# การใช้แบคทีเรียเป็นโพรไบโอติกเสริมในอาหารกุ้ง

นางสาววรรนิภา เพี้ยนภักดร์

วิทยานิพนธ์เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาจุลชีววิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2539

ISBN 974-636-513-9

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I18643909

# USE OF BACTERIA AS PROBIOTICS SUPPLEMENT IN SHRIMP FEED

Miss Wannipa Phianphak

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Sciences

Department of Microbiology

Gradute School

Chulalongkorn University

Academic Year 1996

ISBN 974-635-513-9

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

| | |
|---|---|
| หัวข้อวิทยานิพนธ์ | การใช้แบคทีเรียเป็นโพรไบโอติกเสริมในอาหารกุ้ง |
| โดย | นางสาววรรนิภา เพี้ยนภักตร์ |
| ภาควิชา | จุลชีววิทยา |
| อาจารย์ที่ปรึกษา | ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ |

---

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....รักษาราชการแทนคณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ศุภวัฒน์ ชุติวงศ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ส่งศรี กุลปรีชา )

.....อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

.....กรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร.เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สมเกียรติ ปิยะธีรชิติวรกุล)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. หรรษา ปุณณะพยัคฆ์)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

วรรนิภา เพี้ยนภักดร์ : การใช้แบคทีเรียเป็นโพรไบโอติกเสริมในอาหารกุ้ง (USE OF BACTERIA AS PROBIOTICS SUPPLEMENT IN SHRIMP FEED)
อ. ที่ปรึกษา : ผศ.ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ ; 123 หน้า. ISBN 974-635-513-9.

ได้แยกแบคทีเรียจากตัวอย่างกุ้งกุลาดำบริเวณทางเดินอาหารและน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง สามารถนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในทางเดินอาหารกุ้งได้ $1.2x10^{8}$-$3.4x10^{7}$ cfu/gm และในน้ำมีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด $1.0x10^{6}$-$4.4x10^{5}$ cfu/ml แบคทีเรียประจำถิ่นในทางเดินอาหารของกุ้งที่แยกได้จัดอยู่ในสกุล Bacillus sp., Vibrio sp., Aeromonas sp., Pseudomonas sp., Klebsiella sp. และ Staphylococcus sp. จากแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมดสามารถคัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบบางสายพันธุ์ที่ก่อโรคในคนคือ Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Bacillus megaterium, Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus และ Escherichia coli และก่อโรคในกุ้งคือ Pseudomonas aeruginosa, Aeromonas hydrophila, Vibrio alginolyticus, Vibrio anguillarum, Vibrio harveyi, Vibrio parahaemolyticus และ Vibrio cholera ได้ 1 สายพันธุ์คือ Bacillus S11 ซึ่งสามารถสร้างสารต่อต้านจุลชีพได้ดีในช่วงการเจริญในระยะ late log phase และ stationary phase เมื่อนำ Bacillus S11 มาตรวจสอบสมบัติ รูปร่าง ลักษณะและสมบัติทางชีวเคมีสามารถจำแนกได้ว่า Bacillus S11 เป็น Bacillus mycoides เมื่อนำ Bacillus S11 ที่มีสมบัติเป็นโพรไบโอติกมาผสมในอาหารกุ้งกุลาดำและเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำในระบบน้ำหมุนเวียนแบบปิดเป็นเวลา 100 วัน พบว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารที่ผสม Bacillus S11 จะมีการเจริญเติบโตและมีอัตราการรอดมากกว่ากุ้งกุลาดำที่ไม่ได้รับอาหารที่ผสม Bacillus S11 อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) กุ้งกุลาดำในกลุ่ม Control มีอัตราการเจริญเติบโตโดยวัดน้ำหนักได้เท่ากับ 0.73 กรัมต่อ 21 วัน มีอัตราการรอด 15.8% ส่วนในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม Bacillus S11 ในรูปแบบ Fresh cells, Fresh cells in NSS และ Lyophilized cells มีอัตราการเจริญเติบโตโดยวัดน้ำหนักได้เท่ากับ 1.29, 1.17 และ 1.16 กรัมต่อ 21 วัน และมีอัตราการรอด 38.3, 31.6 และ 30.0% ตามลำดับ หลังจากนำมาทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคจาก Vibrio harveyi เป็นเวลา 10 วัน พบว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารที่ผสม Bacillus S11 มีอัตราการรอด 100% ส่วนกลุ่มที่ไม่ได้รับอาหารที่ผสม Bacillus S11 มีอัตราการรอด 26% เมื่อทดสอบทางสถิติโดยใช้ Duncan's multiple range test พบว่ามีระดับความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ 0.05

