced cell injury. **Chem.-Biol. Interact.** 174: 163–176.
- Pisecky, J. 2005. Spray drying in the cheese industry. **Int. Dairy J.** 15: 531-536.

- Prabakaran, G., K. Balaraman, S.L. Hoti, A.M. Manonmani. 2007. A cost-effective medium for the large-scale production of *Bacillus sphaericus* H5a5b (VCRC B42) for mosquito control. **Biol. Contr.** 41: 379–383.
- Prabakaran, G., S.L. Hoti, A.M. Manonmani, K. Balaraman. 2008. Coconut water as a cheap source for the production of endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, a mosquito control agent. **Acta Tropica.** 105: 35-38.
- Priest, F.G. 1977. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. **Bact. Rev.** Sept : 711-753.
- Purivirojkul, W., N. Areechon, P. Srisapoome. 2006a. The effect of peptidoglycan on immune response in black tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius). **Kasetsart J. (Nat. Sci.)** 40: 181-187.
- Purivirojkul, W., N. Areechon, P. Srisapoome, M. Maketon. 2006b. Competition on Using Nutrient for Growth between *Bacillus* spp. and *Vibrio harveyi*. **Kasetsart J. (Nat. Sci.)** 40: 499- 506.
- Purivirojkul, W., M. Maketon and N. Areechon. 2005. Probiotic Properties of *Bacillus pumilus*, *Bacillus sphaericus* and *Bacillus subtilis* in Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius) Culture. **Kasetsart J. (Nat. Sci.)** 39: 262 – 273.
- Purivirojkul, W. and N. Areechon. 2007. Application of *Bacillus* spp. Isolated from the Intestine of Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius) from Natural Habitat for Control Pathogenic Bacteria in Aquaculture. **Kasetsart J. (Nat. Sci.)** 41: 125-132.
- Rajakumara, E., P. Acharya, S. Ahmad, R. Sankaranaryanan, N.M. Rao. 2008. Structural basis for the remarkable stability of *Bacillus subtilis* lipase (Lip A) at low pH. **Biochem. et Biophys. Acta.** 1784: 302–311.

- Raso, J., A. Palop, M. Bayarte, S. Condon, F. J. Sala. 1995. Influence of sporulation temperature on the heat resistance of a strain of *Bacillus licheniformis* (Spanish Type Culture Collection 4523). **Food Microb.** 12: 357-361.
- Rattanachuary, P., D. Kantachote, P. Suntainalert. 2007. Selection of proteolytic bacteria with ability to inhibit *Vibrio harveyi* during white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) cultivation. **Songklanakarin J. Sci. Technol.** 29 (2): 235-243.
- Rengpipat, S., S. Rukpratanporn, S. Piyatiratitivorakul and P. Menasaveta. 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp *Penaeus monodon* by a probiont bacterium *Bacillus* S11. **Aquaculture.** 191: 271-288.
- Rengpipat, S., W. Phianphak, S. Piyatiratitivorakul, P. Menasveta. 1998. Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. **Aquaculture.** 167: 301–313.
- Robertson, P.A.W, C. O’Dowd, C. Burrells, P. Williams, B. Austin. 2000. Use of *Carnobacterium* sp. as a probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). **Aquaculture.** 185: 235-243.
- Rodrigues, L.R., J.A. Teixeira, R. Oliveira. 2006. Low-cost fermentative medium for biosurfactant production by probiotic bacteria. **Biochem. Eng. J.** 32: 135–142.
- Rodriguez-Huezo, M.E., R. Duran-Lugo, L.A. Prado-Barragan, F. Cruz-Sosa , C. Lobato-Calleros, J. Alvarez-Ramirez, E.J. Vernon-Carter. 2007. Pre-selection of protective colloids for enhanced viability of *Bifidobacterium bifidum* following spray-drying and storage, and evaluation of aguamiel as thermoprotective prebiotic. **Food Res. Int.** 40: 1299–1306.

- Rout, R.K., S. Bandyopadhyay. 1999. A comparative study of shrimp feed pellets processed through cooking extruder and meat mincer. **Aquacult. Eng.** 19: 71–79.
- Saint-Pierre-Chazalet, M., J. Plasek, I. Konopasek. 2002. A monolayer study of properties of isolated membrane phospholipids of *Bacillus subtilis*. **Colloids and Surfaces B: Biointer.** 23: 43–49.
- Sakai, K., T. Yamanam. 2006. Thermotolerant *Bacillus licheniformis* TY7 produces optically active L-lactic acid from kitchen refuse under open condition. **J. Biosci. Bioeng.** 102 (2): 132-134.
- Salinas, I., A. Cuesta, M.A Esteban, J. Meseguer. 2005. Dietary administration of *Lactobacillus delbrueckii* and *Bacillus subtilis*, single or combined, on gilthead seabream cellular innate immune responses. **Fish Shellfish Immunol.** 19: 67-77.
- Sandril, C., F. Peypeux, G. Michel. 1990. Coproduction of surfactin and iturin A, lipopeptides with surfactant and antifungal properties by *Bacillus subtilis*. **Biotechnol Appl. Biochem.** 12: 370-375.
- Santivarangkna, C., B. Higl, P. Foerst. 2008. Protection mechanisms of sugars during different stages of preparation process of dried lactic acid starter cultures. **Food Microbiol.** 25: 429–441.
- Saulnier, D., P. Haffner, C. Goarant, P. Levy and D. Ansquer. 2000. Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review. **Aquaculture.** 191: 133-144.
- Sellami-Kamoun, A., A. Haddar, N. El-Hadj Ali, B. Ghorbel-Frikha, S. Kanoun, M. Nasri. 2008. Stability of thermostable alkaline protease from *Bacillus licheniformis* RP1 in commercial solid laundry detergent formulations. **Microbiol. Res.** 163: 299-306.

- Sen, R. and K.S. Babub. 2005. Modeling and optimization of the process conditions for biomass production and sporulation of a probiotic culture. **Process Biochem.** 40: 2531–2538.
- Shikha, A.S, N.S. Darmwal. 2007. Improved production of alkaline protease from a mutant of alkalophilic *Bacillus pantotheneticus* using molasses as a substrate. **Bioresource Technol.** 98 (4): 881-885.
- Shivanand, P., G. Jayaraman. 2009. Production of extracellular protease from halotolerant bacterium, *Bacillus aquimaris* strain VITP4 isolated from Kumta coast. **Process Biochem.** 44: 1088–1094.
- Sivarama, V., M.M. Babua, G. Immanuela, S. Murugadassa, T. Citarasub, M.P. Mariana. 2004. Growth and immune response of juvenile greasy groupers (*Epinephelus tauvina*) fed with herbal antibacterial active principle supplemented diets against *Vibrio harveyi* infections. **Aquaculture.** 237: 9–20.
- Smith, P.T. 1999. **Coastal Shrimp Aquaculture in Thailand : Key Issues for Research.** Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra.
- Sonenshein, A.L., J.A. Hoch, R. Losick. 1993. **Bacillus subtilis and other gram positive bacteria: biochemical, physiology and molecular genetics.** American society for microbiology. USA.
- Sudheesh, P.S. and H.S. Xu. 2001. Pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* in tiger prawn *Penaeus monodon* Fabricius: possible role of extracellular proteases. **Aquaculture.** 196: 37-46.
- Sugita, H., Y. Hirose, N. Matsuo and Y. Deguchi. 1998. Production of the antibacterial substance by *Bacillus* sp. strain NM 12, an intestinal bacterium of Japanese coastal fish. **Aquaculture.** 165: 269-280.

- Sung, H.H., H.C. Li, F.M. Tsai, Y.Y. Ting and W.L. Chao. 1999. changes in composition of *Vibrio* communities in pond water during tiger shrimp (*Penaeus monodon*) cultivation and in the hepatopancreas of healthy and diseased shrimp. **J. Exper. Marine Biol. Ecol.** 236: 261-271.
- Sung, H.H., S.F. Hsu, C.K. Chen, Y.Y. Ting and W.L. Chao. 2001. Relationships between disease outbreak in cultured tiger shrimp *Penaeus monodon* and the composition of *Vibrio* communities in pond water and shrimp hepatopancreas during cultivation. **Aquaculture.** 192: 101-110.
- Sunny-Roberts, E.O and D. Knorr. 2009. The protective effect of monosodium glutamate on survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus rhamnosus* E-97800 (E800) strains during spray-drying and storage in trehalose-containing powders. **Int. Dairy J.** 19: 209–214.
- Syu, M.J. and Y.H. Chen. 1997. A study on the  $\alpha$ -amylase fermentation performed by *Bacillus amyloliquefaciens*. **Chem. Eng. J.** 65: 237-247.
- Teixeira, P.C., M.H. Castro and R.M. Kirby. 1995. Death kinetics of *Lactobacillus bulgaricus* in a spray drying process. **J. Food Prot.** 57 (8): 934-936.
- Teixeira, M.L., F. Cladera-Olivera, J. dos Santos, A. Brandelli. 2009. Purification and characterization of a peptide from *Bacillus licheniformis* showing dual antimicrobial and emulsifying activities. **Food Res. Int.** 42: 63–68.
- Thennarasu, S., D.K. Lee, A. Poona, K.E. Kawulka, J.C. Vederas, A. Ramamoorthy. 2005. Membrane permeabilization, orientation, and antimicrobial mechanism of subtilisin A. **Chemis. Phys. Lipids.** 137: 38–51.

- Tseng, D.Y., P.L. Ho, S.Y. Huang, S.C. Cheng, Y.-L. Shiu, C.S. Chiu, C.H. Liu. 2009. Enhancement of immunity and disease resistance in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by the probiotic, *Bacillus subtilis* E20. **Fish Shellfish Immunol.** 26: 339–344.
- Tsuji, Y., Y. Nakajima, K. Homma, S. Natori. 1998. Antibacterial activity of a novel 26-kDa serine protease in the yellow body of *Sarcophaga peregrina*. **FEBS Lett.** 425: 131-133.
- van de Vossenberg, J.L.C.M., A.J.M. Driessen, M.S. da Costa. Homeostasis of the membrane proton permeability in *Bacillus subtilis* grown at different temperatures. **Biochem. et Biophys. Acta.** 1419: 97-104.
- Varnam, A.H. 2000. **Environmental microbiology.** Manson, London.
- Vaseeharan, B. and P. Ramasamy. 2003. Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Lett. Appl. Microbiol.** 36: 83-87.
- Vasiljevic, T. and P. Jelen. 2003. Drying and storage of crude galactosidase extracts from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* 11842. **Innov. Food Sci. Emer. Technol.** 4: 319-329.
- Verschuere, L., G. Rombaut, P. Sorgeloos and W. Verstraete. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 64 (4): 655-671.
- Vijayan, K.K., I.S.B. Singh, N.S. Jayaprakash, S.V. Alavandi, S.S. Pai, R. Preetha, J.J.S. Rajan and T.C. Santiago. 2006. A brackishwater isolate of *Pseudomonas* PS-102, a potential antagonistic bacterium against pathogenic vibrios in penaeid and non penaeid rearing systems. **Aquaculture.** 251: 192-200.

- Villamil, L., A. Figueras, M. Planas and B. Novoa. 2003. Control of *Vibrio alginolyticus* in Artemia culture by treatment with bacterial probiotics. **Aquaculture**. 219: 43-56.
- Waites, M.J., N.L. Morgan, J.S. Rockey and G. Higton. 2001. **Industrial microbiology: an introduction**. Blackwell science Ltd., London.
- Walker, T.S. 1998. **Microbiology**. W.B. Saunders, Philadelphia.
- Walter, E.H.M., D.Y. Kabuki, L.M.R. Esper, A.S. Sant, A.Y. Kuaye. 2009. Modelling the growth of *Listeria monocytogenes* in fresh green coconut (*Cocos nucifera*) water. **Food Microb.** 26: 653–657.
- Wang, Y.B. 2007. Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*. **Aquaculture**. 269: 259-264.
- Wang, Y-B, J-R Li and J. Lin. 2008. Probiotics in aquaculture: Challenges and outlook. **Aquaculture**. 281: 1–4.
- Wang, Y.C., R.C. Yu and C.C. Chou. 2004. Viability of lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented soymilk after drying, subsequent rehydration and storage. **Int. J. Food Microbiol.** 93: 209-217.
- Wang, Y., Z. He. 2009. Effect of probiotics on alkaline phosphatase activity and nutrient level in sediment of shrimp, *Penaeus vannamei*, ponds. **Aquaculture**. 287: 94–97.
- Wightman, P.G., J.B. Fein. 2005. Iron adsorption by *Bacillus subtilis* bacterial cell walls. **Chem. Geo.** 216: 177–189
- Wisselink, H. W., R.A. Weusthuis, G. Eggink, J. Hugenholtz, G.J. Grobber. 2002. Mannitol production by lactic acid bacteria: A review. **Int. Dairy Journal**. 12: 151-161.

- Xueyong, Z., D. Jianping, G. Jianbao, Y. Ziniu. 2008. Activity-loss characteristics of spores of *Bacillus thuringiensis* during spray drying. **Food bioprod. Process.** 86: 37–42.
- Yang, J.K., I.L. Shih, Y.M. Tzeng and S.L. Wang. 2000. Production and purification of protease from *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes. **Enzyme Microb. Technol.** 26: 406-413.
- Yilmaz, M. H. Soran and Y. Beyatli. 2006. Antimicrobial activities of some *Bacillus* spp. strains isolated from the soil. **Microbiol. Res.** 161: 127-131.
- YU, G.Y, J.B. Sinclair, G.L. Hartman, B.L. Bertagnolli. 2002. Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. **Soil Biol. Biochem.** 34: 955-963.
- Yurong, Y., S. Ruiping, Z. Shimin and J. Yibao. 2005. Effect of probiotics on intestinal mucosal immunity and ultrastructure of cecal tonsils of chickens. **Arch. Anim. Nutr.** 59 (4): 237-246.
- Zanetti, S., T. Spanu, A. Deriu, L. Romano, L.A. Sechi and G. Fadda. 2001. In vitro susceptibility of *Vibrio* spp. Isolated from the environment. **Int. J. Antimicrobial. Agents.** 17: 407-409.
- Zhou, X, S. Chen, Z. Yu. 2004. Effects of Spray Drying Parameters on the Processing of a Fermentation Liquor. **Biosys. Eng.** 88(2):193-199.
- Zhou, X., Y. Wang, W. Li. 2009. Effect of probiotic on larvae shrimp (*Penaeus vannamei*) based on water quality, survival rate and digestive enzyme activities. **Aquaculture.** 287: 349–353.
- Ziaei-Nejad, S, M.H. Rezaei, G.A. Takami, D.L. Lovett, A.R. Mirvaghefi and M. shakouri. 2006. The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity,

survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. **Aquaculture**. 252: 516-524.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก  
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีวิเคราะห์

## 1. สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

### Nutrient Broth (NB) + NaCl 1.5%

Beef extract	3	g
Peptone	5	g
โซเดียมกลูไธโร	15	g
น้ำกลั่น	1	l

### Nutrient Agar (NA) + NaCl 1.5%

Beef extract	3	g
Peptone	5	g
โซเดียมกลูไธโร	15	g
ผงวุ้น	15	g
น้ำกลั่น	1	l

### Thiosulphate citrate bile Salts Sucrose Agar (TCBS)

Yeast extract	5	g
Tryptone	5	g
Peptone	5	g
Sodium citrate	10	g
Sodium thiosulfate	10	g
Oxgall	8	g
Sucrose	20	g
Sodium chloride	10	g
Ferric citrate	1	g
Thymol blue	0.04	g
Bromothymol blue	0.04	g
Agar	15	g
น้ำกลั่น	1	l

**Sandril salt (10x)**

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	10.0	g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5.0	g
KCl	10.0	g
$\text{MnSO}_4$	4.0	mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	16	mg
$\text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	12	mg
น้ำกลั่น	100	ml

**Molass-NaCl (M+NaCl)**

molasses	20.0	ml
NaCl	15.0	g
น้ำกลั่น	1	l

**Molass-Sandril salt-monosodium glutamate (M+S+Mo)**

molasses	20.0	ml
NaCl	15.0	g
monosodium glutamate	5.0	g
Sandril salt (10x)	10.0	ml
น้ำกลั่น	1	l

**Sucrose-Sandril salt-monosodium glutamate (Su+S+Mo)**

Sucrose	20.0	g
NaCl	15.0	g
monosodium glutamate	5.0	g
Sandril salt (10x)	10.0	ml
น้ำกลั่น	1	l

**Sucrose-Sandril salt-di ammonium phosphate (Su+S+diAm)**

Sucrose	20.0	g
NaCl	15.0	g
di-ammonium phosphate	5.0	g
Sandril salt (10x)	10.0	ml
น้ำกลั่น	1	l

**Shrimp feed medium (SF)**

อาหารกุ้ง	20.0	g
NaCl	15.0	g
น้ำกลั่น	1	l

**Coconut juice (Coco) medium**

น้ำมะพร้าวอ่อน	1	l
NaCl	15.0	g

**2. วิธีการตรวจนับจุลินทรีย์ทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อ**

- นำตัวอย่างที่เก็บมาเจือจางในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% ให้ได้ความเข้มข้นตามที่ต้องการ 3 ระดับ ซึ่งระดับความเจือจางขึ้นกับปริมาณเซลล์ในแต่ละช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่าง
- นำตัวอย่างในแต่ละความเจือจาง ความเจือจางละ 0.1 ml ใส่ในจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar ผสม โซเดียมคลอไรด์ 1.5% และอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS
- ทำการ spread plate ให้กระจายทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จนผิวหน้าอาหารแห้งสนิท ทำการคว่ำจานเพาะเลี้ยงเชื้อ ทำการทดลองที่ระดับความเจือจางละ 2 ซ้ำ
- นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- นำเชื้อที่บ่มตามเวลาแล้วมานับจำนวน โคโลนีเดี่ยวๆ ที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปคำนวณเป็นจำนวนโคโลนี ต่อน้ำหนัก 1 ml (cfu/ml) หากค่าเฉลี่ยจากระดับความเจือจางที่ให้จำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 25 – 250 โคโลนีต่อจานเพาะเลี้ยงเชื้อ

### 3. คำนวณจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต

จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (cfu/ml) = จำนวนโคโลนีต่อจานเพาะเลี้ยงเชื้อ  $\times$  dilution factor  $\times$  10