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต วรรนิภา เพี้ยนภักดร์

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์

ปีการศึกษา 2539 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม -

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

## C726469 : MAJOR MICROBIOLOGY
KEY WORD: PROBIOTICS / Bacillus sp. / SHRIMP
WANNIPA PHIANPHAK : USE OF BACTERIA AS PROBIOTICS SUPPLEMENT IN SHRIMP FEED. THESIS ADVISOR : ASSIST. PROF. SIRIRAT RENGPIPAT, Ph.D. 123pp. ISBN 974-635-513-9.

Total bacterial count from Gastrointestinal tract (GI tract) of Black tiger shrimp and their culture water were $1.2x10^{6}$ - $3.4x10^{7}$ cfu/gm and $1.0x10^{4}$-$4.4x10^{5}$ cfu/ml, respectively. Bacterial flora of their GI tract found were Bacillus sp., Vibrio sp., Aeromonas sp., Pseudomonas sp., Klebsiella sp. and Staphylococcus sp. Among them only Bacillus S11 has the ability of inhibiting some strain's growth of pathogenic bacteria to human ; such as, Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Bacillus megaterium, Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus and Escherichia coli and pathogenic bacteria to shrimp; such as, Pseudomonas aeruginosa, Aeromonas hydrophila, Vibrio alginolyticus, Vibrio anguillarum, Vibrio harveyi, Vibrio parahaemolyticus and Vibrio cholera. Bacillus S11 clearly produced antimicrobial substance starting from the late log to stationary phases of their growth. After the examination of morphology and biochemical test, Bacillus S11 was tentatively identified as Bacillus mycoides. Being probiotics, Bacillus S11 was mixed in shrimp feed for feeding Black tiger shrimp in closed recirculating water system and it was found that growth and survival rate of shrimp fed with probiotics were higher than those without probiotics feeding significantly at the level of $p<0.05$. The growth rate of shrimps in control group and treated group of Bacillus S11 in the pattern of Fresh cells, Fresh cells in NSS and Lyophilized cells within 21 days were 0.78, 1.29, 1.17 and 1.16 grams, respectively. Whereas, their survival rate at the end of the experiment were 15.8, 38.3, 31.6 and 30.0%, consecutively. After challenging the control and the treated group with Vibrio harveyi 10 days their survival rate were 20% and 100%, respectively, with the significant difference of $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต วรรณิภา เพียนภักดี

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ศิริรัตน์ เรืองพิพัฒน์

ปีการศึกษา 2539 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม -

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการเมธีวิจัยอาวุโส สกว. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต ในโครงการเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล เพื่อการพัฒนาที่ยั่งยืน : การปรับปรุงกระบวนการผลิตพันธุ์กุ้งที่มีคุณภาพ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ลงได้โดยได้รับความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ ที่ได้ให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็น และช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร. สงศรี กุลปรีชา ศ.ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต ผศ.ดร.สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล และ ผศ.ดร. หรรษา ปุณณะพยัคฆ์ ที่กรุณาเป็นคณะกรรมการในการสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณหัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา ที่ได้กรุณาเอื้อเฟื้อสถานที่ และเครื่องมือในการทำงานวิจัย ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยา รวมทั้งเพื่อนๆ และ น้องๆ ที่ได้มีส่วนช่วยเหลือให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณหน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเลที่ได้กรุณาเอื้อเฟื้อสถานที่ อุปกรณ์ สารเคมี ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ของหน่วยปฏิบัติการฯ รวมทั้งเพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ที่ได้มีส่วนช่วยเหลือให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณโครงการเมธีวิจัยอาวุโส สกว. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต ที่ให้ทุนอุดหนุนงานวิจัยนี้

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา พี่น้อง ที่ได้ให้กำลังใจช่วยเหลือสนับสนุน ตั้งแต่เริ่มต้นจนเสร็จสมบูรณ์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ
กิตติกรรมประกาศ.....ฉ
สารบัญ.....ช
สารบัญตาราง.....ช
สารบัญรูป.....ฌ
คำย่อ.....ฎ
บทที่
1. บทนำ.....1
2. วารสารปริทัศน์.....4
3. อุปกรณ์และวิธีการทดลอง.....24
4. ผลการทดลอง.....39
5. อภิปรายผลการทดลอง.....74
6. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....85
รายการอ้างอิง.....87
ภาคผนวก ก.....95
ภาคผนวก ข.....102
ภาคผนวก ค.....105
ภาคผนวก ง.....106
ภาคผนวก จ.....107
ประวัติผู้เขียน.....123

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 สมบัติและกลไกการออกฤทธิ์ของโพรไบโอติกและสารปฏิชีวนะ.....14

2 แบคทีเรียที่ใช้เป็นโพรไบโอติกในสุกร.....15

3 แบคทีเรียที่ใช้เป็นโพรไบโอติกในไก่.....17

4 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำและน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้ง.....40

5 ชนิดและจำนวนแบคทีเรียประจำถิ่นที่แยกได้จากทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำ.....40

6 ขนาดความกว้างของบริเวณยับยั้งที่เกิดจากการยับยั้งเชื้อทดสอบโดยส่วนน้ำใส ของ *Bacillus* S11.....43

7 การเปรียบเทียบเวลาการแบ่งตัวเป็น 2 เท่าของเชื้อทดสอบเมื่อใช้ส่วนน้ำใสของ *Bacillus* S11.....49

8 ทดสอบการสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ของ *Bacillus* S11 โดยแปรผันชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อและอุณหภูมิ.....51

9 ลักษณะการเจริญและการทดสอบทางชีวเคมีของ *Bacillus* S11.....54

10 จำนวน *Bacillus* S11ทั้งหมดที่ผสมในอาหารกุ้งกุลาดำ.....60

11 ลักษณะการเจริญ และการทดสอบทางชีวเคมีของ *Vibrio* sp. ที่แยกได้ระหว่างการทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคจาก *V. harveyi* ระยะเวลา 10 วัน เทียบกับ *V. harveyi* D331.....72

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

1 ผลกระทบของการใช้สารปฏิชีวนะ....12

2 บริเวณยับยั้งที่เกิดจากการยับยั้งเชื้อทดสอบโดยส่วนน้ำใสของ *Bacillus* S11....42

3 การยับยั้งของส่วนน้ำใส *Bacillus* S11 ต่อการเจริญของ

ก. *B. cereus* ข. *B. subtilis* ค. *B. megaterium*....44

4 การยับยั้งของส่วนน้ำใส *Bacillus* S11 ต่อการเจริญของ

ก. *Lis. monocytogenes* ข. *S. aureus*....45

5 การยับยั้งของส่วนน้ำใส *Bacillus* S11 ต่อการเจริญของ

ก. *A. hydrophila* ข. *P. aeruginosa* ค. *E. coli*....46

6 การยับยั้งของส่วนน้ำใส *Bacillus* S11 ต่อการเจริญของ

ก. *V. alginolyticus* ข. *V. anguillarum*....47

7 การยับยั้งของส่วนน้ำใส *Bacillus* S11 ต่อการเจริญของ

ก. *V. harveyi* ข. *V. parahaemolyticus* ค. *V. cholera*....48

8 ความสัมพันธ์ระหว่างการสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ของ *Bacillus* S11 ต่อการเจริญ