### 4. ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar)

#### 4.1 การเตรียมสารเคมี

4.1.1 กรดซัลฟิวริก 95.5% มี specific gravity 1.84

4.1.2 ฟีนอล 5.0% โดยน้ำหนัก

#### 4.2 การวิเคราะห์

4.2.1 ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลที่เหมาะสม (0-80  $\mu$ g/l) ปริมาตร 1 ml ลงในหลอดทดลองและเติมสารละลายฟีนอล 1 ml ผสมให้เข้ากัน

4.2.2 เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 ml อย่างรวดเร็วโดยให้กรดปะทะสารละลายในหลอดทดลองโดยตรง ผสมให้เข้ากันทันที วางสารละลายทิ้งไว้ 10 นาทีหลังจากนั้นผสมให้เข้ากันแล้วบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส 10-20 นาที

4.2.3 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ OD<sub>490</sub> เปรียบเทียบค่าที่ได้เพื่อหาปริมาณน้ำตาลในสารละลายตัวอย่างกับกราฟมาตรฐาน ซึ่งใช้น้ำตาลชนิดเดียวกันเป็นมาตรฐาน

### 5. ความชื้นของผงผลิตภัณฑ์

ชั่งตัวอย่างผงผลิตภัณฑ์ประมาณ 0.5 g ใส่ลงในถ้วยอลูมิเนียมที่ทราบน้ำหนักแน่นอนแล้วนำไปอบแห้งที่ 105 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นชั่งน้ำหนักภาชนะรวมทั้งตัวอย่างอีกครั้งเพื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์ความชื้นดังนี้

$$\text{ความชื้น (\%)} = \frac{(\text{นน. ตัวอย่างก่อนอบ} - \text{นน. ตัวอย่างหลังอบ}) \times 100}{\text{นน. ตัวอย่างก่อนอบ}}$$



ภาพผนวกที่ ก1 ถังหมักขนาด 2 ลิตร (New Brunswick Scientific, NJ, USA)



ภาพผนวกที่ ก2 เครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอยระดับนำร่อง (Niro A/S, Denmark)

**ภาคผนวก ข**

**ตารางผนวก**

ตารางผนวกที่ ข1 ปริมาณ VH05 จากการใส่ B17 ยับยั้ง VH05 โดยวิธี co-culture

		ปริมาณ VH05 (cfu/ml)				
B17 (cfu/ml)	เวลา (ชั่วโมง)					
	0	12	24	36	48	
10 <sup>6</sup>	4.5x10 <sup>2</sup>	-	-	-	-	
10 <sup>7</sup>	4.5x10 <sup>2</sup>	-	-	-	-	
10 <sup>8</sup>	6.5x10 <sup>2</sup>	-	-	-	-	
0(Control)	5.5x10 <sup>2</sup>	6.65x10 <sup>4</sup>	1.83x10 <sup>6</sup>	1.06x10 <sup>8</sup>	1.86x10 <sup>8</sup>	
10 <sup>6</sup>	1.0x10 <sup>4</sup>	4.5x10 <sup>7</sup>	1.37x10 <sup>9</sup>	2.85x10 <sup>9</sup>	1.03x10 <sup>9</sup>	
10 <sup>7</sup>	1.0x10 <sup>4</sup>	-	-	-	-	
10 <sup>8</sup>	3.0x10 <sup>4</sup>	-	-	-	-	
0(Control)	1.0x10 <sup>4</sup>	3.75x10 <sup>8</sup>	1.2x10 <sup>9</sup>	2.9x10 <sup>9</sup>	8.2x10 <sup>8</sup>	
10 <sup>6</sup>	6.5x10 <sup>6</sup>	1.58x10 <sup>8</sup>	7.2x10 <sup>8</sup>	5.05x10 <sup>8</sup>	9.7x10 <sup>8</sup>	
10 <sup>7</sup>	6.0x10 <sup>6</sup>	7.5x10 <sup>8</sup>	1.17x10 <sup>9</sup>	1.03x10 <sup>9</sup>	1.27x10 <sup>9</sup>	
10 <sup>8</sup>	5.5x10 <sup>6</sup>	2.35x10 <sup>8</sup>	3.15x10 <sup>8</sup>	2.32x10 <sup>8</sup>	1.99x10 <sup>8</sup>	
0(Control)	5.2x10 <sup>6</sup>	4.55x10 <sup>8</sup>	1.05x10 <sup>9</sup>	1.35x10 <sup>9</sup>	1.12x10 <sup>9</sup>	

หมายเหตุ - หมายถึง ปริมาณเชื้อน้อยกว่า 10<sup>2</sup> cfu/ml ที่ระดับความเงิอง 10 เท่า

ตารางผนวกที่ ข2 ปริมาณ VH05 จากการใส่ B21 ยับยั้ง VH05 โดยวิธี co-culture

ปริมาณ VH05 (cfu/ml)					
B21 (cfu/ml)	เวลา (ชั่วโมง)				
	0	12	24	36	48
10 <sup>6</sup>	4.5x10 <sup>2</sup>	-	1.5x10 <sup>2</sup>	1.25x10 <sup>3</sup>	1.4x10 <sup>4</sup>
10 <sup>7</sup>	6.5x10 <sup>2</sup>	-	-	-	-
10 <sup>8</sup>	4.5x10 <sup>2</sup>	-	-	-	-
0(Control)	5.5x10 <sup>2</sup>	6.65x10 <sup>4</sup>	1.83x10 <sup>6</sup>	1.06x10 <sup>8</sup>	1.86x10 <sup>8</sup>
10 <sup>6</sup>	1.4x10 <sup>4</sup>	4.25x10 <sup>7</sup>	6.4x10 <sup>9</sup>	3.8x10 <sup>9</sup>	7.3x10 <sup>8</sup>
10 <sup>7</sup>	1.1x10 <sup>4</sup>	-	-	2.0x10 <sup>3</sup>	1.53x10 <sup>5</sup>
10 <sup>8</sup>	1.8x10 <sup>4</sup>	-	-	-	5.7x10 <sup>3</sup>
0(Control)	1.0x10 <sup>4</sup>	3.75x10 <sup>8</sup>	1.2x10 <sup>9</sup>	2.9x10 <sup>9</sup>	8.2x10 <sup>8</sup>
10 <sup>6</sup>	4.5x10 <sup>6</sup>	2.95x10 <sup>8</sup>	6.3x10 <sup>8</sup>	7.2x10 <sup>8</sup>	7.75x10 <sup>8</sup>
10 <sup>7</sup>	3.0x10 <sup>6</sup>	4.75x10 <sup>8</sup>	7.4x10 <sup>8</sup>	4.75x10 <sup>8</sup>	4.05x10 <sup>9</sup>
10 <sup>8</sup>	5.5x10 <sup>6</sup>	1.18x10 <sup>8</sup>	1.67x10 <sup>8</sup>	1.75x10 <sup>8</sup>	1.51x10 <sup>8</sup>
0(Control)	5.2x10 <sup>6</sup>	4.55x10 <sup>8</sup>	1.05x10 <sup>9</sup>	1.35x10 <sup>9</sup>	1.12x10 <sup>9</sup>

หมายเหตุ - หมายถึง ปริมาณเชื้อน้อยกว่า 10<sup>2</sup> cfu/ml ที่ระดับความเงิอง 10 เท่า

ตารางผนวกที่ ข3 ปริมาณ VH05 จากการใช้ B25 ยับยั้ง VH05 โดยวิธี co-culture

ปริมาณ VH05 (cfu/ml)					
B25 (cfu/ml)	เวลา (ชั่วโมง)				
	0	12	24	36	48
10 <sup>6</sup>	6.5x10 <sup>2</sup>	6.5x10 <sup>2</sup>	3.75x10 <sup>3</sup>	1.47x10 <sup>4</sup>	1.36x10 <sup>6</sup>
10 <sup>7</sup>	7.5x10 <sup>2</sup>	-	7.5x10 <sup>2</sup>	2.85x10 <sup>3</sup>	1.14x10 <sup>4</sup>
10 <sup>8</sup>	5.5x10 <sup>2</sup>	-	-	2.0x10 <sup>2</sup>	1.05x10 <sup>3</sup>
0(Control)	5.5x10 <sup>2</sup>	6.65x10 <sup>4</sup>	1.83x10 <sup>6</sup>	1.06x10 <sup>8</sup>	1.86x10 <sup>8</sup>
10 <sup>6</sup>	9.9x10 <sup>4</sup>	2.8x10 <sup>7</sup>	4.7x10 <sup>7</sup>	1.08x10 <sup>8</sup>	2.11x10 <sup>8</sup>
10 <sup>7</sup>	4.9x10 <sup>4</sup>	2.5x10 <sup>6</sup>	1.84x10 <sup>6</sup>	1.32x10 <sup>7</sup>	5.2x10 <sup>7</sup>
10 <sup>8</sup>	7.6x10 <sup>4</sup>	4.0x10 <sup>4</sup>	1.2x10 <sup>5</sup>	5.9x10 <sup>6</sup>	8.7x10 <sup>6</sup>
0(Control)	1.0x10 <sup>4</sup>	3.75x10 <sup>8</sup>	1.2x10 <sup>9</sup>	2.9x10 <sup>9</sup>	8.2x10 <sup>8</sup>
10 <sup>6</sup>	5.7x10 <sup>6</sup>	5.7x10 <sup>8</sup>	1.62x10 <sup>9</sup>	1.15x10 <sup>9</sup>	8.4x10 <sup>8</sup>
10 <sup>7</sup>	5.0x10 <sup>6</sup>	4.65x10 <sup>8</sup>	1.17x10 <sup>9</sup>	1.02x10 <sup>9</sup>	8.5x10 <sup>8</sup>
10 <sup>8</sup>	5.8x10 <sup>6</sup>	4.65x10 <sup>8</sup>	6.7x10 <sup>8</sup>	7.2x10 <sup>8</sup>	9.5x10 <sup>8</sup>
0(Control)	5.2x10 <sup>6</sup>	4.55x10 <sup>8</sup>	1.05x10 <sup>9</sup>	1.35x10 <sup>9</sup>	1.12x10 <sup>9</sup>

หมายเหตุ - หมายถึง ปริมาณเชื้อน้อยกว่า 10<sup>2</sup> cfu/ml ที่ระดับความเงือจาง 10 เท่า

ตารางผนวกที่ ๔ ปริมาณ B17 จากการใช้ B17 ยับยั้ง VH05 โดยวิธี co-culture

ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (cfu/ml)		ปริมาณ B17 (cfu/ml)				
VH05	B17	เวลา (ชั่วโมง)				
		0	12	24	36	48
10 <sup>2</sup>	10 <sup>6</sup>	4.5x10 <sup>6</sup>	9.5x10 <sup>6</sup>	6.65x10 <sup>7</sup>	1.83x10 <sup>8</sup>	4.15x10 <sup>8</sup>
	10 <sup>7</sup>	5.35x10 <sup>7</sup>	1.05x10 <sup>8</sup>	3.35x10 <sup>8</sup>	5.35x10 <sup>8</sup>	6.1x10 <sup>8</sup>
	10 <sup>8</sup>	3.15x10 <sup>8</sup>	5.9x10 <sup>8</sup>	8.95x10 <sup>8</sup>	8.65x10 <sup>8</sup>	1.05x10 <sup>9</sup>
10 <sup>4</sup>	10 <sup>6</sup>	6.0x10 <sup>6</sup>	5.0x10 <sup>7</sup>	6.6x10 <sup>7</sup>	7.7x10 <sup>7</sup>	6.8x10 <sup>7</sup>
	10 <sup>7</sup>	5.1x10 <sup>7</sup>	1.6x10 <sup>8</sup>	4.7x10 <sup>8</sup>	2.8x10 <sup>8</sup>	6.9x10 <sup>8</sup>
	10 <sup>8</sup>	3.0x10 <sup>8</sup>	9.6x10 <sup>8</sup>	7.5x10 <sup>8</sup>	6.4x10 <sup>8</sup>	3.9x10 <sup>8</sup>
10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	4.5x10 <sup>6</sup>	4.0x10 <sup>7</sup>	1.71x10 <sup>8</sup>	1.85x10 <sup>8</sup>	1.69x10 <sup>8</sup>
	10 <sup>7</sup>	4.25x10 <sup>7</sup>	5.1x10 <sup>8</sup>	7.55x10 <sup>8</sup>	6.05x10 <sup>8</sup>	6.6x10 <sup>8</sup>
	10 <sup>8</sup>	2.3x10 <sup>8</sup>	1.15x10 <sup>9</sup>	1.62x10 <sup>9</sup>	1.44x10 <sup>9</sup>	1.26x10 <sup>9</sup>

ตารางผนวกที่ ๕ ปริมาณ B21 จากการใช้ B21 ยับยั้ง VH05 โดยวิธี co-culture

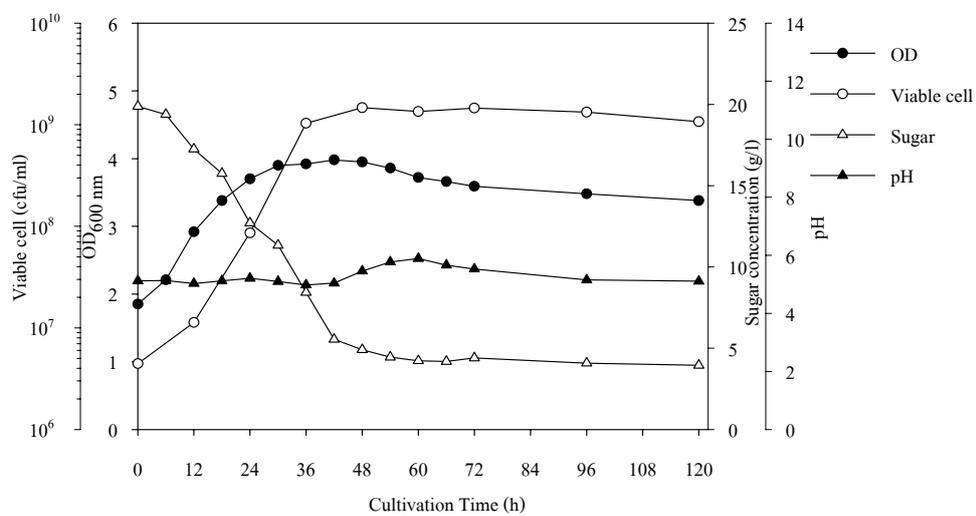
ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (cfu/ml)		ปริมาณ <i>Bacillus</i> spp. B21 (cfu/ml)				
VH05	B21	เวลา (ชั่วโมง)				
		0	12	24	36	48
10 <sup>2</sup>	10 <sup>6</sup>	3.5x10 <sup>6</sup>	1.85x10 <sup>7</sup>	2.06x10 <sup>8</sup>	4.35x10 <sup>8</sup>	4.55x10 <sup>8</sup>
	10 <sup>7</sup>	6.0x10 <sup>7</sup>	1.17x10 <sup>8</sup>	4.9x10 <sup>8</sup>	6.0x10 <sup>8</sup>	6.0x10 <sup>8</sup>
	10 <sup>8</sup>	7.05x10 <sup>8</sup>	7.1x10 <sup>8</sup>	7.65x10 <sup>8</sup>	8.05x10 <sup>8</sup>	7.7x10 <sup>8</sup>
10 <sup>4</sup>	10 <sup>6</sup>	4.0x10 <sup>6</sup>	2.0x10 <sup>7</sup>	1.55x10 <sup>7</sup>	1.40x10 <sup>7</sup>	1.15x10 <sup>7</sup>
	10 <sup>7</sup>	5.4x10 <sup>7</sup>	2.6x10 <sup>8</sup>	3.5x10 <sup>8</sup>	4.2x10 <sup>8</sup>	2.4x10 <sup>8</sup>
	10 <sup>8</sup>	4.0x10 <sup>8</sup>	6.4x10 <sup>8</sup>	7.2x10 <sup>8</sup>	1.5x10 <sup>9</sup>	8.1x10 <sup>8</sup>
10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	4.0x10 <sup>6</sup>	2.18x10 <sup>8</sup>	3.05x10 <sup>8</sup>	3.45x10 <sup>8</sup>	3.65x10 <sup>8</sup>
	10 <sup>7</sup>	6.2x10 <sup>7</sup>	2.05x10 <sup>8</sup>	7.5x10 <sup>8</sup>	5.1x10 <sup>8</sup>	3.1x10 <sup>8</sup>
	10 <sup>8</sup>	3.7x10 <sup>8</sup>	9.5x10 <sup>8</sup>	1.55x10 <sup>9</sup>	1.85x10 <sup>9</sup>	1.45x10 <sup>9</sup>

ตารางผนวกที่ ๖ ปริมาณ B25 จากการใช้ B25 ยับยั้ง VH05 โดยวิธี co-culture

ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (cfu/ml)		ปริมาณ <i>Bacillus</i> spp. B25 (cfu/ml)				
<i>V. harveyi</i>	<i>Bacillus</i> spp.	เวลา (ชั่วโมง)				
VH05	B25	0	12	24	36	48
10 <sup>2</sup>	10 <sup>6</sup>	5.5x10 <sup>6</sup>	1.25x10 <sup>7</sup>	2.6x10 <sup>8</sup>	3.7x10 <sup>8</sup>	4.85x10 <sup>8</sup>
	10 <sup>7</sup>	5.25x10 <sup>7</sup>	1.36x10 <sup>8</sup>	3.75x10 <sup>8</sup>	6.4x10 <sup>8</sup>	6.05x10 <sup>8</sup>
	10 <sup>8</sup>	6.45x10 <sup>8</sup>	7.05x10 <sup>8</sup>	6.4x10 <sup>8</sup>	7.2x10 <sup>8</sup>	8.1x10 <sup>8</sup>
10 <sup>4</sup>	10 <sup>6</sup>	5.5x10 <sup>6</sup>	8.0x10 <sup>7</sup>	3.0x10 <sup>7</sup>	1.1x10 <sup>8</sup>	7.9x10 <sup>7</sup>
	10 <sup>7</sup>	2.4x10 <sup>7</sup>	7.1x10 <sup>8</sup>	2.6x10 <sup>7</sup>	4.5x10 <sup>8</sup>	5.6x10 <sup>8</sup>
	10 <sup>8</sup>	6.8x10 <sup>8</sup>	3.6x10 <sup>8</sup>	1.4x10 <sup>8</sup>	1.3x10 <sup>9</sup>	8.8x10 <sup>8</sup>
10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	8.5x10 <sup>6</sup>	4.65x10 <sup>7</sup>	3.7x10 <sup>8</sup>	2.32x10 <sup>8</sup>	1.98x10 <sup>8</sup>
	10 <sup>7</sup>	5.5x10 <sup>7</sup>	3.15x10 <sup>8</sup>	7.9x10 <sup>8</sup>	1.59x10 <sup>9</sup>	1.26x10 <sup>9</sup>
	10 <sup>8</sup>	6.65x10 <sup>8</sup>	1.79x10 <sup>9</sup>	1.51x10 <sup>9</sup>	1.9x10 <sup>9</sup>	1.36x10 <sup>9</sup>

ตารางผนวกที่ ข7 ผลการเพาะเลี้ยง B17 ใน M+NaCl

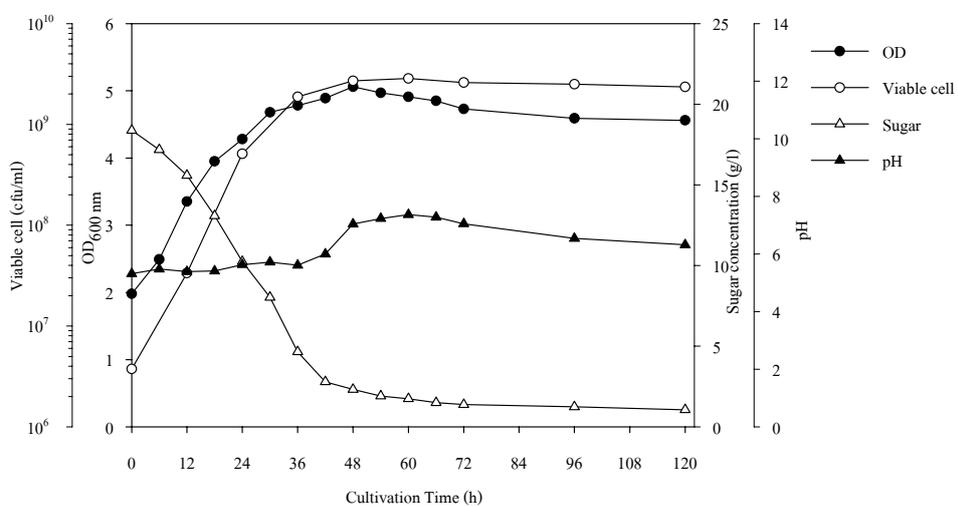
เวลา (ชั่วโมง)	pH	OD <sub>600 nm</sub>	Viable cell (cfu/ml)	Sugar (g/l)
0	5.12	1.85	$4.45 \times 10^6$	19.88
12	5.03	2.92	$1.13 \times 10^7$	17.25
24	5.21	3.7	$8.6 \times 10^7$	12.7
36	4.98	3.92	$1.04 \times 10^9$	8.43
48	5.46	3.95	$1.47 \times 10^9$	4.9
60	5.89	3.72	$1.35 \times 10^9$	4.23
72	5.53	3.59	$1.46 \times 10^9$	4.4
96	5.15	3.48	$1.33 \times 10^9$	4.08
120	5.11	3.38	$1.07 \times 10^9$	3.95



ภาพผนวกที่ ข1 ผลการเพาะเลี้ยง B17 ใน M+NaCl

ตารางผนวกที่ ข8 ผลการเพาะเลี้ยง B17 ใน M+S+Mo

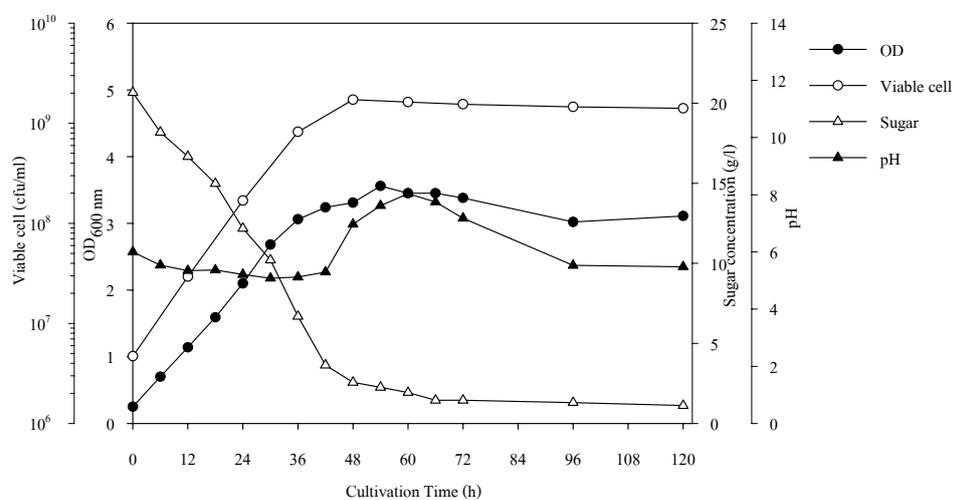
เวลา (ชั่วโมง)	pH	OD <sub>600 nm</sub>	Viable cell (cfu/ml)	Sugar (g/l)
0	5.32	1.98	$3.75 \times 10^6$	18.38
12	5.39	3.35	$3.35 \times 10^7$	15.59
24	5.63	4.28	$5.1 \times 10^8$	10.24
36	5.61	4.78	$1.88 \times 10^9$	4.65
48	7.04	5.06	$2.7 \times 10^9$	2.32
60	7.37	4.91	$2.85 \times 10^9$	1.74
72	7.05	4.73	$2.6 \times 10^9$	1.38
96	6.54	4.59	$2.5 \times 10^9$	1.24
120	6.32	4.56	$2.35 \times 10^9$	1.06



ภาพผนวกที่ ข2 ผลการเพาะเลี้ยง B17 ใน M+S+Mo

ตารางผนวกที่ ข9 ผลการเพาะเลี้ยง B17 ใน Su+S+Mo

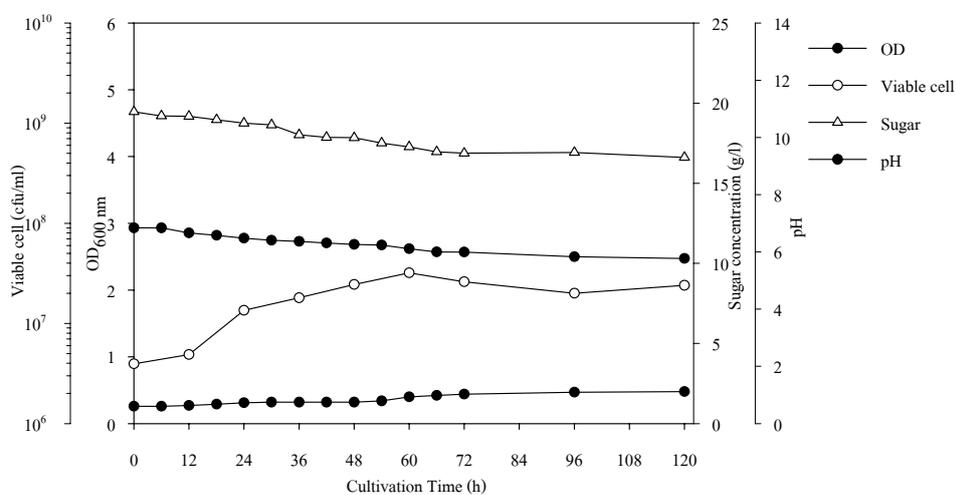
เวลา (ชั่วโมง)	pH	OD <sub>600 nm</sub>	Viable cell (cfu/ml)	Sugar (g/l)
0	6	0.25	$4.7 \times 10^6$	20.67
12	5.35	1.14	$2.93 \times 10^7$	16.67
24	5.21	2.1	$1.69 \times 10^8$	12.19
36	5.12	3.06	$8.2 \times 10^8$	6.69
48	6.97	3.31	$1.72 \times 10^9$	2.57
60	8.04	3.45	$1.63 \times 10^9$	1.93
72	7.18	3.38	$1.55 \times 10^9$	1.45
96	5.53	3.02	$1.46 \times 10^9$	1.31
120	5.48	3.11	$1.41 \times 10^9$	1.12



ภาพผนวกที่ ข3 ผลการเพาะเลี้ยง B17 ใน Su+S+Mo

ตารางผนวกที่ ข10 ผลการเพาะเลี้ยง B17 ใน Su+S+diAm

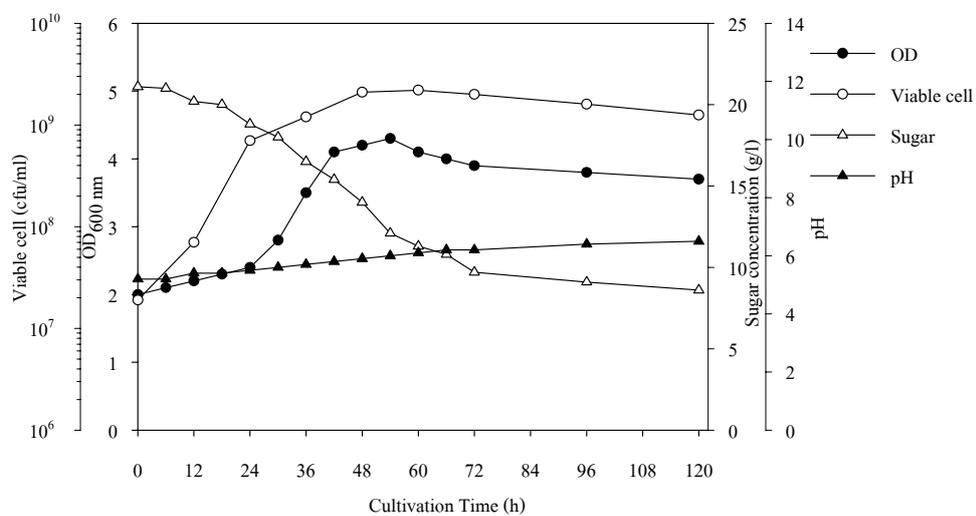
เวลา (ชั่วโมง)	pH	OD <sub>600 nm</sub>	Viable cell (cfu/ml)	Sugar (g/l)
0	6.84	0.26	$3.95 \times 10^6$	19.46
12	6.66	0.27	$4.9 \times 10^6$	19.18
24	6.48	0.31	$1.35 \times 10^7$	18.75
36	6.37	0.32	$1.8 \times 10^7$	18.02
48	6.26	0.32	$2.45 \times 10^7$	17.84
60	6.11	0.4	$3.2 \times 10^7$	17.27
72	5.99	0.44	$2.6 \times 10^7$	16.87
96	5.83	0.47	$2.0 \times 10^7$	16.92
120	5.77	0.48	$2.4 \times 10^7$	16.61



ภาพผนวกที่ ข4 ผลการเพาะเลี้ยง B17 ใน Su+S+diAm

ตารางผนวกที่ ข11 ผลการเพาะเลี้ยง B19 ใน M+NaCl

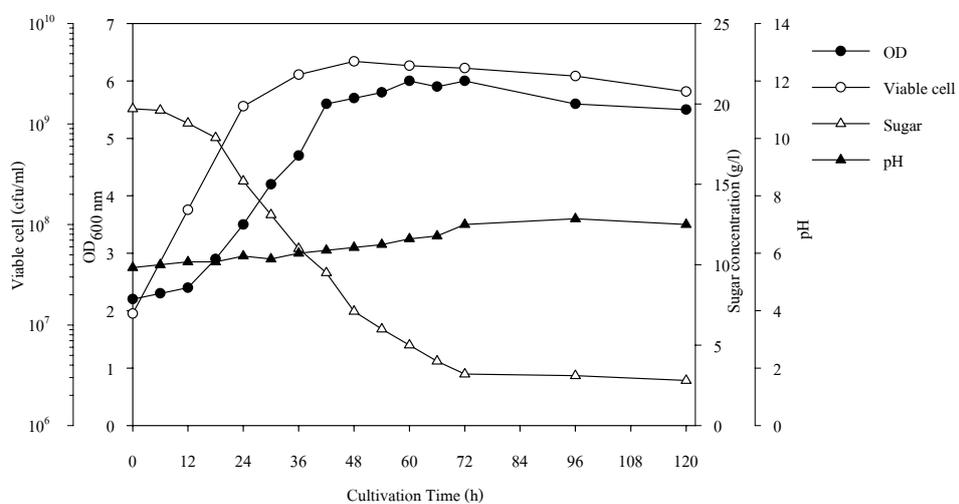
เวลา (ชั่วโมง)	pH	OD <sub>600 nm</sub>	Viable cell (cfu/ml)	Sugar (g/l)
0	5.2	2	$1.9 \times 10^7$	21.1
12	5.4	2.2	$7.0 \times 10^7$	20.2
24	5.5	2.4	$7.0 \times 10^8$	18.8
36	5.7	3.5	$1.2 \times 10^9$	16.5
48	5.9	4.2	$2.1 \times 10^9$	14
60	6.1	4.1	$2.2 \times 10^9$	11.3
72	6.2	3.9	$2.0 \times 10^9$	9.7
96	6.4	3.8	$1.6 \times 10^9$	9.1
120	6.5	3.7	$1.25 \times 10^9$	8.6



ภาพผนวกที่ ข5 ผลการเพาะเลี้ยง B19 ใน M+NaCl

ตารางผนวกที่ ข12 ผลการเพาะเลี้ยง B19 ใน M+S+Mo

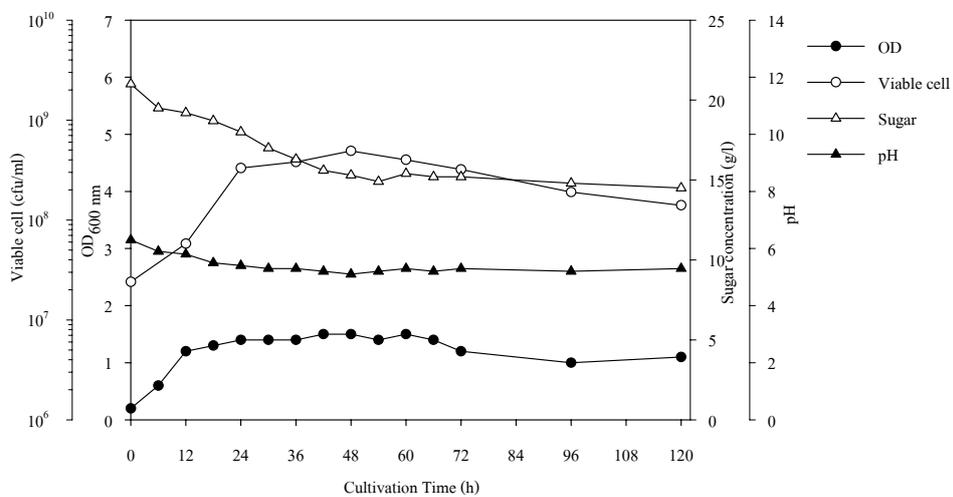
เวลา (ชั่วโมง)	pH	OD <sub>600 nm</sub>	Viable cell (cfu/ml)	Sugar (g/l)
0	5.5	2.2	$1.3 \times 10^7$	19.7
12	5.7	2.4	$1.4 \times 10^8$	18.8
24	5.9	3.5	$1.5 \times 10^9$	15.2
36	6	4.7	$3.1 \times 10^9$	11
48	6.2	5.7	$4.2 \times 10^9$	7.1
60	6.5	6	$3.8 \times 10^9$	5
72	7	6	$3.6 \times 10^9$	3.2
96	7.2	5.6	$3.0 \times 10^9$	3.1
120	7	5.5	$2.1 \times 10^9$	2.8



ภาพผนวกที่ ข6 การเพาะเลี้ยง B19 ใน M+S+Mo

ตารางผนวกที่ ข13 ผลการเพาะเลี้ยง B19 ใน Su+S+Mo

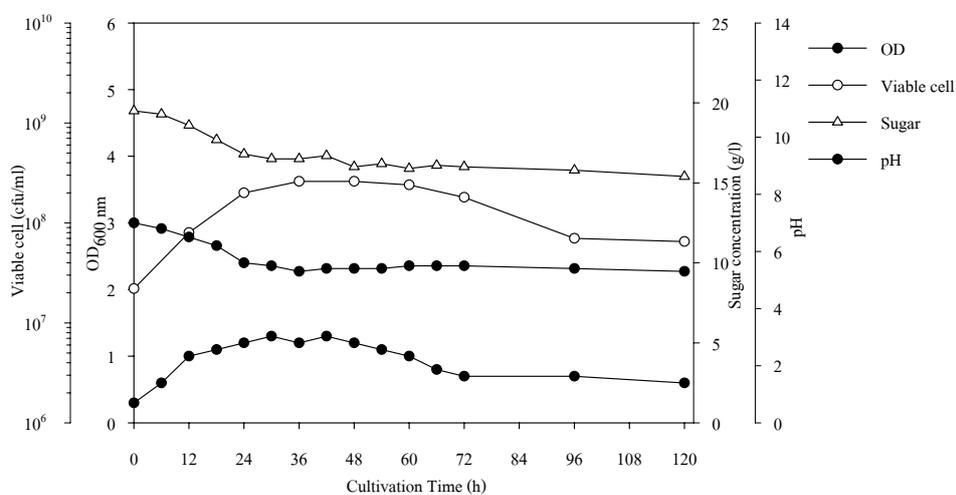
เวลา (ชั่วโมง)	pH	OD <sub>600 nm</sub>	Viable cell (cfu/ml)	Sugar (g/l)
0	6.3	0.2	$2.4 \times 10^7$	21
12	5.8	1.2	$5.8 \times 10^7$	19.2
24	5.4	1.4	$3.3 \times 10^8$	18
36	5.3	1.4	$3.8 \times 10^8$	16.3
48	5.1	1.5	$4.9 \times 10^8$	15.3
60	5.3	1.5	$4.0 \times 10^8$	15.4
72	5.3	1.2	$3.2 \times 10^8$	15.2
96	5.2	1	$1.9 \times 10^8$	14.8
120	5.3	1.1	$1.4 \times 10^8$	14.5



ภาพผนวกที่ ข7 ผลการเพาะเลี้ยง B19 ใน Su+S+Mo

ตารางผนวกที่ ข14 ผลการเพาะเลี้ยง B19 ใน Su+S+diAm

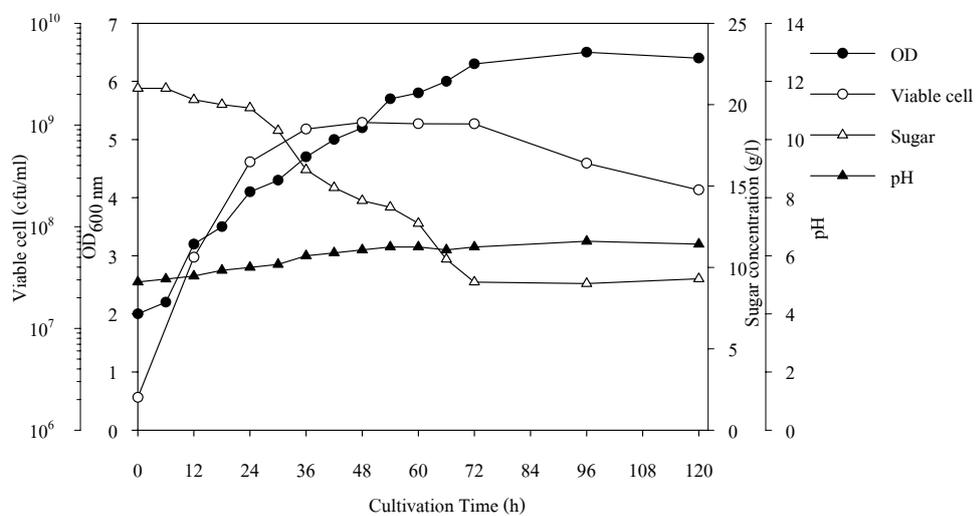
เวลา (ชั่วโมง)	pH	OD <sub>600 nm</sub>	Viable cell (cfu/ml)	Sugar (g/l)
0	7	0.3	$2.2 \times 10^7$	19.5
12	6.5	1	$8.0 \times 10^7$	18.6
24	5.6	1.2	$2.0 \times 10^8$	16.8
36	5.3	1.2	$2.6 \times 10^8$	16.5
48	5.4	1.2	$2.6 \times 10^8$	16
60	5.5	1	$2.4 \times 10^8$	15.9
72	5.5	0.7	$1.8 \times 10^8$	16
96	5.4	0.7	$7.0 \times 10^7$	15.8
120	5.3	0.6	$6.5 \times 10^7$	15.4



ภาพผนวกที่ ข8 ผลการเพาะเลี้ยง B19 ใน Su+S+diAm

ตารางผนวกที่ ข15 ผลการเพาะเลี้ยง B21 ใน M+NaCl

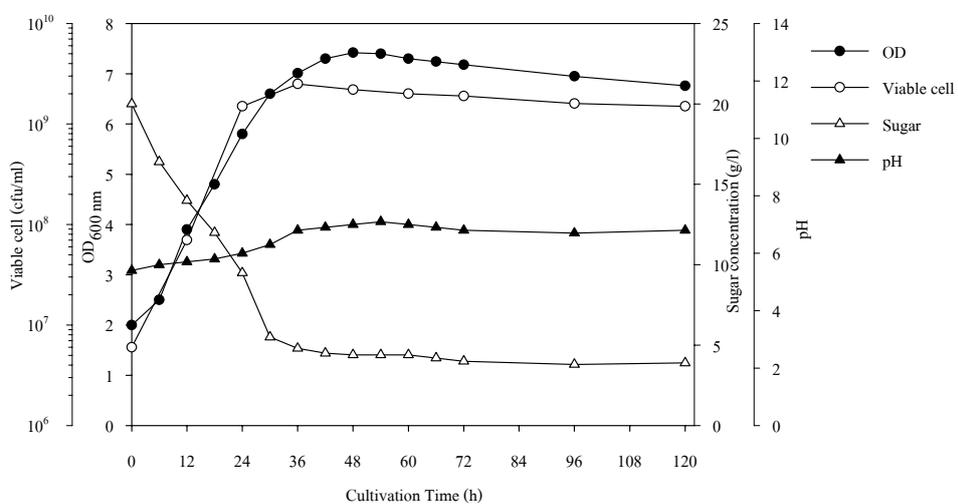
เวลา (ชั่วโมง)	pH	OD <sub>600 nm</sub>	Viable cell (cfu/ml)	Sugar (g/l)
0	5.1	2	$2.1 \times 10^6$	21
12	5.3	3.2	$5.0 \times 10^7$	20.3
24	5.6	4.1	$4.3 \times 10^8$	19.8
36	6	4.7	$9.1 \times 10^8$	16
48	6.2	5.2	$1.06 \times 10^9$	14.1
60	6.3	5.8	$1.03 \times 10^9$	12.7
72	6.3	6.3	$1.03 \times 10^9$	9.1
96	6.5	6.5	$4.2 \times 10^8$	9
120	6.4	6.4	$2.3 \times 10^8$	9.3



ภาพผนวกที่ ข9 ผลการเพาะเลี้ยง ใน M+NaCl

ตารางผนวกที่ ข16 ผลการเพาะเลี้ยง B21 ใน M+S+Mo

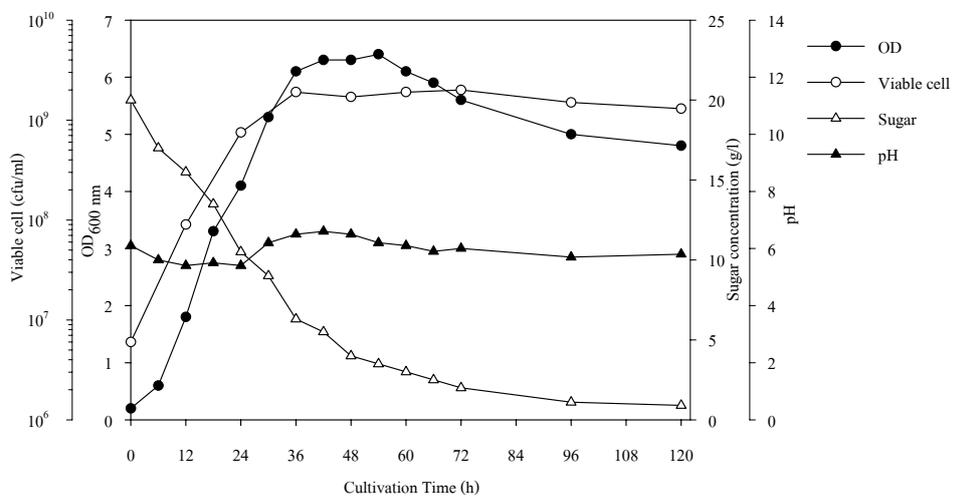
เวลา (ชั่วโมง)	pH	OD <sub>600 nm</sub>	Viable cell (cfu/ml)	Sugar (g/l)
0	5.4	2	$6.0 \times 10^6$	20
12	5.7	3.9	$7.0 \times 10^7$	14
24	6	5.8	$1.5 \times 10^9$	9.5
36	6.8	7.01	$2.5 \times 10^9$	4.8
48	7	7.42	$2.2 \times 10^9$	4.4
60	7	7.3	$2.0 \times 10^9$	4.4
72	6.8	7.18	$1.9 \times 10^9$	4
96	6.7	6.95	$1.6 \times 10^9$	3.8
120	6.8	6.76	$1.5 \times 10^9$	3.9



ภาพผนวกที่ ข10 ผลการเพาะเลี้ยง B21 ใน M+S+Mo

ตารางผนวกที่ ข17 ผลการเพาะเลี้ยง B21 ใน Su+S+Mo

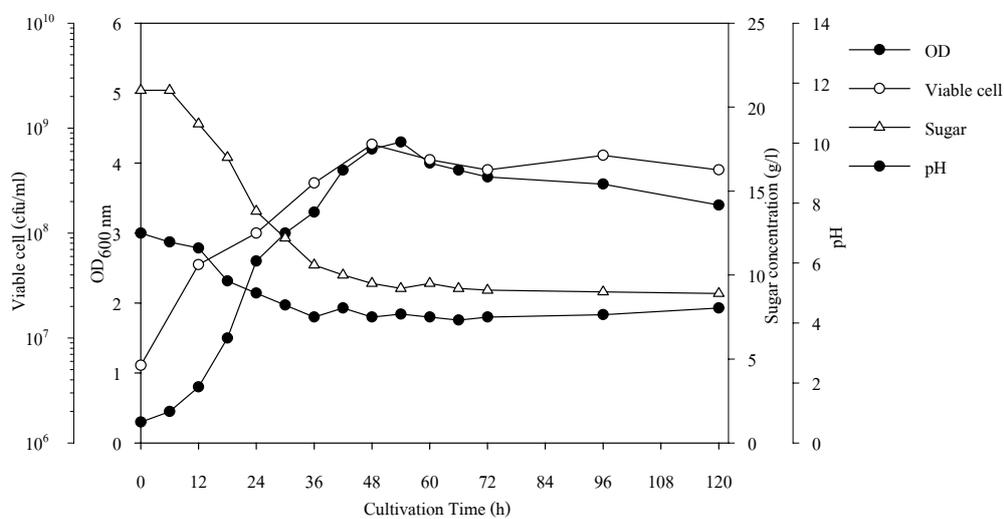
เวลา (ชั่วโมง)	pH	OD <sub>600 nm</sub>	Viable cell (cfu/ml)	Sugar (g/l)
0	6.1	0.2	$6.0 \times 10^6$	20
12	5.4	1.8	$9.0 \times 10^7$	15.5
24	5.4	4.1	$7.5 \times 10^8$	10.5
36	6.5	6.1	$1.9 \times 10^9$	6.3
48	6.5	6.3	$1.7 \times 10^9$	4
60	6.1	6.1	$1.9 \times 10^9$	3
72	6	5.6	$2.0 \times 10^9$	2
96	5.7	5	$1.5 \times 10^9$	1.1
120	5.8	4.8	$1.3 \times 10^9$	0.9



ภาพผนวกที่ ข11 ผลการเพาะเลี้ยง B21 ใน Su+S+Mo

ตารางผนวกที่ ข18 ผลการเพาะเลี้ยง B21 ใน Su+S+diAm

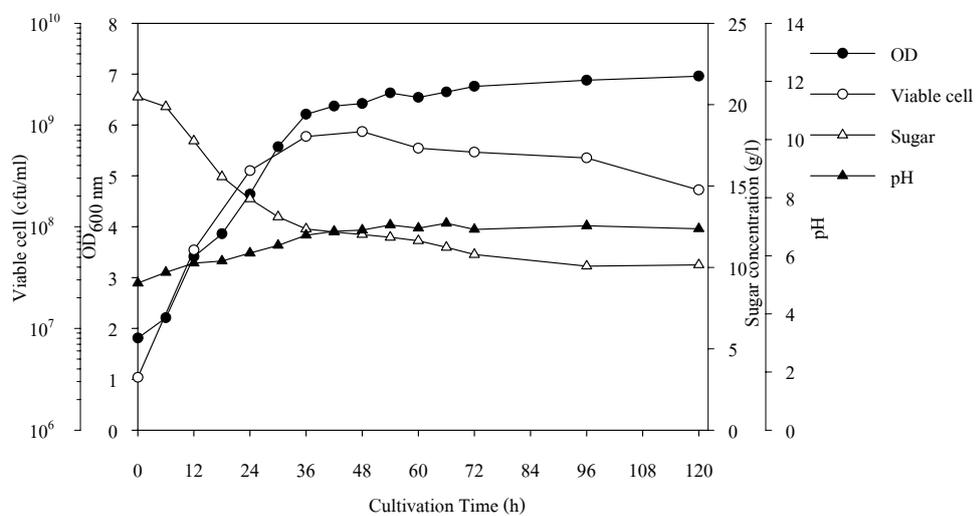
เวลา (ชั่วโมง)	pH	OD <sub>600 nm</sub>	Viable cell (cfu/ml)	Sugar (g/l)
0	7	0.3	$5.5 \times 10^6$	21
12	6.5	0.8	$5.0 \times 10^7$	19
24	5	2.6	$1.0 \times 10^8$	13.8
36	4.2	3.3	$3.0 \times 10^8$	10.6
48	4.2	4.2	$7.0 \times 10^8$	9.5
60	4.2	4	$5.0 \times 10^8$	9.5
72	4.2	3.8	$4.0 \times 10^8$	9.1
96	4.28	3.7	$5.5 \times 10^8$	9
120	4.5	3.4	$4.0 \times 10^8$	8.9



ภาพผนวกที่ ข12 ผลการเพาะเลี้ยง B21 ใน Su+S+diAm

ตารางผนวกที่ ข19 ผลการเพาะเลี้ยง B25 ใน M+NaCl

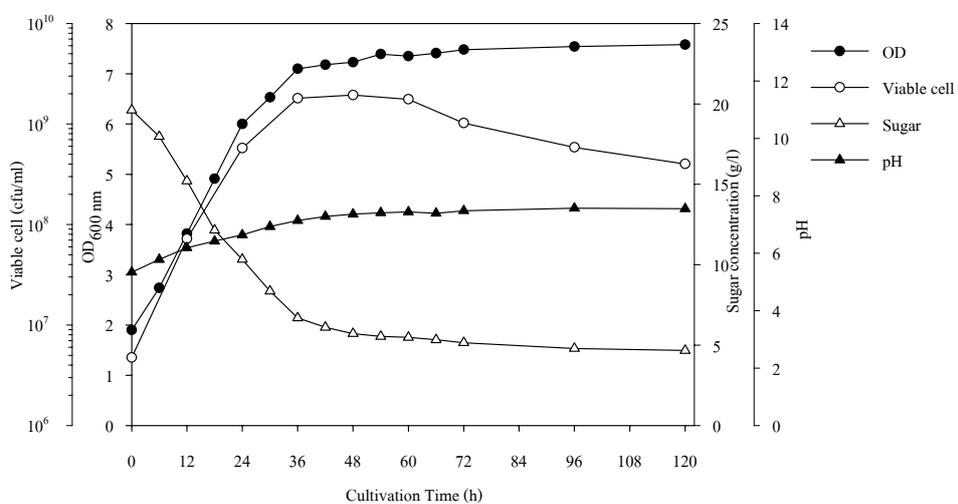
เวลา (ชั่วโมง)	pH	OD <sub>600 nm</sub>	Viable cell (cfu/ml)	Sugar (g/l)
0	5.06	1.81	$3.3 \times 10^6$	20.46
12	5.75	3.41	$5.9 \times 10^7$	17.77
24	6.09	4.64	$3.55 \times 10^8$	14.21
36	6.71	6.21	$7.7 \times 10^8$	12.36
48	6.88	6.42	$8.6 \times 10^8$	12.03
60	6.95	6.54	$5.9 \times 10^8$	11.64
72	6.91	6.76	$5.4 \times 10^8$	10.79
96	7.03	6.88	$4.75 \times 10^8$	10.08
120	6.93	6.96	$2.3 \times 10^8$	10.15



ภาพผนวกที่ ข13 ผลการเพาะเลี้ยง B25 ใน M+NaCl

ตารางผนวกที่ ข20 ผลการเพาะเลี้ยง B25 ใน M+S+Mo

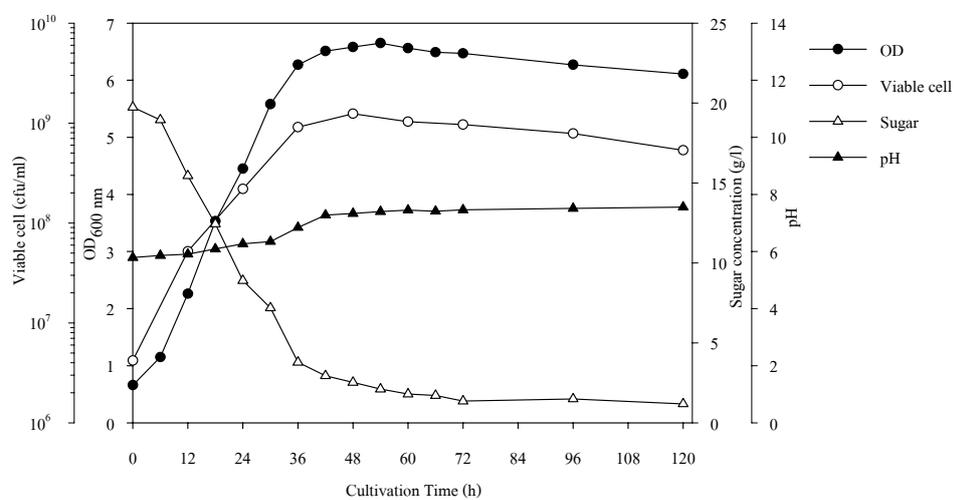
เวลา (ชั่วโมง)	pH	OD <sub>600 nm</sub>	Viable cell (cfu/ml)	Sugar (g/l)
0	5.34	1.9	$4.75 \times 10^6$	19.62
12	6.19	3.82	$7.2 \times 10^7$	15.21
24	6.64	6	$5.75 \times 10^8$	10.33
36	7.14	7.1	$1.8 \times 10^9$	6.69
48	7.36	7.23	$1.94 \times 10^9$	5.72
60	7.44	7.35	$1.76 \times 10^9$	5.49
72	7.48	7.48	$1.02 \times 10^9$	5.15
96	7.57	7.54	$5.85 \times 10^8$	4.79
120	7.55	7.58	$4.0 \times 10^8$	4.67



ภาพผนวกที่ ข14 ผลการเพาะเลี้ยง B25 ใน M+S+Mo

ตารางผนวกที่ ข21 ผลการเพาะเลี้ยง B25 ใน Su+S+Mo

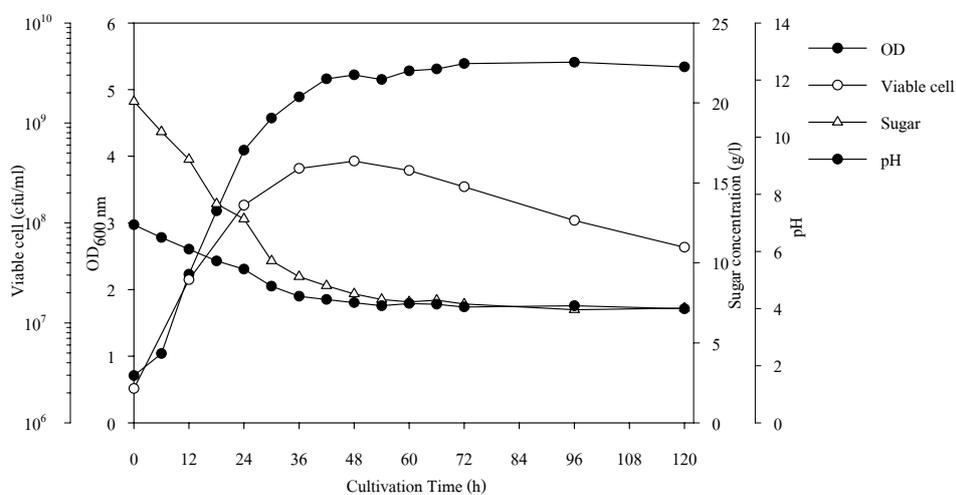
เวลา (ชั่วโมง)	pH	OD <sub>600 nm</sub>	Viable cell (cfu/ml)	Sugar (g/l)
0	5.79	0.66	$4.2 \times 10^6$	19.74
12	5.91	2.26	$5.2 \times 10^7$	15.45
24	6.27	4.45	$2.19 \times 10^8$	8.90
36	6.84	6.27	$9.1 \times 10^8$	3.78
48	7.33	6.58	$1.24 \times 10^9$	2.53
60	7.45	6.56	$1.03 \times 10^9$	1.80
72	7.46	6.47	$9.65 \times 10^8$	1.36
96	7.51	6.27	$7.8 \times 10^8$	1.49
120	7.56	6.11	$5.3 \times 10^8$	1.19



ภาพผนวกที่ ข15 ผลการเพาะเลี้ยง B25 ใน Su+S+Mo

ตารางผนวกที่ ข22 ผลการเพาะเลี้ยง B25 ใน Su+S+diAm

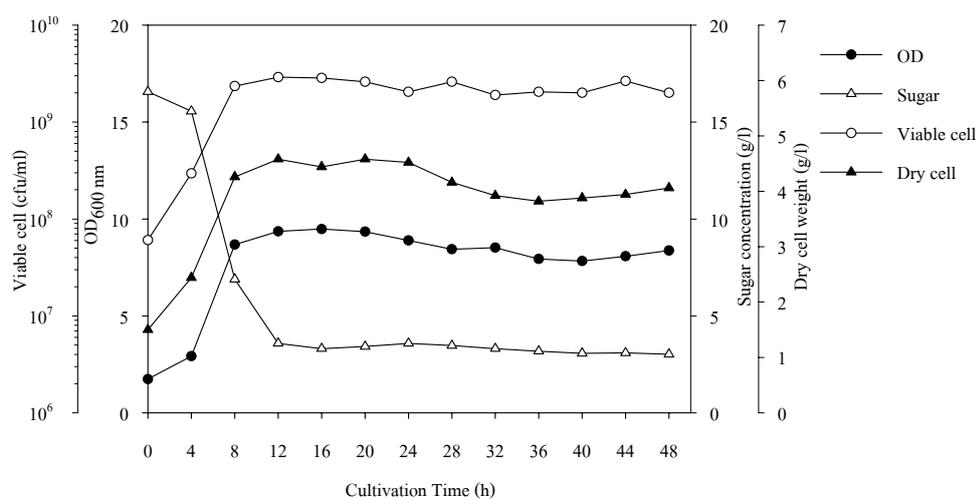
เวลา (ชั่วโมง)	pH	OD <sub>600 nm</sub>	Viable cell (cfu/ml)	Sugar (g/l)
0	6.93	0.71	$2.2 \times 10^6$	20.09
12	6.08	2.23	$2.7 \times 10^7$	16.46
24	5.38	4.09	$1.5 \times 10^8$	12.75
36	4.43	4.89	$3.5 \times 10^8$	9.14
48	4.21	5.22	$4.15 \times 10^8$	8.07
60	4.18	5.28	$3.3 \times 10^8$	7.56
72	4.06	5.39	$2.2 \times 10^8$	7.43
96	4.1	5.41	$1.06 \times 10^8$	7.08
120	3.99	5.34	$5.7 \times 10^7$	7.16



ภาพผนวกที่ ข16 ผลการเพาะเลี้ยง B25 ใน Su+S+diAm

ตารางผนวกที่ ข23 ผลการเพาะเลี้ยง B17 ในถังหมัก แบบควบคุมพีเอชที่ 5.0

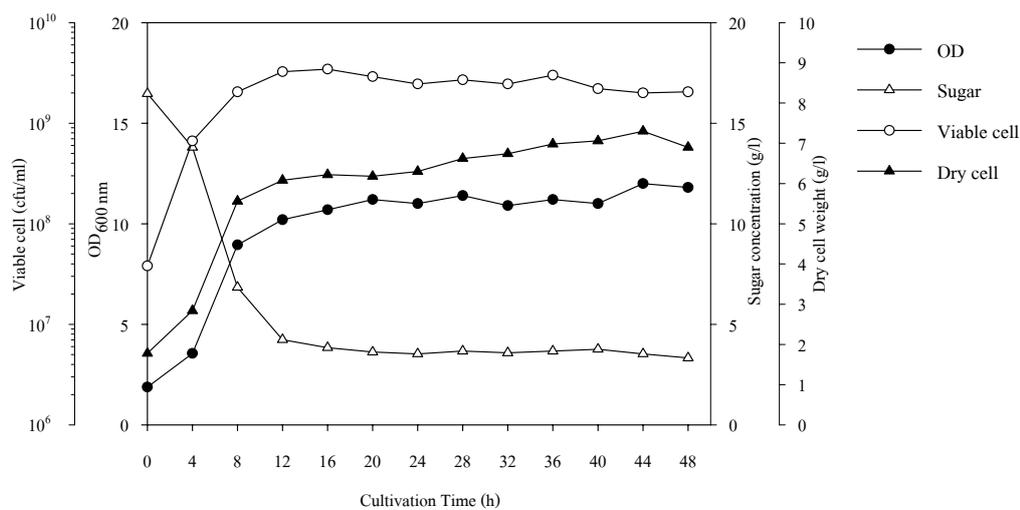
เวลา (ชั่วโมง)	OD <sub>600nm</sub>	Viable cell (cfu/ml)	Sugar (g/l)	Dry cell (g/l)
0	1.74	6.05x10 <sup>7</sup>	16.56	1.5
4	2.92	2.95x10 <sup>8</sup>	15.56	2.44
8	8.68	2.35x10 <sup>9</sup>	6.89	4.26
12	9.36	2.9x10 <sup>9</sup>	3.58	4.58
16	9.48	2.85x10 <sup>9</sup>	3.31	4.44
20	9.34	2.6x10 <sup>9</sup>	3.42	4.58
24	8.89	2.05x10 <sup>9</sup>	3.58	4.52
28	8.44	2.6x10 <sup>9</sup>	3.47	4.16
32	8.52	1.9x10 <sup>9</sup>	3.31	3.92
36	7.94	2.05x10 <sup>9</sup>	3.18	3.82
40	7.83	2.0x10 <sup>9</sup>	3.07	3.88
44	8.08	2.65x10 <sup>9</sup>	3.09	3.94
48	8.37	2.0x10 <sup>9</sup>	3.02	4.06



ภาพผนวกที่ ข17 ผลการเพาะเลี้ยง B17 ในถังหมัก แบบควบคุมพีเอชที่ 5.0

ตารางผนวกที่ ข24 ผลการเพาะเลี้ยง B17 ในถังหมัก แบบควบคุมพีเอชที่ 6.0

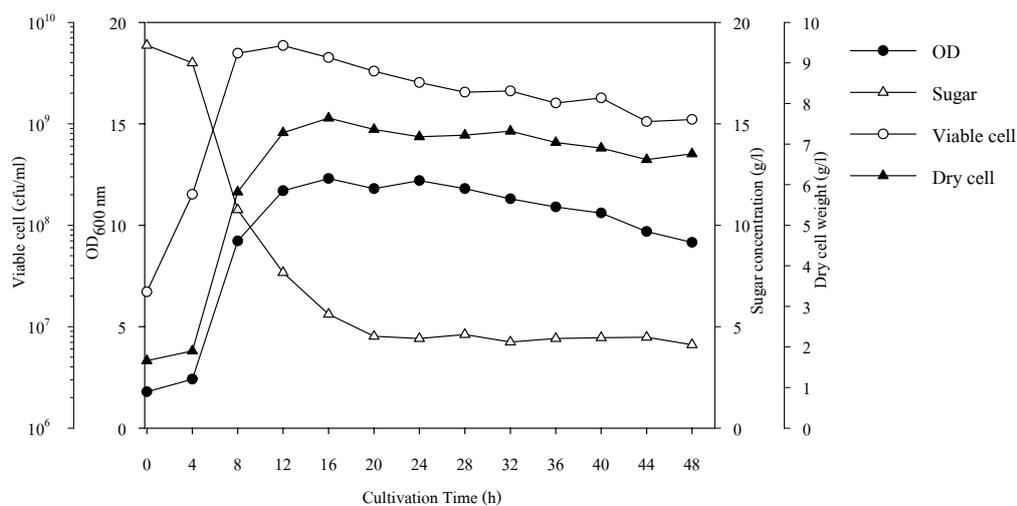
เวลา (ชั่วโมง)	OD <sub>600nm</sub>	Viable cell (cfu/ml)	Sugar (g/l)	Dry cell (g/l)
0	1.88	$3.8 \times 10^7$	16.47	1.78
4	3.55	$6.65 \times 10^8$	13.8	2.84
8	8.95	$2.05 \times 10^9$	6.84	5.56
12	10.2	$3.25 \times 10^9$	4.24	6.08
16	10.7	$3.45 \times 10^9$	3.84	6.22
20	11.2	$2.9 \times 10^9$	3.62	6.18
24	11	$2.45 \times 10^9$	3.53	6.3
28	11.4	$2.7 \times 10^9$	3.67	6.62
32	10.9	$2.45 \times 10^9$	3.58	6.74
36	11.2	$3.0 \times 10^9$	3.67	6.98
40	11	$2.2 \times 10^9$	3.76	7.06
44	12	$2.0 \times 10^9$	3.53	7.3
48	11.8	$2.05 \times 10^9$	3.33	6.9



ภาพผนวกที่ ข18 ผลการเพาะเลี้ยง B17 ในถังหมัก แบบควบคุมพีเอชที่ 6.0

ตารางผนวกที่ ข25 ผลการเพาะเลี้ยง B17 ในถังหมัก แบบควบคุมพีเอชที่ 7.0

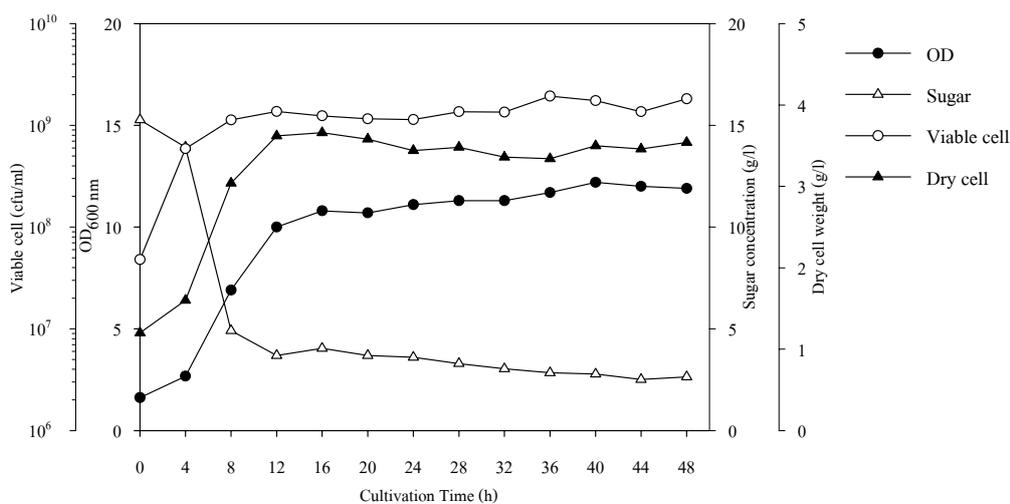
เวลา (ชั่วโมง)	OD <sub>600nm</sub>	Viable cell (cfu/ml)	Sugar (g/l)	Dry cell (g/l)
0	1.79	2.2x10 <sup>7</sup>	18.87	1.66
4	2.41	2.01x10 <sup>8</sup>	18	1.9
8	9.22	4.95x10 <sup>9</sup>	10.76	5.82
12	11.7	5.9x10 <sup>9</sup>	7.67	7.28
16	12.3	4.5x10 <sup>9</sup>	5.61	7.64
20	11.8	3.3x10 <sup>9</sup>	4.52	7.36
24	12.2	2.55x10 <sup>9</sup>	4.41	7.18
28	11.8	2.05x10 <sup>9</sup>	4.61	7.22
32	11.3	2.1x10 <sup>9</sup>	4.24	7.32
36	10.9	1.6x10 <sup>9</sup>	4.41	7.04
40	10.6	1.8x10 <sup>9</sup>	4.46	6.9
44	9.69	1.05x10 <sup>9</sup>	4.48	6.62
48	9.15	1.1x10 <sup>9</sup>	4.11	6.76



ภาพผนวกที่ ข19 ผลการเพาะเลี้ยง B17 ในถังหมัก แบบควบคุมพีเอชที่ 7.0

ตารางผนวกที่ ข26 ผลการเพาะเลี้ยง B21 ในถังหมัก แบบควบคุมพีเอชที่ 5.0

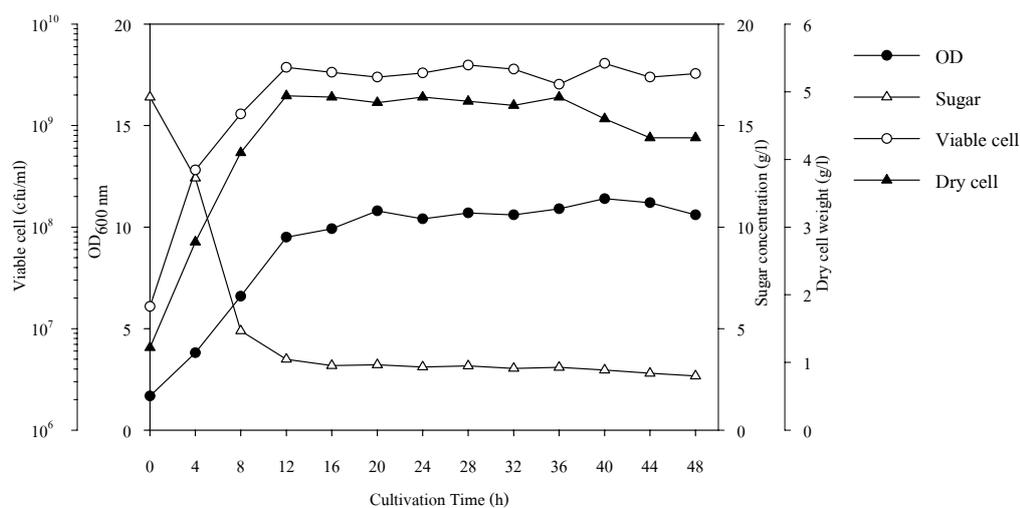
เวลา (ชั่วโมง)	OD <sub>600 nm</sub>	Viable cell (cfu/ml)	Sugar (g/l)	Dry cell (g/l)
0	1.62	$4.8 \times 10^7$	15.27	1.2
4	2.67	$5.9 \times 10^8$	13.93	1.6
8	6.9	$1.13 \times 10^9$	4.91	3.04
12	10	$1.37 \times 10^9$	3.69	3.62
16	10.8	$1.24 \times 10^9$	4.04	3.66
20	10.7	$1.16 \times 10^9$	3.69	3.58
24	11.1	$1.14 \times 10^9$	3.6	3.44
28	11.3	$1.36 \times 10^9$	3.29	3.48
32	11.3	$1.35 \times 10^9$	3.04	3.36
36	11.7	$1.94 \times 10^9$	2.84	3.34
40	12.2	$1.75 \times 10^9$	2.78	3.5
44	12	$1.36 \times 10^9$	2.51	3.46
48	11.9	$1.82 \times 10^9$	2.64	3.54



ภาพผนวกที่ ข20 ผลการเพาะเลี้ยง B21 ในถังหมัก แบบควบคุมพีเอชที่ 5.0

ตารางผนวกที่ ข27 ผลการเพาะเลี้ยง B21 ในถังหมัก แบบควบคุมพีเอชที่ 6.0

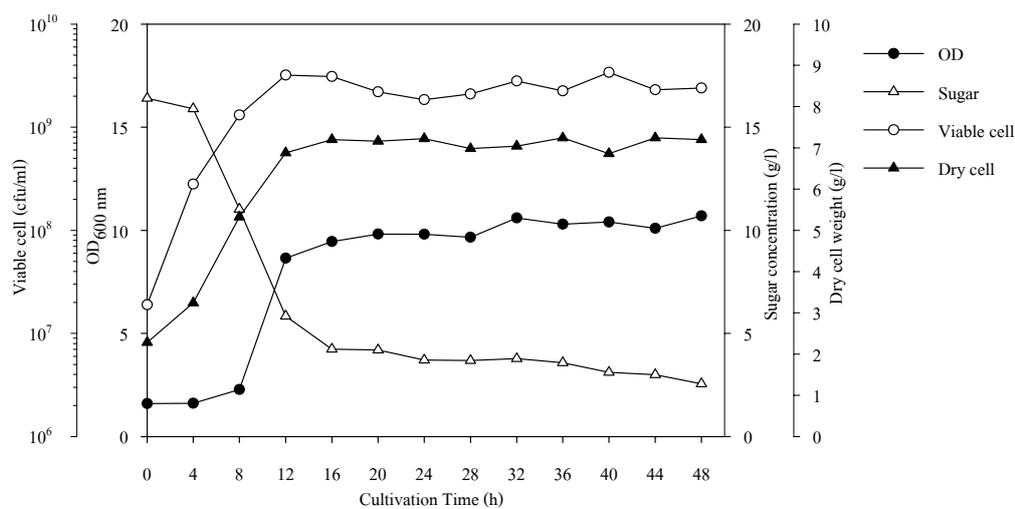
เวลา (ชั่วโมง)	OD <sub>600nm</sub>	Viable cell (cfu/ml)	Sugar (g/l)	Dry cell (g/l)
0	1.68	1.65x10 <sup>7</sup>	16.4	1.22
4	3.81	3.65x10 <sup>8</sup>	12.42	2.78
8	6.59	1.3x10 <sup>9</sup>	4.89	4.1
12	9.5	3.75x10 <sup>9</sup>	3.49	4.94
16	9.92	3.35x10 <sup>9</sup>	3.18	4.92
20	10.8	3.0x10 <sup>9</sup>	3.22	4.84
24	10.4	3.3x10 <sup>9</sup>	3.11	4.92
28	10.7	3.95x10 <sup>9</sup>	3.16	4.86
32	10.6	3.6x10 <sup>9</sup>	3.04	4.8
36	10.9	2.55x10 <sup>9</sup>	3.09	4.92
40	11.4	4.1x10 <sup>9</sup>	2.96	4.6
44	11.2	3.0x10 <sup>9</sup>	2.8	4.32
48	10.6	3.25x10 <sup>9</sup>	2.67	4.32



ภาพผนวกที่ ข21 ผลการเพาะเลี้ยง B21 ในถังหมัก แบบควบคุมพีเอชที่ 6.0

ตารางผนวกที่ ข28 ผลการเพาะเลี้ยง B21 ในถังหมัก แบบควบคุมพีเอชที่ 7.0

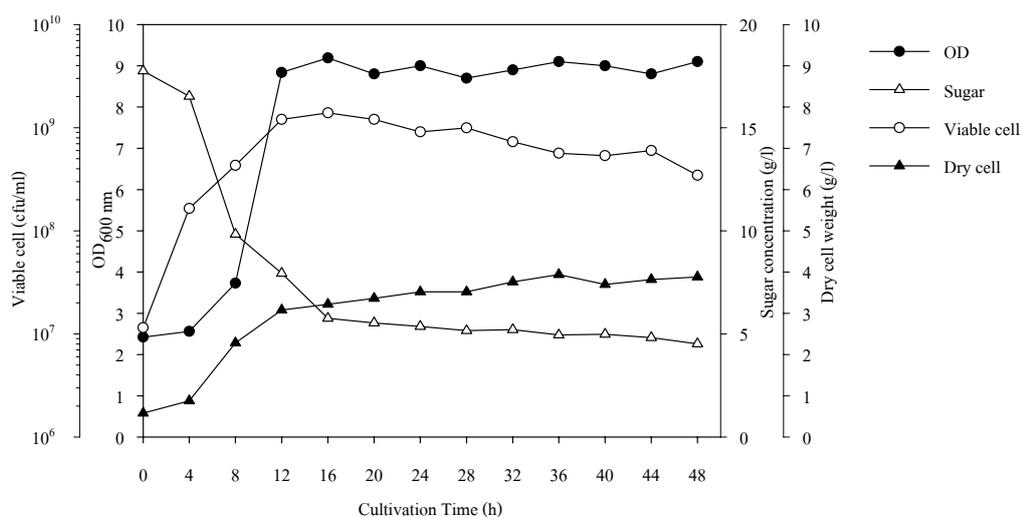
เวลา (ชั่วโมง)	OD <sub>600nm</sub>	Viable cell (cfu/ml)	Sugar (g/l)	Dry cell (g/l)
0	1.6	1.9x10 <sup>7</sup>	16.4	2.28
4	1.61	2.8x10 <sup>8</sup>	15.89	3.24
8	2.28	1.31x10 <sup>9</sup>	11.02	5.32
12	8.65	3.2x10 <sup>9</sup>	5.84	6.88
16	9.45	3.1x10 <sup>9</sup>	4.24	7.2
20	9.82	2.2x10 <sup>9</sup>	4.2	7.16
24	9.81	1.85x10 <sup>9</sup>	3.71	7.22
28	9.66	2.1x10 <sup>9</sup>	3.69	6.98
32	10.6	2.8x10 <sup>9</sup>	3.78	7.04
36	10.3	2.25x10 <sup>9</sup>	3.58	7.24
40	10.4	3.4x10 <sup>9</sup>	3.11	6.86
44	10.1	2.3x10 <sup>9</sup>	3	7.24
48	10.7	2.4x10 <sup>9</sup>	2.56	7.2



ภาพผนวกที่ ข22 ผลการเพาะเลี้ยง B21 ในถังหมัก แบบควบคุมพีเอชที่ 7.0

ตารางผนวกที่ ข29 ผลการเพาะเลี้ยง B25 ในถังหมัก แบบควบคุมพีเอชที่ 5.0

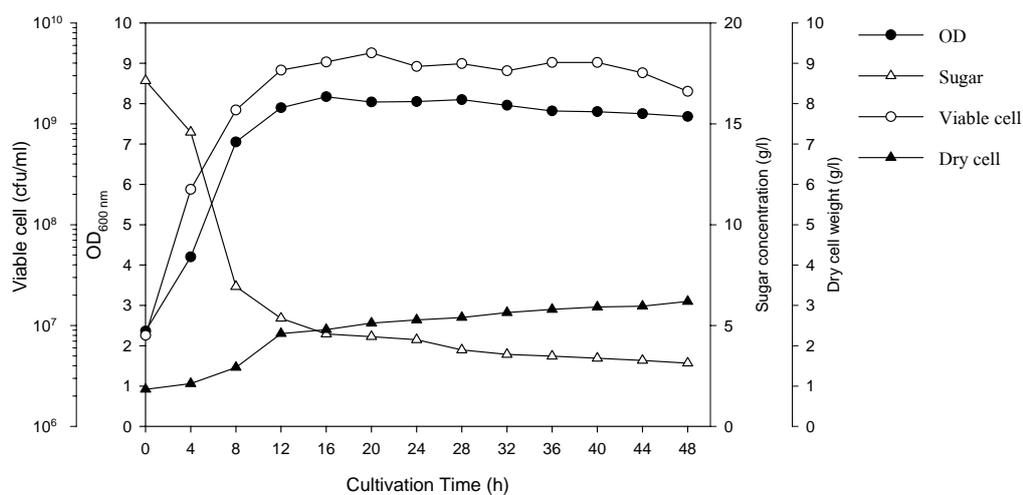
เวลา (ชั่วโมง)	OD <sub>600nm</sub>	Viable cell (cfu/ml)	Sugar (g/l)	Dry cell (g/l)
0	2.42	1.15x10 <sup>7</sup>	17.75	0.58
4	2.56	1.65x10 <sup>8</sup>	16.52	0.88
8	3.73	4.3x10 <sup>8</sup>	9.83	2.28
12	8.84	1.2x10 <sup>9</sup>	7.94	3.08
16	9.19	1.39x10 <sup>9</sup>	5.76	3.22
20	8.8	1.2x10 <sup>9</sup>	5.53	3.36
24	9	9.1x10 <sup>8</sup>	5.36	3.52
28	8.7	9.95x10 <sup>8</sup>	5.16	3.52
32	8.9	7.3x10 <sup>8</sup>	5.21	3.76
36	9.1	5.65x10 <sup>8</sup>	4.95	3.94
40	9	5.35x10 <sup>8</sup>	4.99	3.7
44	8.8	6.0x10 <sup>8</sup>	4.82	3.82
48	9.1	3.45x10 <sup>8</sup>	4.52	3.88



ภาพผนวกที่ ข23 ผลการเพาะเลี้ยง B25 ในถังหมัก แบบควบคุมพีเอชที่ 5.0

ตารางผนวกที่ ข30 ผลการเพาะเลี้ยง B25 ในถังหมัก แบบควบคุมพีเอชที่ 6.0

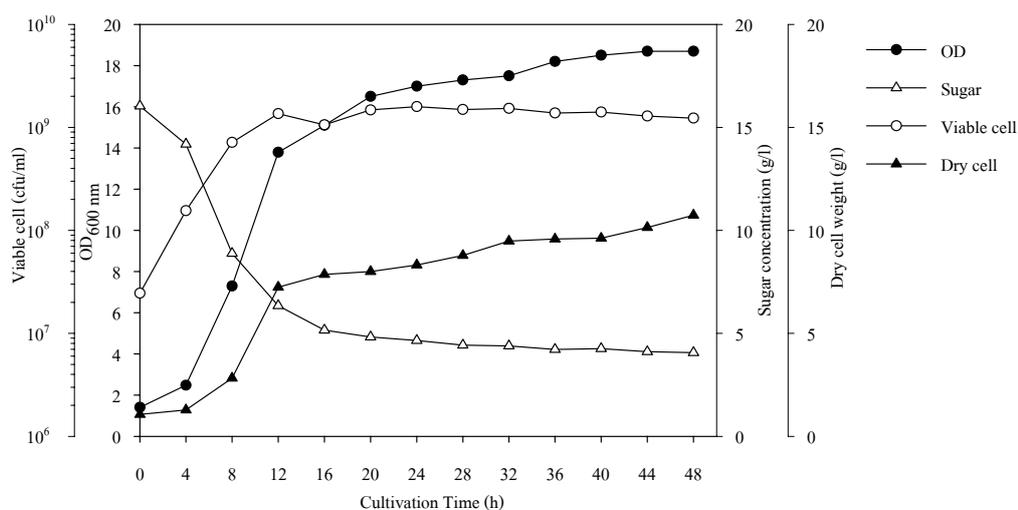
เวลา (ชั่วโมง)	OD <sub>600nm</sub>	Viable cell (cfu/ml)	Sugar (g/l)	Dry cell (g/l)
0	2.36	$8.0 \times 10^6$	17.14	0.92
4	4.2	$2.24 \times 10^8$	14.58	1.06
8	7.05	$1.37 \times 10^9$	6.93	1.46
12	7.9	$3.4 \times 10^9$	5.36	2.3
16	8.17	$4.1 \times 10^9$	4.58	2.4
20	8.04	$5.05 \times 10^9$	4.45	2.56
24	8.05	$3.7 \times 10^9$	4.3	2.64
28	8.1	$3.95 \times 10^9$	3.79	2.7
32	7.96	$3.35 \times 10^9$	3.57	2.82
36	7.82	$4.05 \times 10^9$	3.48	2.9
40	7.8	$4.05 \times 10^9$	3.38	2.96
44	7.75	$3.2 \times 10^9$	3.27	2.98
48	7.68	$2.1 \times 10^9$	3.14	3.1



ภาพผนวกที่ ข24 ผลการเพาะเลี้ยง B25 ในถังหมัก แบบควบคุมพีเอชที่ 6.0

ตารางผนวกที่ ข31 ผลการเพาะเลี้ยง B25 ในถังหมัก แบบควบคุมพีเอชที่ 7.0

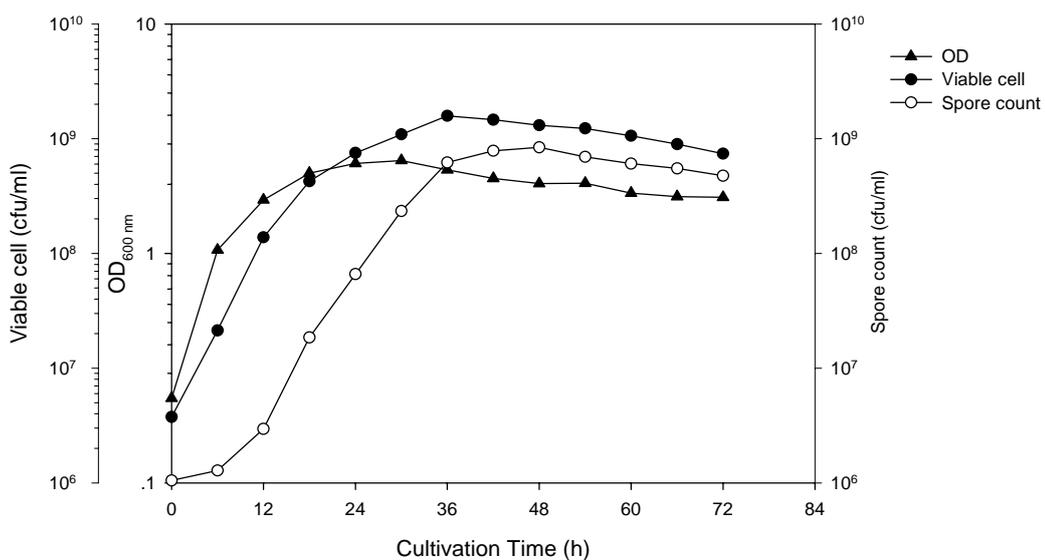
เวลา (ชั่วโมง)	OD <sub>600nm</sub>	Viable cell (cfu/ml)	Sugar (g/l)	Dry cell (g/l)
0	1.4	2.45x10 <sup>7</sup>	16.04	1.06
4	2.48	1.55x10 <sup>8</sup>	14.19	1.28
8	7.3	7.15x10 <sup>8</sup>	8.88	2.82
12	13.79	1.36x10 <sup>9</sup>	6.34	7.24
16	15.1	1.06x10 <sup>9</sup>	5.16	7.86
20	16.5	1.48x10 <sup>9</sup>	4.82	8
24	17	1.59x10 <sup>9</sup>	4.65	8.32
28	17.3	1.49x10 <sup>9</sup>	4.43	8.78
32	17.5	1.53x10 <sup>9</sup>	4.39	9.48
36	18.2	1.38x10 <sup>9</sup>	4.22	9.58
40	18.5	1.41x10 <sup>9</sup>	4.26	9.62
44	18.7	1.29x10 <sup>9</sup>	4.11	10.14
48	18.7	1.23x10 <sup>9</sup>	4.06	10.74



ภาพผนวกที่ ข25 ผลการเพาะเลี้ยง B25 ในถังหมัก แบบควบคุมพีเอชที่ 7.0

ตารางผนวกที่ ข32 ผลการเพาะเลี้ยง B17 ใน NB

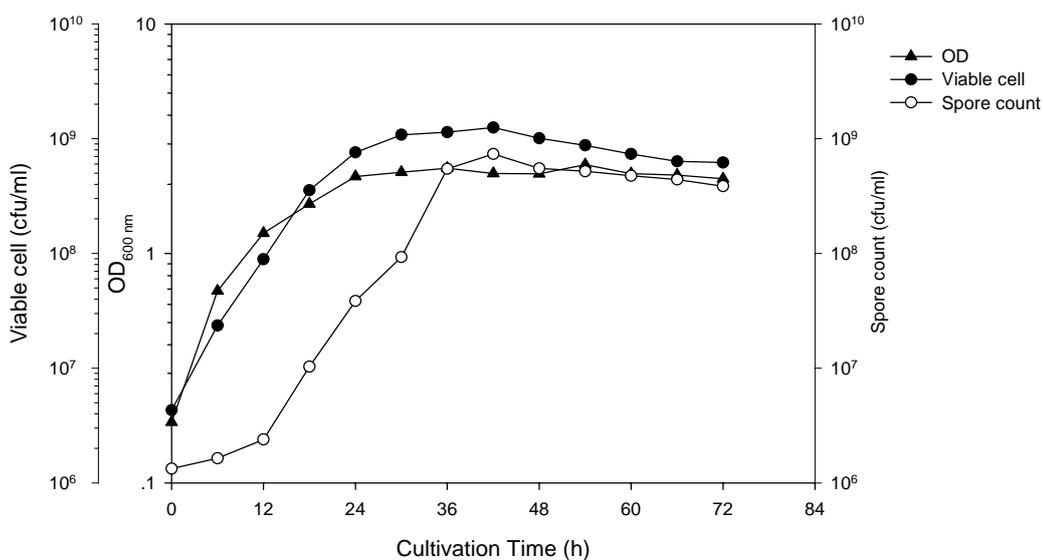
เวลา (ชั่วโมง)	OD <sub>600 nm</sub>	เซลล์มีชีวิต (cfu/ml)	สปอร์ (cfu/ml)
0	0.234	$3.75 \times 10^6$	$1.05 \times 10^6$
6	1.034	$2.13 \times 10^7$	$1.28 \times 10^6$
12	1.711	$1.38 \times 10^8$	$2.95 \times 10^6$
18	2.237	$4.25 \times 10^8$	$1.85 \times 10^7$
24	2.47	$7.5 \times 10^8$	$6.6 \times 10^7$
30	2.54	$1.09 \times 10^9$	$2.34 \times 10^8$
36	2.312	$1.58 \times 10^9$	$6.2 \times 10^8$
42	2.122	$1.46 \times 10^9$	$7.85 \times 10^8$
48	2.015	$1.31 \times 10^9$	$8.4 \times 10^8$
54	2.024	$1.23 \times 10^9$	$6.95 \times 10^8$
60	1.831	$1.06 \times 10^9$	$6.05 \times 10^8$
66	1.768	$8.95 \times 10^8$	$5.5 \times 10^8$
72	1.756	$7.4 \times 10^8$	$4.75 \times 10^8$



ภาพผนวกที่ ข26 ผลการเพาะเลี้ยง B17 ใน NB

ตารางผนวกที่ ข33 ผลการเพาะเลี้ยง B19 ใน NB

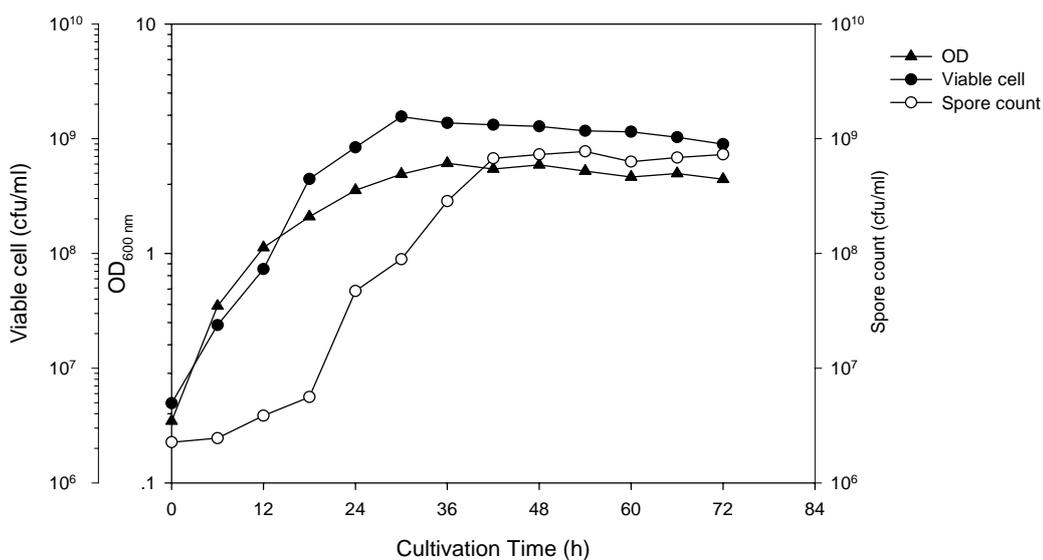
เวลา (ชั่วโมง)	OD <sub>600 nm</sub>	เซลล์มีชีวิต (cfu/ml)	สปอร์ (cfu/ml)
0	0.184	$4.3 \times 10^6$	$1.33 \times 10^6$
6	0.687	$2.35 \times 10^7$	$1.64 \times 10^6$
12	1.226	$8.9 \times 10^7$	$2.39 \times 10^6$
18	1.642	$3.55 \times 10^8$	$1.03 \times 10^7$
24	2.164	$7.6 \times 10^8$	$3.85 \times 10^7$
30	2.258	$1.08 \times 10^9$	$9.3 \times 10^7$
36	2.354	$1.14 \times 10^9$	$5.45 \times 10^8$
42	2.231	$1.25 \times 10^9$	$7.35 \times 10^8$
48	2.224	$1.01 \times 10^9$	$5.5 \times 10^8$
54	2.436	$8.75 \times 10^8$	$5.2 \times 10^8$
60	2.227	$7.35 \times 10^8$	$4.75 \times 10^8$
66	2.195	$6.35 \times 10^8$	$4.4 \times 10^8$
72	2.113	$6.2 \times 10^8$	$3.85 \times 10^8$



ภาพผนวกที่ ข27 ผลการเพาะเลี้ยง B19 ใน NB

ตารางผนวกที่ ข34 ผลการเพาะเลี้ยง B21 ใน NB

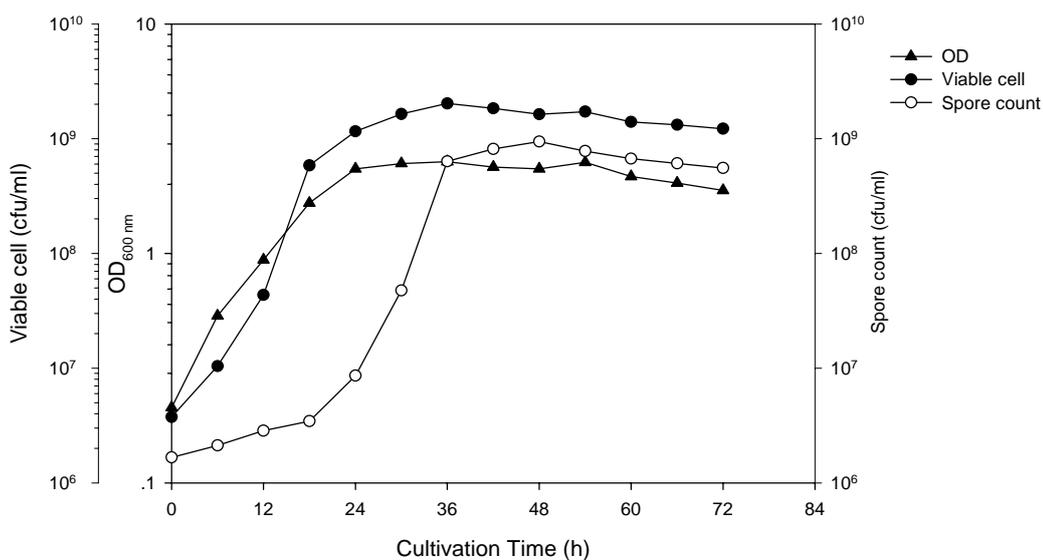
เวลา (ชั่วโมง)	OD <sub>600 nm</sub>	เซลล์มีชีวิต (cfu/ml)	สปอร์ (cfu/ml)
0	0.186	$4.95 \times 10^6$	$2.26 \times 10^6$
6	0.59	$2.37 \times 10^7$	$2.45 \times 10^6$
12	1.06	$7.3 \times 10^7$	$3.85 \times 10^6$
18	1.447	$4.45 \times 10^8$	$5.6 \times 10^6$
24	1.884	$8.4 \times 10^8$	$4.7 \times 10^7$
30	2.218	$1.56 \times 10^9$	$8.9 \times 10^7$
36	2.472	$1.37 \times 10^9$	$2.85 \times 10^8$
42	2.331	$1.32 \times 10^9$	$6.75 \times 10^8$
48	2.433	$1.28 \times 10^9$	$7.3 \times 10^8$
54	2.286	$1.17 \times 10^9$	$7.75 \times 10^8$
60	2.155	$1.15 \times 10^9$	$6.3 \times 10^8$
66	2.229	$1.03 \times 10^9$	$6.85 \times 10^8$
72	2.105	$8.95 \times 10^8$	$7.3 \times 10^8$



ภาพผนวกที่ ข28 ผลการเพาะเลี้ยง B21 ใน NB

ตารางผนวกที่ ข35 ผลการเพาะเลี้ยง B25 ใน NB

เวลา (ชั่วโมง)	OD <sub>600 nm</sub>	เซลล์มีชีวิต (cfu/ml)	สปอร์ (cfu/ml)
0	0.213	$3.75 \times 10^6$	$1.67 \times 10^6$
6	0.534	$1.04 \times 10^7$	$2.12 \times 10^6$
12	0.937	$4.35 \times 10^7$	$2.85 \times 10^6$
18	1.658	$5.85 \times 10^8$	$3.45 \times 10^6$
24	2.337	$1.16 \times 10^9$	$8.6 \times 10^6$
30	2.465	$1.64 \times 10^9$	$4.75 \times 10^7$
36	2.511	$2.03 \times 10^9$	$6.35 \times 10^8$
42	2.378	$1.84 \times 10^9$	$8.15 \times 10^8$
48	2.336	$1.63 \times 10^9$	$9.45 \times 10^8$
54	2.493	$1.72 \times 10^9$	$7.80 \times 10^8$
60	2.164	$1.4 \times 10^9$	$6.70 \times 10^8$
66	2.027	$1.32 \times 10^9$	$6.10 \times 10^8$
72	1.882	$1.22 \times 10^9$	$5.55 \times 10^8$



ภาพผนวกที่ ข29 ผลการเพาะเลี้ยง B25 ใน NB

ตารางผนวกที่ 36 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการทำแห้งแบบแผ่นฝอยของ B17

ลักษณะเฉพาะ	อาหารเลี้ยงเชื้อ	
	MSM	NB
1. ปริมาณเซลล์มีชีวิตก่อนการทำแห้ง (cfu/g of solids)	$9.30 \times 10^9$	$9.90 \times 10^9$
2. ปริมาณเซลล์มีชีวิตหลังการทำแห้ง (cfu/g of solids)	$1.24 \times 10^8$	$3.35 \times 10^8$
3. อัตราการรอดชีวิต (%)	1.33	3.38
4. ความชื้น (%)	3.14	3.48
5. กิจกรรมการยับยั้งก่อนการทำแห้ง (cm $\pm$ S.D.)	$1.43 \pm 0.11$	$1.49 \pm 0.02$
6. กิจกรรมการยับยั้งหลังการทำแห้ง (cm $\pm$ S.D.)	$1.51 \pm 0.02$	$1.53 \pm 0.04$

ตารางผนวกที่ 37 ผลของระยะเวลาการเติบโตต่อการทำแห้งแบบแผ่นฝอยของ B17

ลักษณะ	เวลาเพาะเลี้ยง		
	24 h	36 h	48 h
1. ปริมาณเซลล์มีชีวิตก่อนการทำแห้ง (cfu/g of solids)	$9.90 \times 10^9$	$6.90 \times 10^9$	$8.80 \times 10^9$
2. ปริมาณเซลล์มีชีวิตหลังการทำแห้ง (cfu/g of solids)	$3.35 \times 10^8$	$6.40 \times 10^8$	$7.75 \times 10^8$
3. อัตราการรอดตาย (%)	3.38	9.28	8.81
4. ความชื้น (%)	3.48	2.72	3.15
5. กิจกรรมการยับยั้ง <i>V. harveyi</i> VH05 ก่อนการทำแห้ง (cm $\pm$ S.D.)	$1.49 \pm 0.02$	$1.54 \pm 0.05$	$1.43 \pm 0.04$
6. กิจกรรมการยับยั้ง <i>V. harveyi</i> VH05 หลังการทำแห้ง (cm $\pm$ S.D.)	$1.53 \pm 0.04$	$1.40 \pm 0.07$	$1.48 \pm 0.04$

ตารางผนวกที่ 38 ผลของสารพาและสารป้องกันเซลล์ต่อการทำแห้งแบบพ่นฝอยของ B17

ลักษณะ	สารตัวพา		
	20% maltodextrin	20% milk powder	15% maltodextrin and 5% monosodium glutamate
1. ปริมาณเซลล์มีชีวิตก่อนการทำแห้ง (cfu/g of solids)	$7.80 \times 10^9$	$8.30 \times 10^9$	$8.90 \times 10^9$
2. ปริมาณเซลล์มีชีวิตหลังการทำแห้ง (cfu/g of solids)	$6.65 \times 10^8$	$5.95 \times 10^8$	$5.65 \times 10^9$
3. อัตราการรอดชีวิต (%)	8.53	7.17	63.48
4. ความชื้น (%)	3.27	3.66	3.19
5. กิจกรรมการยับยั้ง <i>V. harveyi</i> VH05 ก่อนการทำแห้ง (cm $\pm$ S.D.)	$1.43 \pm 0.04$	$1.5 \pm 0.00$	$1.49 \pm 0.02$
6. กิจกรรมการยับยั้ง <i>V. harveyi</i> VH05 หลังการทำแห้ง (cm $\pm$ S.D.)	$1.45 \pm 0.00$	$1.54 \pm 0.02$	$1.51 \pm 0.02$

ตารางผนวกที่ 39 ปริมาณ VH05 จากการใช้ผง B17 ยับยั้ง VH05 โดยวิธี co-culture

ปริมาณเชื้อ เริ่มต้น (cfu/ml)	ปริมาณ <i>V. harveyi</i> VH05 (cfu/ml)				
	เวลา (ชั่วโมง)				
ผง <i>Bacillus</i> spp.	0	12	24	36	48
B17					
10 <sup>5</sup>	6.5x10 <sup>2</sup>	-	4.0x10 <sup>2</sup>	2.05x10 <sup>3</sup>	5.45x10 <sup>4</sup>
10 <sup>6</sup>	5.5x10 <sup>2</sup>	-	-	-	-
10 <sup>7</sup>	6.5x10 <sup>2</sup>	-	-	-	-
กลุ่มควบคุม	5.5x10 <sup>2</sup>	6.65x10 <sup>4</sup>	1.83x10 <sup>6</sup>	1.06x10 <sup>8</sup>	1.86x10 <sup>8</sup>
10 <sup>5</sup>	4.9x10 <sup>4</sup>	3.8x10 <sup>6</sup>	1.24x10 <sup>8</sup>	1.46x10 <sup>8</sup>	1.28x10 <sup>8</sup>
10 <sup>6</sup>	4.35x10 <sup>4</sup>	1.31x10 <sup>6</sup>	9.3x10 <sup>7</sup>	7.6x10 <sup>7</sup>	1.18x10 <sup>8</sup>
10 <sup>7</sup>	4.6x10 <sup>4</sup>	-	-	-	2.0x10 <sup>2</sup>
กลุ่มควบคุม	6.25x10 <sup>4</sup>	3.75x10 <sup>6</sup>	1.35x10 <sup>8</sup>	3.25x10 <sup>8</sup>	1.67x10 <sup>8</sup>
10 <sup>5</sup>	5.85x10 <sup>6</sup>	1.14x10 <sup>8</sup>	2.23x10 <sup>8</sup>	2.49x10 <sup>8</sup>	1.39x10 <sup>8</sup>
10 <sup>6</sup>	4.35x10 <sup>6</sup>	9.6x10 <sup>7</sup>	2.12x10 <sup>8</sup>	1.95x10 <sup>8</sup>	1.26x10 <sup>8</sup>
10 <sup>7</sup>	5.9x10 <sup>6</sup>	3.95x10 <sup>6</sup>	4.7x10 <sup>7</sup>	7.5x10 <sup>7</sup>	8.05x10 <sup>7</sup>
กลุ่มควบคุม	3.85x10 <sup>6</sup>	1.15x10 <sup>8</sup>	5.0x10 <sup>8</sup>	3.85x10 <sup>8</sup>	1.58x10 <sup>8</sup>

ตารางผนวกที่ ข40 ปริมาณ B17 จากการใช้ผง B17 ยับยั้ง VH05 โดยวิธี co-culture

ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (cfu/ml)		ปริมาณ <i>Bacillus</i> spp. B17 (cfu/ml)				
<i>V. harveyi</i> VH05	<i>Bacillus</i> spp. B17	เวลา (ชั่วโมง)				
		0	12	24	36	48
10 <sup>2</sup>	10 <sup>5</sup>	5.60x10 <sup>5</sup>	2.10x10 <sup>7</sup>	1.73x10 <sup>8</sup>	3.10x10 <sup>8</sup>	3.95x10 <sup>8</sup>
	10 <sup>6</sup>	4.85x10 <sup>6</sup>	2.75x10 <sup>7</sup>	3.10x10 <sup>8</sup>	4.30x10 <sup>8</sup>	5.50x10 <sup>8</sup>
	10 <sup>7</sup>	4.65x10 <sup>7</sup>	1.24x10 <sup>7</sup>	4.75x10 <sup>8</sup>	5.45x10 <sup>8</sup>	7.10x10 <sup>8</sup>
10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	7.75x10 <sup>5</sup>	1.95x10 <sup>7</sup>	2.25x10 <sup>7</sup>	4.95x10 <sup>7</sup>	5.60x10 <sup>7</sup>
	10 <sup>6</sup>	5.65x10 <sup>6</sup>	1.25x10 <sup>7</sup>	4.5x10 <sup>7</sup>	6.20x10 <sup>7</sup>	5.70x10 <sup>7</sup>
	10 <sup>7</sup>	4.65x10 <sup>7</sup>	1.41x10 <sup>8</sup>	4.05x10 <sup>8</sup>	7.95x10 <sup>8</sup>	5.95x10 <sup>8</sup>
10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	5.30x10 <sup>5</sup>	5.50x10 <sup>6</sup>	1.03x10 <sup>8</sup>	1.25x10 <sup>8</sup>	1.10x10 <sup>8</sup>
	10 <sup>6</sup>	6.95x10 <sup>6</sup>	4.90x10 <sup>7</sup>	4.05x10 <sup>7</sup>	5.50x10 <sup>7</sup>	6.10x10 <sup>7</sup>
	10 <sup>7</sup>	6.80x10 <sup>7</sup>	3.40x10 <sup>8</sup>	5.85x10 <sup>8</sup>	8.95x10 <sup>8</sup>	9.50x10 <sup>8</sup>

ตารางผนวกที่ ข41 ผลของสารพา สารป้องกันเซลล์และอุณหภูมิต่อการรอดชีวิตของ B17 ในช่วงการเก็บรักษา

ระยะเวลา เก็บรักษา (เดือน)	ปริมาณเซลล์มีชีวิต (cfu/ml)					
	20% maltodextrin		20% milk powder		15% maltodextrin and 5% monosodium glutamate	
	4°C	30°C	4°C	30°C	4°C	30°C
0	6.65x10 <sup>8</sup>	6.65x10 <sup>8</sup>	5.95x10 <sup>8</sup>	5.95x10 <sup>8</sup>	5.65x10 <sup>9</sup>	5.65x10 <sup>9</sup>
1	6.30 x10 <sup>8</sup>	5.25x10 <sup>8</sup>	5.70x10 <sup>8</sup>	4.60x10 <sup>8</sup>	5.45x10 <sup>9</sup>	5.15x10 <sup>9</sup>
2	6.15x10 <sup>8</sup>	4.45x10 <sup>8</sup>	5.45x10 <sup>8</sup>	3.15x10 <sup>8</sup>	5.20x10 <sup>9</sup>	5.35x10 <sup>9</sup>
3	5.50x10 <sup>8</sup>	3.20x10 <sup>8</sup>	5.20x10 <sup>8</sup>	2.41x10 <sup>8</sup>	5.05x10 <sup>9</sup>	5.20x10 <sup>9</sup>
4	5.00x10 <sup>8</sup>	2.25x10 <sup>8</sup>	4.60x10 <sup>8</sup>	1.72x10 <sup>8</sup>	4.95x10 <sup>9</sup>	5.05x10 <sup>9</sup>
5	5.20x10 <sup>8</sup>	1.60x10 <sup>8</sup>	5.00x10 <sup>8</sup>	1.36x10 <sup>8</sup>	5.20x10 <sup>9</sup>	4.80x10 <sup>9</sup>
6	4.75x10 <sup>8</sup>	9.85x10 <sup>8</sup>	4.55x10 <sup>8</sup>	8.75x10 <sup>7</sup>	5.00x10 <sup>9</sup>	4.75x10 <sup>9</sup>

**ตารางผนวกที่ ข42** ผลของสารพา สารป้องกันเซลล์และอุณหภูมิต่อกิจกรรมการยับยั้งของ B17  
ในช่วงการเก็บรักษา

ระยะเวลา เก็บรักษา (เดือน)	กิจกรรมการยับยั้งก่อนการทำแห้ง (cm ± S.D.)					
	20% maltodextrin		20% milk powder		15% maltodextrin and 5% monosodium glutamate	
	4°C	30°C	4°C	30°C	4°C	30°C
0	1.45±0.00	1.45±0.00	1.54±0.02	1.54±0.02	1.51±0.02	1.51±0.02
1	1.51±0.02	1.49±0.02	1.46±0.05	1.44±0.05	1.54±0.02	1.49±0.02
2	1.46±0.05	1.46±0.05	1.40±0.04	1.43±0.04	1.51±0.02	1.51±0.02
3	1.45±0.00	1.49±0.02	1.36±0.05	1.39±0.02	1.53±0.04	1.46±0.05
4	1.50±0.00	1.43±0.00	1.35±0.07	1.40±0.00	1.48±0.04	1.48±0.04
5	1.43±0.04	1.39±0.02	1.39±0.02	1.38±0.00	1.49±0.02	1.45±0.00
6	1.45±0.04	1.39±0.02	1.40±0.04	1.38±0.04	1.48±0.04	1.50±0.00

**ตารางผนวกที่ ข43** ผลของสารพา สารป้องกันเซลล์และอุณหภูมิต่อปริมาณความชื้นของผง B17  
ในช่วงการเก็บรักษา

ระยะเวลา เก็บรักษา (เดือน)	ปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์)					
	20% maltodextrin		20% milk powder		15% maltodextrin and 5% monosodium glutamate	
	4°C	30°C	4°C	30°C	4°C	30°C
0	3.27	3.27	3.66	3.66	3.19	3.19
1	3.41	3.38	3.47	3.95	3.39	3.55
2	3.58	3.54	3.85	4.34	3.64	3.43
3	3.36	3.77	3.72	4.18	3.68	3.78
4	3.87	3.58	4.11	4.42	4.37	4.23
5	4.25	3.81	4.27	4.21	4.46	4.17
6	4.03	4.22	4.36	4.48	4.30	4.42

**ตารางผนวกที่ ๔4** ผลของ *Bacillus* spp. โดยวิธีเติมลงน้ำต่อปริมาณแบคทีเรียในตัวของกุ้งกุลาดำที่รอดชีวิต

กลุ่มควบคุม	ปริมาณแบคทีเรีย (cfu/g)	
	แบคทีเรียทั้งหมด	<i>Vibrio</i> spp.
<i>Bacillus</i> spp. B17	1.50x10 <sup>6</sup>	5.50x10 <sup>2</sup>
<i>Bacillus</i> spp. B19	2.00x10 <sup>6</sup>	7.50x10 <sup>2</sup>
<i>Bacillus</i> spp. B21	3.00x10 <sup>6</sup>	4.50x10 <sup>2</sup>
<i>Bacillus</i> spp. B25	1.50x10 <sup>6</sup>	6.50x10 <sup>2</sup>
กลุ่มควบคุมทำให้เกิดโรคด้วย <i>V. harveyi</i> VH05	8.00x10 <sup>5</sup>	2.10x10 <sup>4</sup>
กลุ่มควบคุมไม่ทำให้เกิดโรคด้วย <i>V. harveyi</i> VH05	4.00x10 <sup>5</sup>	2.00x10 <sup>3</sup>

**ตารางผนวกที่ 45** ผลของ *Bacillus* spp. โดยวิธีเติมลงน้ำต่อน้ำหนักกุ้งกุลาดำ

กลุ่มควบคุม	น้ำหนักกุ้ง / ตัว (g)	
	0 วัน	28 วัน
<i>Bacillus</i> spp. B17	8.33	10.21
<i>Bacillus</i> spp. B19	8.42	10.11
<i>Bacillus</i> spp. B21	8.52	10.20
<i>Bacillus</i> spp. B25	8.24	10.10
กลุ่มควบคุมทำให้เกิดโรคด้วย <i>V. harveyi</i> VH05	8.43	10.20
กลุ่มควบคุมไม่ทำให้เกิดโรคด้วย <i>V. harveyi</i> VH05	8.62	10.41

**ตารางผนวกที่ ๔6** ผลของ *Bacillus* spp. โดยวิธีเติมลงน้ำต่อการรอดชีวิตของกุ้งกุลาดำ

กลุ่มควบคุม	การรอดชีวิต (%)
<i>Bacillus</i> spp. B17	41.67
<i>Bacillus</i> spp. B19	33.33
<i>Bacillus</i> spp. B21	46.67
<i>Bacillus</i> spp. B25	40.00
กลุ่มควบคุมทำให้เกิดโรคด้วย <i>V. harveyi</i> VH05	33.33
กลุ่มควบคุมไม่ทำให้เกิดโรคด้วย <i>V. harveyi</i> VH05	100

ตารางผนวกที่ ข47 ผลของ *Bacillus* spp. โดยวิธีผสมอาหารต่อปริมาณแบคทีเรียในระดับของกุ้ง  
กุลาคำที่ตาย

กลุ่มควบคุม	ปริมาณแบคทีเรีย (cfu/g)	
	แบคทีเรียทั้งหมด	<i>Vibrio</i> spp.
<i>Bacillus</i> spp. B17 : $10^6$ (cfu/g)	$1.30 \times 10^6$	$5.9 \times 10^3$
$10^8$ (cfu/g)	$1.29 \times 10^7$	$1.85 \times 10^3$
<i>Bacillus</i> spp. B21 : $10^6$ (cfu/g)	$4.40 \times 10^6$	$7.00 \times 10^3$
$10^8$ (cfu/g)	$1.42 \times 10^7$	$2.05 \times 10^3$
<i>Bacillus</i> spp. B25 : $10^6$ (cfu/g)	$6.20 \times 10^6$	$2.14 \times 10^4$
$10^8$ (cfu/g)	$3.15 \times 10^7$	$3.80 \times 10^3$
กลุ่มควบคุมทำให้เกิดโรคด้วย <i>V. harveyi</i> VH05	$4.90 \times 10^6$	$4.65 \times 10^5$

ตารางผนวกที่ ข48 ผลของ *Bacillus* spp. โดยวิธีผสมอาหารต่อปริมาณแบคทีเรียในระดับของกุ้ง  
กุลาคำที่รอดชีวิต

กลุ่มควบคุม	ปริมาณแบคทีเรีย (cfu/g)	
	แบคทีเรียทั้งหมด	<i>Vibrio</i> spp.
<i>Bacillus</i> spp. B17 : $10^6$ (cfu/g)	$2.15 \times 10^6$	$7.50 \times 10^2$
$10^8$ (cfu/g)	$3.70 \times 10^7$	$2.50 \times 10^2$
<i>Bacillus</i> spp. B21 : $10^6$ (cfu/g)	$2.55 \times 10^6$	$3.00 \times 10^2$
$10^8$ (cfu/g)	$1.02 \times 10^7$	$2.00 \times 10^2$
<i>Bacillus</i> spp. B25 : $10^6$ (cfu/g)	$4.30 \times 10^6$	$5.00 \times 10^2$
$10^8$ (cfu/g)	$2.16 \times 10^7$	$3.50 \times 10^2$
กลุ่มควบคุมทำให้เกิดโรคด้วย <i>V. harveyi</i> VH05	$2.30 \times 10^6$	$1.60 \times 10^4$
กลุ่มควบคุมไม่ทำให้เกิดโรคด้วย <i>V. harveyi</i> VH05	$5.00 \times 10^5$	$2.30 \times 10^3$

ตารางผนวกที่ ข49 ผลของ *Bacillus* spp. โดยวิธีผสมอาหารต่อน้ำหนักกึ่งกุลาดำ

กลุ่มควบคุม	น้ำหนักกึ่ง / ตัว (g)	
	0 วัน	28 วัน
<i>Bacillus</i> spp. B17 : $10^6$ (cfu/g)	8.04	9.83
$10^8$ (cfu/g)	7.93	10.32
<i>Bacillus</i> spp. B21 : $10^6$ (cfu/g)	8.23	10.13
$10^8$ (cfu/g)	7.81	10.10
<i>Bacillus</i> spp. B25 : $10^6$ (cfu/g)	7.91	9.71
$10^8$ (cfu/g)	8.32	10.84
กลุ่มควบคุมทำให้เกิดโรคด้วย <i>V. harveyi</i> VH05	8.13	10.03
กลุ่มควบคุมไม่ทำให้เกิดโรคด้วย <i>V. harveyi</i> VH05	8.22	10.02

ตารางผนวกที่ ข50 ผลของ *Bacillus* spp. โดยวิธีผสมอาหารต่อการรอดชีวิตของกึ่งกุลาดำ

กลุ่มควบคุม	การรอดชีวิต (%)
<i>Bacillus</i> spp. B17 : $10^6$ (cfu/g)	57.14
$10^8$ (cfu/g)	76.92
<i>Bacillus</i> spp. B21 : $10^6$ (cfu/g)	50.00
$10^8$ (cfu/g)	66.67
<i>Bacillus</i> spp. B25 : $10^6$ (cfu/g)	43.75
$10^8$ (cfu/g)	58.33
กลุ่มควบคุมทำให้เกิดโรคด้วย <i>V. harveyi</i> VH05	30.77
กลุ่มควบคุมไม่ทำให้เกิดโรคด้วย <i>V. harveyi</i> VH05	100

ตารางผนวกที่ ข51 ผลของผง B17 ต่อปริมาณแบคทีเรียในตัวของกุ้งกุลาดำที่ตาย

กลุ่มควบคุม	ปริมาณแบคทีเรีย (cfu/g)	
	แบคทีเรียทั้งหมด	<i>Vibrio</i> spp.
<i>Bacillus</i> spp. B17 : $10^6$ (cfu/g)	$3.65 \times 10^6$	$7.65 \times 10^3$
$10^8$ (cfu/g)	$7.15 \times 10^7$	$4.25 \times 10^3$
กลุ่มควบคุมทำให้เกิดโรคด้วย <i>V. harveyi</i> VH05	$1.96 \times 10^6$	$2.42 \times 10^5$

ตารางผนวกที่ ข52 ผลของผง B17 ต่อปริมาณแบคทีเรียในตัวของกุ้งกุลาดำที่รอดชีวิต

กลุ่มควบคุม	ปริมาณแบคทีเรีย (cfu/g)	
	แบคทีเรียทั้งหมด	<i>Vibrio</i> spp.
<i>Bacillus</i> spp. B17 : $10^6$ (cfu/g)	$4.45 \times 10^6$	$9.50 \times 10^2$
$10^8$ (cfu/g)	$1.10 \times 10^7$	$4.50 \times 10^2$
กลุ่มควบคุมทำให้เกิดโรคด้วย <i>V. harveyi</i> VH05	$2.49 \times 10^6$	$5.70 \times 10^4$
กลุ่มควบคุมไม่ทำให้เกิดโรคด้วย <i>V. harveyi</i> VH05	$3.15 \times 10^5$	$6.45 \times 10^3$

ตารางผนวกที่ ข53 ผลของผง B17 ต่อน้ำหนักกุ้งกุลาดำ

กลุ่มควบคุม	น้ำหนักกุ้ง / ตัว (g)	
	0 วัน	28 วัน
<i>Bacillus</i> spp. B17 : $10^6$ (cfu/g)	8.82	10.52
$10^8$ (cfu/g)	8.52	10.92
กลุ่มควบคุมทำให้เกิดโรคด้วย <i>V. harveyi</i> VH05	8.43	10.41
กลุ่มควบคุมไม่ทำให้เกิดโรคด้วย <i>V. harveyi</i> VH05	8.62	10.52

ตารางผนวกที่ ข54 ผลของผง B17 ต่อการรอดชีวิตของกิ้งกูดำ

กลุ่มควบคุม	การรอดชีวิต (%)
<i>Bacillus</i> spp. B17 : $10^6$ (cfu/g)	54.55
$10^8$ (cfu/g)	70.83
กลุ่มควบคุมทำให้เกิดโรคด้วย <i>V. harveyi</i> VH05	21.74
กลุ่มควบคุมไม่ทำให้เกิดโรคด้วย <i>V. harveyi</i> VH05	100

ตารางผนวกที่ ข 55 ผลการจัดจำแนก B17 ด้วยระบบจัดจำแนกชนิดจุลินทรีย์ เอ พี ไอ

คุณสมบัติ	ผลของปฏิกิริยา
Gram reaction	+
Fermentative production of acid from:	
- glycerol	-
- erythritol	-
- D-arabinose	-
- L-arabinose	+
- ribose	+
- D-xylose	+
- L-xylose	-
- adonitol	-
- $\beta$ -methyl-D-xyloside	-
- galactose	-
- D- glucose	+
- D- fructose	+
- D- mannose	+
- L- sorbose	-
- rhamnose	-
- dulcitol	-
- inositol	-
- manitol	+
- sorbitol	+
- $\alpha$ -methyl-D-mannoside	-
- $\alpha$ -methyl-D-glucoside	+
- N-acetyl-glucosamine	+
- amygdaline	+
- arbutine	+
- esculine	+

ตารางผนวกที่ ข 55 (ต่อ)

คุณสมบัติ	ผลของปฏิกิริยา
Fermentative production of acid from:	
- salicine	+
- cellobiose	+
- maltose	+
- lactose	-
- melibiose	-
- sucrose	+
- trehalose	+
- inuline	+
- melezitose	-
- D-raffinose	-
- starch	+
- glycogene	+
- xylitol	-
- $\beta$ -gentiobiose	+
- D-turanose	-
- D-lyxose	-
- D-tagatose	-
- D-fucose	-
- L-fucose	-
- D-arabitol	-
- L-arabitol	-
- gluconate	+
- 2-ketogluconate	-
- 2-ketogluconate	-

ตารางผนวกที่ ข 56 ผลการจัดจำแนก B19 ด้วยระบบจัดจำแนกชนิดจุลินทรีย์ เอ พี ไอ

คุณสมบัติ	ผลของปฏิกิริยา
Gram reaction	+
Fermentative production of acid from:	
- glycerol	+
- erythritol	-
- D-arabinose	-
- L-arabinose	+
- ribose	+
- D-xylose	+
- L-xylose	-
- adonitol	-
- $\beta$ -methyl-D-xyloside	-
- galactose	-
- D- glucose	+
- D- fructose	+
- D- mannose	+
- L- sorbose	-
- rhamnose	+
- dulcitol	-
- inositol	-
- manitol	+
- sorbitol	-
- $\alpha$ -methyl-D-mannoside	+
- $\alpha$ -methyl-D-glucoside	-
- N-acetyl-glucosamine	+
- amygdaline	+
- arbutine	+
- esculine	+

ตารางผนวกที่ ข 56 (ต่อ)

คุณสมบัติ	ผลของปฏิกิริยา
Fermentative production of acid from:	
- salicine	+
- cellobiose	+
- maltose	+
- lactose	-
- melibiose	-
- sucrose	+
- trehalose	+
- inuline	-
- melezitose	-
- D-raffinose	-
- starch	-
- glycogene	-
- xylitol	-
- $\beta$ -gentiobiose	+
- D-turanose	+
- D-lyxose	-
- D-tagatose	+
- D-fucose	-
- L-fucose	-
- D-arabitol	-
- L-arabitol	-
- gluconate	-
- 2-ketogluconate	-
- 2-ketogluconate	-

ตารางผนวกที่ ข 57 ผลการจัดจำแนก B21 ด้วยระบบจัดจำแนกชนิดจุลินทรีย์ เอ พี ไอ

คุณสมบัติ	ผลของปฏิกิริยา
Gram reaction	+
Fermentative production of acid from:	
- glycerol	-
- erythritol	-
- D-arabinose	-
- L-arabinose	+
- ribose	+
- D-xylose	+
- L-xylose	-
- adonitol	-
- $\beta$ -methyl-D-xyloside	-
- galactose	-
- D- glucose	+
- D- fructose	+
- D- mannose	+
- L- sorbose	-
- rhamnose	-
- dulcitol	-
- inositol	-
- manitol	+
- sorbitol	+
- $\alpha$ -methyl-D-mannoside	-
- $\alpha$ -methyl-D-glucoside	+
- N-acetyl-glucosamine	+
- amygdaline	+
- arbutine	+
- esculine	+

ตารางผนวกที่ ข 57 (ต่อ)

คุณสมบัติ	ผลของปฏิกิริยา
Fermentative production of acid from:	
- salicine	+
- cellobiose	+
- maltose	+
- lactose	-
- melibiose	-
- sucrose	+
- trehalose	+
- inuline	+
- melezitose	-
- D-raffinose	-
- starch	+
- glycogene	+
- xylitol	-
- $\beta$ -gentiobiose	+
- D-turanose	-
- D-lyxose	-
- D-tagatose	-
- D-fucose	-
- L-fucose	-
- D-arabitol	-
- L-arabitol	-
- gluconate	+
- 2-ketogluconate	-
- 2-ketogluconate	-

ตารางผนวกที่ ข 58 ผลการจัดจำแนก B25 ด้วยระบบจัดจำแนกชนิดจุลินทรีย์ เอ พี ไอ

คุณสมบัติ	ผลของปฏิกิริยา
Gram reaction	+
Fermentative production of acid from:	
- glycerol	+
- erythritol	-
- D-arabinose	-
- L-arabinose	+
- ribose	+
- D-xylose	+
- L-xylose	-
- adonitol	-
- $\beta$ -methyl-D-xyloside	-
- galactose	+
- D- glucose	+
- D- fructose	+
- D- mannose	-
- L- sorbose	-
- rhamnose	-
- dulcitol	-
- inositol	+
- manitol	+
- sorbitol	+
- $\alpha$ -methyl-D-mannoside	-
- $\alpha$ -methyl-D-glucoside	+
- N-acetyl-glucosamine	-
- amygdaline	+
- arbutine	+
- esculine	+

ตารางผนวกที่ ข 58 (ต่อ)

คุณสมบัติ	ผลของปฏิกิริยา
Fermentative production of acid from:	
- salicine	+
- cellobiose	+
- maltose	+
- lactose	+
- melibiose	+
- sucrose	+
- trehalose	+
- inuline	-
- melezitose	-
- D-raffinose	+
- starch	+
- glycogene	+
- xylitol	-
- $\beta$ -gentiobiose	+
- D-turanose	+
- D-lyxose	-
- D-tagatose	-
- D-fucose	-
- L-fucose	-
- D-arabitol	-
- L-arabitol	-
- gluconate	-
- 2-ketogluconate	-
- 2-ketogluconate	-

## ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล	วิชัย ดำรงโภคภัณฑ์
วัน เดือน ปี ที่เกิด	13 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2514
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (วิทยาศาสตรสุภาพ) มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยศิลปากร
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ทุนการศึกษา	ทุนพัฒนาอาจารย์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ
ผลงานตีพิมพ์	วิทยาสารเกษตรศาสตร์ สาขาวิทยาศาสตร์ ปีที่ 40 ฉบับที่ 4 พ.ศ. 2549