ของ *B. cereus* และพีเอชในระหว่างการเจริญของ *Bacillus* S11....50

9 การติดสีแกรมของ *Bacillus* S11 อายุ 24 ชม. ถ่ายจากกล้อง Nikon รุ่น M-35S

กำลังขยาย 1000 เท่า....53

10 น้ำหนัก ความยาว อัตราการรอดของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ผสม

*Bacillus* S11 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเป็นระยะเวลา 100 วัน....61

11 สภาพของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ผสม *Bacillus* S11 เปรียบเทียบกับ

กลุ่มควบคุมเป็นระยะเวลา 100 วัน....62

12 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด *Bacillus* S11 และ *Vibrio* sp. ที่นับได้ในน้ำเลี้ยง

กุ้งกุลาดำ ระยะเวลา100 วัน ในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่เติม *Bacillus* S11....63

13 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด *Bacillus* S11 และ *Vibrio* sp. ที่นับได้จากลำตัว

กุ้งกุลาดำ ระยะเวลา100 วัน จากกุ้งกุลาดำต่างบ่อที่เติม *Bacillus* S11....64

14 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด *Bacillus* S11 และ *Vibrio* sp. ที่นับได้ในทางเดินอาหาร

กุ้งกุลาดำ ระยะเวลา100 วัน จากกุ้งกุลาดำต่างบ่อที่เติม *Bacillus* S11....65

15 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด *Bacillus* S11 และ *Vibrio* sp. ที่นับได้ในขี้กุ้ง

กุ้งกุลาดำ ระยะเวลา100 วัน จากกุ้งกุลาดำต่างบ่อที่เติม *Bacillus* S11....66

## สารบัญรูป (ต่อ)

16 พีเอช ค่าออกซิเจนละลายในน้ำ อุณหภูมิ ความเค็ม ที่วัดได้ระหว่างการเลี้ยงกุ้งกุลาดำเป็นระยะเวลา 100 วัน ในบ่อเลี้ยงกุ้งที่เติม *Bacillus* S11.....67

17 แอมโมเนียม ไนไตรท์ ไนเตรท ฟอสเฟต ที่วัดได้ระหว่างการเลี้ยงกุ้งกุลาดำเป็นระยะเวลา 100 วัน ในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่เติม *Bacillus* S11.....68

18 อัตราการรอดของกุ้งกุลาดำ ระหว่างการทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคจาก *V. harveyi* ระยะเวลา 10 วัน ในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่เติม *Bacillus* S11.....69

19 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด *Bacillus* S11 และ *V. harveyi* ที่นับได้ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ระหว่างการทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคจาก *V. harveyi* ระยะเวลา 10 วัน ในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่เติม *Bacillus*S11.....70

20 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด *Bacillus* S11 และ *V. harveyi* ที่นับได้ในทางเดินอาหารกุ้งกุลาดำระหว่างการทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคจาก *V. harveyi* ระยะเวลา 10 วัน ในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่เติม *Bacillus*S11.....71

21 สภาพทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ผสม *Bacillus* S11 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ระหว่างการทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคจาก *V. harveyi* ระยะเวลา 10 วัน.....73

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# สัญลักษณ์และคำย่อ

มม. = มิลลิเมตร

มล. = มิลลิลิตร

ชม. = ชั่วโมง

°ซ = องศาเซลเซียส

nm = นาโนเมตร

cfu/g = โคโลนีต่อกรัม

cfu/ml = โคโลนีต่อมิลลิลิตร

µm = ไมโครเมตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย