

เอกสารวิชาการฉบับที่ ๑/๒๕๖๘



Technical Paper No. 1/2568

การศึกษาชนิดของจุลินทรีย์กลุ่มบาซิลลัสในฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม
(*Litopenaeus vannamei* Boon, 1931) พื้นที่ความเค็มต่ำจังหวัดฉะเชิงเทรา

Study of Bacillus Species in Pacific White Shrimp
(*Litopenaeus vannamei* Boon, 1931) Farm in Low-Salinity Areas
of Chachoengsao Province

กัญญารัตน์ สุนทรา

Kunyarut Suntara

กองวิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง

Coastal Fisheries Research and
Development Division

กรมประมง

Department of Fisheries

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

Ministry of Agriculture and Cooperatives

เอกสารวิชาการฉบับที่ ๑/๒๕๖๘



Technical Paper No. 1/2568

การศึกษาชนิดของจุลินทรีย์กลุ่มบาซิลลัสในฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม
(*Litopenaeus vannamei* Boon, 1931) พื้นที่ความเค็มต่ำจังหวัดฉะเชิงเทรา

Study of Bacillus Species in Pacific White Shrimp
(*Litopenaeus vannamei* Boon, 1931) Farm in Low-Salinity Areas
of Chachoengsao Province

กัญญารัตน์ สุนทรา

Kunyarut Suntara

ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ
ชายฝั่งฉะเชิงเทรา
กองวิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง
กรมประมง
๒๕๖๘

Chachoengsao Coastal Aquaculture Research
and Development Center
Coastal Aquaculture Research and
Development Division
Department of Fisheries
2025

รหัสทะเบียนวิจัย 68-3-2-0305-68004

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	1
Abstract	3
คำนำ	5
วัตถุประสงค์	6
วิธีดำเนินการ	7
1.การวางแผนการศึกษา	7
2. วิธีการทดลอง	7
ส่วนที่ 1 ศึกษาชนิดของจุลินทรีย์บาซิลลัสจากฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในพื้นที่เลี้ยงความเค็มต่ำ ของจังหวัดฉะเชิงเทรา และความสามารถในการครอบครองเชื้อ <i>Vp_{AHPND}</i>	7
1.1 การเก็บตัวอย่างดินและการเตรียมเชื้อจุลินทรีย์	7
1.2 การจำแนกเชื้อให้บริสุทธิ์ และศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของจุลินทรีย์	8
1.3 การเตรียมแบคทีเรีย <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (<i>Vp_{AHPND}</i>)	8
1.4 การเตรียมจุลินทรีย์บาซิลลัสชนิดที่แยกได้จากดินพื้นบ่อเลี้ยงกุ้ง	9
1.5 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์บาซิลลัส	9
1.6 ศึกษาประสิทธิภาพในการครอบครองเชื้อ <i>Vp_{AHPND}</i> ของจุลินทรีย์ด้วยวิธี Co-culture	9
1.7 การวิเคราะห์ข้อมูล	9
ส่วนที่ 2 คัดเลือกชนิดของจุลินทรีย์บาซิลลัส พัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ และการตรวจวิเคราะห์และทดสอบ สารสำคัญในผลิตภัณฑ์	10
2.1 คัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการครอบครองเชื้อ <i>Vp_{AHPND}</i> เป็นผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ชนิดผง	10
2.2 ขั้นตอนการผลิตจุลินทรีย์ผง ประกอบด้วย 6 ขั้นตอน แสดงตามภาพที่ 2	10
2.3 การเตรียมวัสดุรองรับขั้นตอนการผลิตจุลินทรีย์ผง	11
2.4 การตรวจนับสปอร์ของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดผง ตามวิธีของนฤมล (2560)	11
2.5 การตรวจนับสปอร์ของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดผง ตามวิธีของนฤมล (2560)	12
2.6 การทดสอบระยะเวลาความคงตัวของเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์	13
2.7 การตรวจวิเคราะห์และทดสอบสารสำคัญของหัวเชื้อจุลินทรีย์ <i>B. subtilis</i> ในผลิตภัณฑ์	13
2.8 การวิเคราะห์ข้อมูล	15

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ส่วนที่ 3 การทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์บาซิลลัสในการควบคุมสารอินทรีย์ที่เป็นของเสียจากสิ่งขับถ่ายของกิ้งก่าในห้องปฏิบัติการ	15
3.1 การเตรียมสารอินทรีย์	15
3.2 การเตรียมน้ำทะเลสำหรับการทดลอง	16
3.3 การเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์จากผลิตภัณฑ์ CH2	16
3.4 การดำเนินการทดลอง	16
3.5 การวิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำ	17
3.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	17
ส่วนที่ 4 สำนวจความพึงพอใจของเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในการใช้จุลินทรีย์ชนิดที่คัดแยกได้จากพื้นที่ความเค็มต่ำจังหวัดฉะเชิงเทรา	17
4.1 เก็บรวบรวมข้อมูลจากแบบสำรวจความพึงพอใจของเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งขาว	17
ผลการศึกษา	19
ส่วนที่ 1 ผลการศึกษาชนิดของจุลินทรีย์บาซิลลัสจากฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในพื้นที่เลี้ยงความเค็มต่ำของจังหวัดฉะเชิงเทรา และความสามารถในการครอบครองเชื้อ Vp_{AHPND}	19
1.1 สันฐานวิทยาภายนอกของโคโลนีจุลินทรีย์บาซิลลัส	19
1.2 การตรวจสอบลักษณะของเซลล์ และการย้อมแกรมจุลินทรีย์	19
1.3 การจำแนกชนิดของจุลินทรีย์คัดเลือกว่าด้วยวิธี 16S rRNA	20
1.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์บาซิลลัสในหลอดทดลอง	21
1.5 ประสิทธิภาพในการครอบครองเชื้อ Vp_{AHPND} ของจุลินทรีย์บาซิลลัส ด้วยวิธี Co-culture	24
ส่วนที่ 2 ผลของการคัดเลือกชนิดของจุลินทรีย์บาซิลลัส เพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ และการตรวจวิเคราะห์และทดสอบสารสำคัญในผลิตภัณฑ์	28
2.1 การทดสอบระยะเวลาคงตัวของจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ (CH2)	28
2.2 ผลการวิเคราะห์และทดสอบสารสำคัญในผลิตภัณฑ์หัวเชื้อจุลินทรีย์ชนิดผง	29
ส่วนที่ 3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการลดปริมาณสารอินทรีย์ในของเสียสิ่งขับถ่ายจากการเลี้ยงกิ้งก่าในห้องปฏิบัติการ	32

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ส่วนที่ 4 ผลการสำรวจความพึงพอใจของเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในการใช้จุลินทรีย์ชนิดที่ คัดแยกได้จากพื้นที่ความเค็มต่ำจังหวัดฉะเชิงเทรา	34
4.1 ข้อมูลทั่วไปของเกษตรกร	34
4.2 ข้อมูลฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม	34
4.3 รูปแบบการเลี้ยง	34
4.4 การจัดการฟาร์มเลี้ยง	35
4.5 การจัดการน้ำระหว่างการเลี้ยง	35
4.6 รูปแบบการใช้จุลินทรีย์สายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากพื้นที่ความเค็มต่ำ	35
4.7 การกระจายผลผลิตและการตลาดกุ้งขาวแวนนาไม	35
4.8 ความพึงพอใจของเกษตรกรต่อการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากพื้นที่ ความเค็มต่ำจังหวัดฉะเชิงเทรา	35
สรุปและวิจารณ์ผล	42
ข้อเสนอแนะ	44
คำขอบคุณ	44
เอกสารอ้างอิง	45
ภาคผนวก	48

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ข้อมูลสำรวจความพึงพอใจของเกษตรกรที่ใช้จุลินทรีย์ชนิดที่คัดแยกได้จากพื้นที่ความเค็มต่ำ จังหวัดฉะเชิงเทรา	18
2 สัณฐานวิทยาภายนอกของจุลินทรีย์ทั้ง 6 ชนิด	20
3 จำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ ด้วยวิธี 16S rRNA	21
4 ความสามารถในการเจริญของจุลินทรีย์บาซิลลัสในแต่ละระดับของอุณหภูมิ	21
5 ความสามารถในการเจริญของจุลินทรีย์บาซิลลัสต่อความเป็นกรด – ด่าง (pH)	22
6 ความสามารถในการเจริญของจุลินทรีย์บาซิลลัสในแต่ละระดับความเค็ม	23
7 ประสิทธิภาพในการครอบครองเชื้อ <i>Vp_{AHPND}</i> ของจุลินทรีย์บาซิลลัส 6 สายพันธุ์	26
8 การเจริญของจุลินทรีย์ในหลอดทดลองที่เลี้ยงแบบ Co-culture บนอาหาร NA	27
9 ปริมาณแบคทีเรียจากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์	29
10 ปริมาณเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. ที่ได้จากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ CH2	29
11 สรุปผลการวิเคราะห์และทดสอบผลิตภัณฑ์	31
12 ปริมาณสารอินทรีย์ (เปอร์เซ็นต์) ในของเสียจากสิ่งขบถ่ายในการเลี้ยงกุ้งในห้องปฏิบัติการ	32
13 ปริมาณสารอินทรีย์คงเหลือ เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณสารอินทรีย์เริ่มต้นของกลุ่มควบคุม	32
14 ข้อมูลทั่วไปของเกษตรกรผู้ใช้จุลินทรีย์สายพันธุ์ชนิดที่แยกได้จากพื้นที่ความเค็มต่ำจังหวัดฉะเชิงเทรา	36
15 ข้อมูลฟาร์มเลี้ยงของเกษตรกรผู้ใช้จุลินทรีย์ชนิดที่คัดแยกได้จากพื้นที่ความเค็มต่ำ จังหวัดฉะเชิงเทรา	37
16 การจัดการการเลี้ยงของเกษตรกรผู้ใช้จุลินทรีย์ชนิดที่คัดแยกได้จากพื้นที่ความเค็มต่ำ จังหวัดฉะเชิงเทรา	38
17 การใช้จุลินทรีย์ในการเลี้ยงกุ้งของเกษตรกรผู้ใช้จุลินทรีย์ชนิดที่คัดแยกได้จากพื้นที่ความเค็มต่ำ จังหวัดฉะเชิงเทรา	39
18 การกระจายผลผลิตและการตลาดกุ้งขาวแวนนาไมของเกษตรกรผู้ใช้จุลินทรีย์ชนิดที่คัดแยกได้ จากพื้นที่ความเค็มต่ำจังหวัดฉะเชิงเทรา	40
19 ผลผลิตกุ้งขาวแวนนาไมของเกษตรกรผู้ใช้จุลินทรีย์ชนิดที่คัดแยกได้จากพื้นที่ความเค็มต่ำ จังหวัดฉะเชิงเทรา	40

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
20 ความพึงพอใจของเกษตรกรต่อการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในบ่อดิน	41
ตารางภาคผนวกที่	
1 รายละเอียดกิจกรรมและขั้นตอนกิจกรรมการเลี้ยงกุ้งทะเลในภาพรวม โปรตรระบุ ☒	50
ด้านหน้าข้อความตามกิจกรรม	
2 ความพึงพอใจต่อการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม	52

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 ลักษณะบ่อเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมของเกษตรกรที่สู่มเก็บตัวอย่างดิน (ก - ค)	8
2 ขั้นตอนการผลิตจุลินทรีย์ผง	10
3 ขั้นตอนการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ชนิดผง ก.นึ่งฆ่าเชื้อวัสดุรองรับ ข.วัสดุรองรับในเครื่องผสม ค.ฉีดพ่นน้ำจุลินทรีย์ในเครื่องผสม ง.วัสดุรองรับที่มีหัวเชื้อจุลินทรีย์ผสมตากเพื่อไล่ความชื้นในห้องปลอดเชื้อ จ.บรรจุในถุงอลูมิเนียมฟลอยด์	12
4 ลักษณะของโคโลนีของจุลินทรีย์ที่ตรวจพบจากตัวอย่างดิน CH1- CH3	19
5 ลักษณะของโคโลนีของจุลินทรีย์ที่ตรวจพบจากตัวอย่างดิน CH4 - CH6	19
6 ลักษณะของเซลล์จุลินทรีย์ที่ได้จากการย้อมแกรม จำนวน 6 ชนิด	20
7 ปริมาณความคงตัวของจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์	28
8 ลักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์ <i>B. subtilis</i> (CH2) ในผลิตภัณฑ์	28
9 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่พบในผลิตภัณฑ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	29
10 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. ที่พบในผลิตภัณฑ์ CH2 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ	30
11 แสดงการทดสอบการไม่สร้างยาปฏิชีวนะของจุลินทรีย์บาซิลลัส จากตัวอย่างผลิตภัณฑ์ ด้วยวิธี Agar Well Diffusion Assay โดย A คือการทดสอบกับ <i>E.coli</i> ATCC 25922 (แบคทีเรียบ่งชี้ชนิดแกรมลบ) และ B คือ การทดสอบกับ <i>S. aureus</i> ATCC 25923 (แบคทีเรียบ่งชี้ชนิดแกรมบวก)	30
12 ปริมาณแอมโมเนียรวมของน้ำระหว่างการทดลองหลังจากใส่ผลิตภัณฑ์ในแต่ละครั้งของแต่ละกลุ่มทดลอง	33
13 ปริมาณไนโตรทของน้ำระหว่างการทดลองหลังจากใส่ผลิตภัณฑ์ในแต่ละครั้งของแต่ละกลุ่มทดลอง	33
14 การขยายและการใช้ประโยชน์จากหัวเชื้อจุลินทรีย์ <i>B. subtilis</i> (CH2) และผลผลิตกุ้งขาวแวนนาไมจากบ่อที่มีการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ตลอดระยะเวลาการเลี้ยง	34

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพภาคผนวกที่	หน้า
1 รูปแบบของการจัดการบ่อเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในพื้นที่ความเค็มต่ำ และการนำจุลินทรีย์ ที่แยกได้จากพื้นที่ไปใช้ประโยชน์ในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม จังหวัดฉะเชิงเทรา	54
2 ผลผลิตกุ้งของฟาร์มเกษตรกรในจังหวัดฉะเชิงเทราที่มีเลี้ยงกุ้งโดยใช้จุลินทรีย์กลุ่มวิสาหกิจ ชุมชนชมรมผู้เลี้ยงกุ้งจังหวัดฉะเชิงเทราที่แยกได้จากพื้นที่ฉะเชิงเทราในระบบการเลี้ยงทั้งระบบ	55

การศึกษาชนิดของจุลินทรีย์กลุ่มบาซิลลัสในฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei* Boon, 1931) พื้นที่ความเค็มต่ำจังหวัดฉะเชิงเทรา

กัญญารัตน์ สุนทรา

ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งฉะเชิงเทรา

บทคัดย่อ

ฟาร์มที่ประสบความสำเร็จในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในพื้นที่ความเค็มต่ำของจังหวัดฉะเชิงเทรา ส่วนใหญ่มีการจัดการระบบการเลี้ยงด้วยจุลินทรีย์เป็นหลัก และมีใช้จุลินทรีย์หลากหลายชนิดในระบบการเลี้ยง การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกและระบุชนิดของจุลินทรีย์กลุ่ม *Bacillus* ที่พบในดินพื้นบ่อเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei* Boon, 1931) ในพื้นที่ความเค็มต่ำ ตำบลบางแก้ว อำเภอเมือง จังหวัดฉะเชิงเทรา โดยเก็บตัวอย่างจากฟาร์มจำนวน 3 ฟาร์ม ซึ่งเป็นฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมที่ไม่พบการเกิดโรค หรือกุ้งป่วย ฟาร์มมีการจัดการฟาร์มเลี้ยงด้วยจุลินทรีย์อย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 3 ปี โดยทำการเก็บตัวอย่างจากฟาร์มจำนวน 3 แห่ง พบว่าจุลินทรีย์ที่แยกได้เป็นกลุ่ม *Bacillus* จำนวน 6 ชนิด ได้แก่ *B. megaterium* (CH1), *B. subtilis* (CH2), *B. paralicheniformis* (CH3), *B. amyloliquefaciens* (CH4), *B. siamensis* (CH5) และ *B. velezensis* (CH6) ซึ่งมีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 99.00 เปอร์เซ็นต์ จุลินทรีย์ทั้ง 6 ชนิดสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส ในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) 4-10 และความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0-4 เปอร์เซ็นต์

เมื่อนำจุลินทรีย์ *Bacillus* spp. ทั้ง 6 ชนิด มาทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค Acute hepatopancreatic necrosis disease (*Vp_{AHPND}*) ด้วยวิธี co-culture พบว่า *B. subtilis* (CH2) มีประสิทธิภาพสูงสุดในการลดปริมาณเชื้อ *Vp_{AHPND}* เหลือ 3.10×10^2 CFU/ml โดยภายใน 24 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีปริมาณเชื้อ 2.78×10^7 CFU/ml จึงคัดเลือก *B. subtilis* (CH2) ไปพัฒนาผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ชนิดผง ที่มีปริมาณจุลินทรีย์อยู่ในช่วง $3.12 \times 10^6 - 2.71 \times 10^7$ CFU/g โดยผ่านการตรวจสอบคุณภาพ ไม่มีการปนเปื้อนของยีสต์และรา และไม่พบการสร้างสารพิษขึ้น จากการทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์บาซิลลัสในการลดปริมาณสารอินทรีย์ที่เป็นของเสียจากสิ่งขับถ่ายของกุ้งที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการ พบว่าผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ผง CH2 เมื่อใช้ในอัตรา 500 ลิตร/ไร่ เป็นเวลา 21 วัน สามารถลดปริมาณสารอินทรีย์จากสิ่งขับถ่ายได้ 22.11 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งยังช่วยปรับปรุงคุณภาพน้ำระหว่างการเลี้ยงกุ้ง และผลการใช้จุลินทรีย์ผง CH2 ของเกษตรกรจำนวน 51 รายในการเลี้ยงกุ้ง เกษตรกรมีความพึงพอใจมากที่สุดต่อการใช้ผลิตภัณฑ์ โดยเฉพาะในด้านการปรับปรุงคุณภาพน้ำ (67 เปอร์เซ็นต์) การป้องกันโรค (49 เปอร์เซ็นต์) และการเสริมสร้างความแข็งแรงของกุ้ง (41 เปอร์เซ็นต์) ผลผลิตเฉลี่ยต่อรอบการเลี้ยงอยู่ที่ 288.65 ตัน และผลผลิตรวมทั้งปี 1,277 ตัน/ปี

ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าจุลินทรีย์ *Bacillus* CH2 ที่แยกได้จากดินพื้นบ่อในพื้นที่ความเค็มต่ำ มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์แบบผง และสามารถนำไปส่งเสริมใช้ในการเลี้ยงกุ้งในพื้นที่ความเค็มต่ำได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยแนะนำให้ใช้ผลิตภัณฑ์ จุลินทรีย์ *Bacillus* CH2 ที่ขยายเพิ่มปริมาณแล้วในอัตรา 500 ลิตร/ไร่ เพื่อประสิทธิภาพสูงสุดในการลดต้นทุนการผลิตและเพิ่มผลผลิตของเกษตรกร

คำสำคัญ: กุ้งขาวแวนนาไม, จุลินทรีย์, บาซิลลัส, ความเค็มต่ำ, โพรไบโอติก

*ผู้รับผิดชอบ: 36/2 หมู่ 8 ต.ท่าสะพาน อ.บางปะกง จ.ฉะเชิงเทรา 24130.

E-mail: kunyarut2007@hotmail.com

Study of *Bacillus* Species in Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boon, 1931) Farm in Low-Salinity Areas of Chachoengsao Province

Kunyarut Suntara

Chachoengsao Coastal Aquaculture Research and Development Center

Abstract

Microbial-based management strategies are widely utilized in the farming of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boon, 1931) in low-salinity areas of Chachoengsao Province, Thailand. This study aimed to isolate and identify *Bacillus* species from the soil of shrimp ponds in Bang Kaeo Sub-district, Mueang District, Chachoengsao Province. Samples were collected from three disease-free shrimp farms that had consistently employed microbial management systems for over three years. Six *Bacillus* species were identified: *B. megaterium* (CH1), *B. subtilis* (CH2), *B. paralicheniformis* (CH3), *B. amyloliquefaciens* (CH4), *B. siamensis* (CH5), and *B. velezensis* (CH6), all demonstrating 99.00% nucleotide sequence similarity. These strains exhibited optimal growth at temperatures of 30–40°C, pH levels of 4–10, and sodium chloride concentrations of 0–4%.

The antimicrobial efficacy of the six *Bacillus* strains against *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND), was assessed using the co-culture method. *B. subtilis* (CH2) demonstrated the highest efficacy, reducing Vp_{AHPND} levels to 3.10×10^2 CFU/ml within 24 hours, compared to 2.78×10^7 CFU/ml in the control group. Based on these results, *B. subtilis* (CH2) was developed into a powdered microbial product containing 3.12×10^6 – 2.71×10^7 CFU/g. Quality assurance confirmed the absence of yeast, mold, and antibiotics in the product.

Laboratory tests revealed that CH2 powder, applied at 500 liters per rai over 21 days, reduced organic waste from shrimp excretions by 22.11% and improved water quality. Field applications involving 51 shrimp farmers reported the highest satisfaction, particularly in water quality improvement (67%), disease prevention (49%), and enhanced shrimp health

(41%). The average production per cycle was 288.65 tons, yielding a total annual production of 1,277 tons.

This study indicates the potential of *Bacillus* CH2 strains, which were isolated from pond soils in low-salinity areas as effective and locally developed microbial products. The recommended application rate for this microbial product is 500 liters per rai, offering a cost-effective solution to enhance production efficiency and sustainability for shrimp farmers.

Key words: Pacific white shrimp, Microorganism, *Bacillus* spp., low salinity, probiotics

***Corresponding author:** 36/2 Mu 8, Tha sa-an Sub-district, Bang Pakong District Chachoengsao Province 24130. E-mail: kunyarut2007@hotmail.com

คำนำ

จังหวัดฉะเชิงเทราตั้งอยู่ในเขตภาคตะวันออกและมีการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำเป็นอันดับต้น ๆ ของประเทศไทย ในอดีตลักษณะการเพาะเลี้ยงกุ้งกระจายไปตามพื้นที่ทำนาที่ไม่สามารถปลูกข้าวได้ตลอดแนวลำนํ้าบางปะกง การเลี้ยงกุ้งกุลาดำในอดีตมีแรงจูงใจจากรีกราคาเป็นสำคัญ ทำให้มีผู้เลี้ยงกุ้งทั้งจังหวัดฉะเชิงเทรา 6,554 ราย ในพื้นที่ 30,000 ไร่ (สำนักงานประมงจังหวัดฉะเชิงเทรา, 2541) ต่อมาในปี พ.ศ. 2540 เกิดปัญหาจากโรคไวรัสตัวแดงดวงขาว โรคหัวเหลืองระบาศ และสิ่งแวดลอมเสื่อมโทรม ทำให้มีการนำพ่อแม่พันธุ์กุ้งขาวแวนนาไมเข้ามาในประเทศไทย และเกษตรกรหันมาเลี้ยงเพิ่มมากขึ้น

กุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) เป็นกุ้งทะเลอีกชนิดหนึ่งที่มีการพัฒนาเข้ามาทดแทนกุ้งกุลาดำ เนื่องจากเป็นกุ้งที่เลี้ยงง่าย และสามารถปรับตัวให้ทนทานต่อสภาพแวดล้อมได้ดี ทำให้เกษตรกรมีรายได้และผลตอบแทนสูงกว่าสัตว์น้ำชนิดอื่น ๆ แต่จากสภาพการเลี้ยงของเกษตรกรที่มีการปล่อยกุ้งอย่างหนาแน่น และมีการเร่งกระบวนการเลี้ยงเพื่อเพิ่มผลผลิตให้อาหารในปริมาณที่สูงเกินกว่าความต้องการของกุ้ง ทำให้สภาพแวดล้อมไม่สมดุล เกิดปัญหาโรคระบาด เช่นช่วงปลายปี 2550 เกิดโรคตายด่วน (AHPND/EMS) ของกุ้ง ซึ่งมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่สร้างสารพิษต่อตับและตับอ่อน (Hepatopancreas) ของกุ้งได้ ทำให้มีการตายของกุ้งอย่างผิดปกติในฟาร์มเลี้ยงหลายพื้นที่ของประเทศ และสร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจของกุ้งทะเลของไทยอย่างมากจนถึงปัจจุบัน (Joshi *et al.*, 2014)

จากสภาพปัญหาของการเลี้ยงกุ้งแบบพัฒนาที่มีการเร่งรอบการผลิต การปล่อยในอัตราความหนาแน่นสูง การให้อาหารมากเกินไป ปัญหาสารอินทรีย์สะสมในบ่อสูงขึ้น ในระหว่างการเลี้ยงพบปัญหาในเรื่อง คุณภาพน้ำ โรคไวรัส และแบคทีเรีย ที่ทำให้เกษตรกรมีการเลือกใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะเพื่อแก้ไขปัญหา ทำให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้นที่สำคัญได้ก่อให้เกิดการตกค้างของยาปฏิชีวนะและสารเคมีในตัวกุ้งที่จำหน่าย เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคและมีผลกระทบต่ออุตสาหกรรมการส่งออกของประเทศไทยเป็นอย่างมาก (วิเศษ, 2541) ดังนั้นการลดละเลิกใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะเป็นปัจจัยหนึ่งที่ช่วยขับเคลื่อนอุตสาหกรรมกุ้งทะเลของไทยให้เกิดความยั่งยืน เกษตรกรควรปรับเปลี่ยนเทคนิคการเลี้ยงรวมถึงเลือกใช้จุลินทรีย์และโปรไบโอติกในการปรับสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมกับการเจริญของกุ้ง มีงานวิจัยหลายฉบับพบว่าโปรไบโอติกมีประสิทธิภาพในการเพิ่มการเจริญ เสริมภูมิคุ้มกัน ยับยั้งเชื้อก่อโรคและปรับปรุงคุณภาพน้ำในระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (Balcazar *et al.*, 2008) และมีความพยายามนำเอาจุลินทรีย์ชนิดใหม่ ๆ มาใช้ในการแก้ไขปัญหาอย่างต่อเนื่อง เมื่อพิจารณาถึงชนิดของจุลินทรีย์และโปรไบโอติกที่ใช้ในการเลี้ยงกุ้งในประเทศไทยแล้ว พบว่าส่วนใหญ่เป็นชนิดที่นำเข้ามาจากต่างประเทศทั้งสิ้น (สุบัณฑิต, 2551)

จุลินทรีย์ *Bacillus* spp. ทุกชนิดเจริญได้ดีในที่ที่มีออกซิเจน บางชนิดจำเป็นต้องมีออกซิเจนจึงจะสามารถเจริญได้ เช่น แบคทีเรีย *B. subtilis*, *B. brevis*, *B. firmus*, *B. megaterium* และ *B. sphaericus* ส่วน *B. cereus*, *B. athracis*, *B. licheniformis*, *B. polymyxa* และ *B. Coagulans* บางครั้งสามารถเจริญได้ในที่ไม่มีออกซิเจน *Bacillus* spp. ส่วนใหญ่สามารถตรึงไนโตรเจนและสามารถรีดิวซ์ไนเตรทได้

Bacillus spp. สามารถเจริญได้ดีที่ pH เป็นกลางหรือกรดเล็กน้อย แต่ *B. alcalophilus* สามารถเจริญได้ที่ pH 9-10 ขณะที่ *B. acidocaldarius* สามารถเจริญได้ที่ pH 2-6 (Turnball et al., 1990) อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ *Bacillus* spp. อยู่ในช่วง 25-37 องศาเซลเซียส ในขณะที่ *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. acidocaldarius*, *B. brevis*, *B. stearothermophilus* และ *B. coagulans* ที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส (El-Hassan and Gowen, 2006) ทางด้านการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำพบว่า *Bacillus* sp. สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียก่อโรคในสัตว์น้ำได้หลากหลาย ได้แก่ *Aeromonas*, *Pseudomonas* และ *Vibrio* sp. (Hamza et al., 2015) การสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียก่อโรคเป็นปัจจัยสำคัญสำหรับการเพิ่มจำนวน และการอยู่รอดของแบคทีเรีย โดยส่งเสริมให้แบคทีเรียมีโอกาสเกิดการติดต่อยาปฏิชีวนะเพิ่มมากขึ้น (Flemming et al., 2016)

การศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกชนิดของจุลินทรีย์กลุ่มบาซิลลัส ในดินพื้นบ่อจากฟาร์มเลี้ยงกุ้งทะเลด้วยความเค็มต่ำที่ประสบความสำเร็จในการเลี้ยงด้วยจุลินทรีย์ โดยพิสูจน์จากการตรวจไม่พบเชื้อ *Vp_{AHPND}* ในฟาร์มเลี้ยงกุ้งติดต่อกันมาเป็นระยะเวลา 3 ปี หลังจากที่มีการใช้จุลินทรีย์ตลอดการเลี้ยงและนำจุลินทรีย์กลุ่มบาซิลลัสที่แยกได้มาทดสอบความสามารถในการครอบครองเชื้อ *Vp_{AHPND}* และสามารถนำไปปรับใช้เพื่อย่อยสลายสารอินทรีย์ในฟาร์มเลี้ยง ซึ่งผลจากการศึกษาในครั้งนี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในการนำจุลินทรีย์ที่พบในท้องดินในระบบการเลี้ยงกุ้งของจังหวัดฉะเชิงเทราไปพัฒนาผลิตจุลินทรีย์ชนิดน้ำหรือชนิดผง ให้เหมาะสมกับสภาพแวดล้อมการเลี้ยงกุ้งทะเลในจังหวัดฉะเชิงเทราที่เป็นพื้นที่ความเค็มต่ำซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในด้านการจัดการสารอินทรีย์ การปรับปรุงคุณภาพน้ำ บำบัดชีเลนในบ่อกุ้งเป็นโพรไบโอติก เพื่อให้เกิดสมดุลในระบบทางเดินอาหาร เพื่อย่อยสลายสารอาหารขนาดใหญ่ให้เป็นสารอาหารขนาดเล็ก ยับยั้งเชื้อก่อโรคและกระตุ้นภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำ ลดการใช้ยาปฏิชีวนะ (สุบัณฑิตและคณะ, 2552) และสามารถใช้เป็นต้นแบบการดำเนินงานสำหรับชมรม/สมาคมผู้ผลิตจุลินทรีย์ของกรมประมงในพื้นที่จังหวัดอื่น ๆ ด้วย

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาชนิดของจุลินทรีย์บาซิลลัสที่แยกได้จากฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในพื้นที่ความเค็มต่ำจังหวัดฉะเชิงเทรา
2. คัดเลือกชนิดของจุลินทรีย์บาซิลลัสที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการครอบครองเชื้อ *Vp_{AHPND}* และพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์
3. ประเมินประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากงานวิจัยไปทดสอบความสามารถในการลดปริมาณสารอินทรีย์
4. ทราบความพึงพอใจของเกษตรกรที่ใช้จุลินทรีย์ชนิดที่แยกได้จากพื้นที่เลี้ยงกุ้งจังหวัดฉะเชิงเทรา

วิธีดำเนินการ

1. การวางแผนการศึกษา

ในการศึกษาชนิดของจุลินทรีย์กลุ่มบาซิลลัสในฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei* Boon, 1931) พื้นที่ความเค็มต่ำจังหวัดฉะเชิงเทรา แบ่งการศึกษาวิจัยออกเป็น 4 ส่วน ดังนี้

ส่วนที่ 1 ศึกษาชนิดของจุลินทรีย์บาซิลลัสจากฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในพื้นที่เลี้ยงความเค็มต่ำของจังหวัดฉะเชิงเทรา และความสามารถในการครอบครองเชื้อ Vp_{AHPND}

ส่วนที่ 2 คัดเลือกชนิดของจุลินทรีย์บาซิลลัส พัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ และตรวจวิเคราะห์และทดสอบสารสำคัญในผลิตภัณฑ์

ส่วนที่ 3 การทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์บาซิลลัสในการลดปริมาณสารอินทรีย์ที่เป็นของเสียจากสิ่งขับถ่ายของกุ้งที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

ส่วนที่ 4 สำรวจความพึงพอใจของเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในการใช้จุลินทรีย์ชนิดที่คัดแยกได้จากพื้นที่ความเค็มต่ำจังหวัดฉะเชิงเทรา

2. วิธีการทดลอง

ส่วนที่ 1 ศึกษาชนิดของจุลินทรีย์บาซิลลัสจากฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในพื้นที่เลี้ยงความเค็มต่ำของจังหวัดฉะเชิงเทรา และความสามารถในการครอบครองเชื้อ Vp_{AHPND}

ดำเนินการศึกษาวิจัยตั้งแต่เดือน ตุลาคม 2564 ถึง เดือน มีนาคม 2566 ณ.ห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งฉะเชิงเทรา

วิธีดำเนินการ

1.1 การเก็บตัวอย่างดินและการเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

เก็บตัวอย่างดินพื้นบ่อเลี้ยงกุ้งที่มีการจัดการการเลี้ยงด้วยจุลินทรีย์ตลอดการเลี้ยง ในตำบลบางแก้ว อำเภอมือง จังหวัดฉะเชิงเทรา จำนวน 3 ฟาร์ม ซึ่งเป็นฟาร์มเลี้ยงกุ้งทะเลด้วยความเค็มต่ำที่ประสบความสำเร็จในการเลี้ยงด้วยจุลินทรีย์ โดยพิสูจน์จากการตรวจไม่พบเชื้อ Vp_{AHPND} ในฟาร์มเลี้ยงกุ้งติดต่อกันมาเป็นระยะเวลา 3 ปี (ภาพที่ 1) โดยเก็บตัวอย่างดินใน 1 บ่อ จำนวน 5 จุด (ความลึกจากระดับผิวดินลงไปประมาณ 30 เซนติเมตร) โดยเก็บฟาร์มละ 3 บ่อ แล้วนำดินที่เก็บได้ทั้งหมดมาผสมรวมกันจากนั้นนำตัวอย่างดินมาชั่ง 10 ± 0.1 กรัม ผสม 0.85 เปอร์เซ็นต์ NaCl ที่ฆ่าเชื้อ ปริมาณ 90 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่า (Vertex mixer) เพื่อให้ตัวอย่างดินผสมเป็นเนื้อเดียวกัน เจือจางด้วยเทคนิค 10-fold dilution method (6 ระดับความเข้มข้น คือ 10^{-1} ถึง 10^{-6}) จากนั้นดูดสารแขวนลอยตะกอนดินที่ระดับความเจือจาง 10^{-4} ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA (Nutrient Agar) จนทั่ว หลังจากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เลือกโคโลนีที่มีลักษณะคล้ายคลึงกับโคโลนีของจุลินทรีย์บาซิลลัส เช่น โคโลนีมีสีขาวนวล รูปร่างกลม ขอบและพื้นเรียบ ขอบหยักและมีพื้นผิวขรุขระ โคโลนีสีขาว รูปร่างไม่แน่นอน ขอบเรียบ และมีพื้นผิวเป็นเมือกเยิ้ม ทำการแยกโคโลนีในแต่ละลักษณะนำไปเลี้ยงให้บริสุทธิ์ โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA (Nutrient Agar) และอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Sucrose) เพื่อดูเชื้อก่อโรคไปใน

คราวเดียวกัน ถ้าตรวจพบโคโลนีสีเขียวและสีเหลืองขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS จะทำการคัดออก (อรรวรรณ์ และคณะ, 2556) โดยกำหนดรหัสของจุลินทรีย์ด้วยรหัส CH1 (CH หมายถึง จังหวัดฉะเชิงเทรา เลขกำกับ 1 หมายถึงจุลินทรีย์ชนิดที่ 1 ที่คัดเลือกได้จากพื้นที่ฉะเชิงเทรา)



(ก)



(ข)



(ค)

ภาพที่ 1 ลักษณะบ่อเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมของเกษตรกรที่สุ่มเก็บตัวอย่างดิน (ก - ค)

1.2 การจำแนกเชื้อให้บริสุทธิ์ และศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของจุลินทรีย์

นำจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 1.1 มาทำการขีดเชื้อ (Streak plate) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA เพื่อแยกเชื้อให้บริสุทธิ์อีกครั้ง โดยบ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ซึ่งจะเห็นโคโลนีที่ชัดเจน

1.2.1 สังเกตลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของจุลินทรีย์ที่พบด้วยตาเปล่า ตามลักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์บาสซิลลัส บันทึกผล

1.2.2 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ ตามวิธีของฟิมพร (2558) ทำการตรวจลักษณะของเซลล์และแกรมของจุลินทรีย์ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า โดยเซลล์จุลินทรีย์ที่เป็นแกรมบวกติดสีม่วงหรือน้ำเงินของสี Crystal violet และเซลล์จุลินทรีย์ที่เป็นแกรมลบติดสีแดงหรือชมพูของสี Safranin-O

1.2.3 การจำแนกชนิดของจุลินทรีย์บาสซิลลัสด้วยวิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rRNA gene

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นแกรมบวกติดสีม่วงหรือน้ำเงินของสี Crystal violet จากข้อ 1.2.2 มาทำให้บริสุทธิ์ โดยเลือกตัวแทนเชื้อจำนวน 1 โคโลนี เพื่อขยายปริมาณโดยการเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Agar (TSA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำโคโลนีมาทำการสกัด genomic DNA แล้วนำไปทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ แล้วนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ ด้วยวิธี DNA Sequencing หลังจากนั้นนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank Database

1.3 การเตรียมแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* (Vp_{AHPND})

นำเชื้อ Vp_{AHPND} ที่แยกได้จากกุ้งขาวแวนนาไมที่ป่วยและเก็บในห้องปฏิบัติการหน่วยตรวจสอบคุณภาพวัตถุดิบสัตว์น้ำ ศูนย์ศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบนอันเนื่องมาจากพระราชดำริ ผ่านการทดสอบและยืนยันเชื้อก่อโรคโดยเทคนิคทางพีซีอาร์ นำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ผสม 1.5 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในสภาพที่เขย่าตลอดเวลาที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที จากนั้นนำไปปั่นให้ตกตะกอนที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

เป็นเวลา 7 นาที หลังจากนั้นทิ้งส่วนใส และนำตะกอนของเชื้อ Vp_{AHPND} ที่ได้ไปเพาะเชื้อใน 1.5 เปอร์เซ็นต์ NaCl แล้วทำการประเมินปริมาณ Vp_{AHPND} ที่ละลายอยู่โดยดูจากความสัมพันธ์ระหว่างค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ซึ่งพบว่าปริมาณของเชื้อ Vp_{AHPND} ที่มีค่าดูดกลืนแสง 1.0 มีความเข้มข้นของเชื้อ Vp_{AHPND} 1.95×10^8 CFU/ml จากนั้นทำการเตรียมความเข้มข้นของเชื้อ Vp_{AHPND} ให้ได้ 2.00×10^6 CFU/ml โดยใช้สารละลาย 1.5 เปอร์เซ็นต์ NaCl

1.4 การเตรียมจุลินทรีย์บาซิลลัสชนิดที่แยกได้จากดินพื้นบ่อเลี้ยงกุ้ง

นำจุลินทรีย์ที่ทราบชนิดจากการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว ลงในอาหาร NA ผสม 1.5 เปอร์เซ็นต์ NaCl ด้วยวิธีขีดเชื้อ (Streak plate) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และคัดเลือกโคโลนีเดี่ยว ๆ ไปเพาะเลี้ยงต่อในอาหาร NB (Nutrient broth) ผสม 1.5 เปอร์เซ็นต์ NaCl ตามวิธีในข้อ 1.3 ซึ่งพบว่าปริมาณจุลินทรีย์บาซิลลัสที่มีค่าดูดกลืนแสง เท่ากับ 1.0 จะมีความเข้มข้นของจุลินทรีย์เท่ากับ 1.95×10^8 CFU/ml จากนั้นจะทำการเตรียมความเข้มข้นของเชื้อจุลินทรีย์ให้ได้ 2.00×10^6 CFU/ml โดยใช้สารละลาย 1.5 เปอร์เซ็นต์ NaCl

1.5 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์บาซิลลัส

ทดสอบความสามารถในการเจริญเมื่ออยู่ในสภาวะความเป็นกรด-ด่าง (pH) สภาวะที่มีระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) และสภาวะที่มีระดับอุณหภูมิแตกต่างกัน

โดยนำสารละลายจุลินทรีย์จากข้อ 1.4 ที่มีความเข้มข้นของเชื้อจุลินทรีย์ที่ 2.00×10^6 (CFU/ml) ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร มาเพาะเชื้อลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton Broth (MHB) ผสม 1.5 เปอร์เซ็นต์ NaCl ปริมาณ 9.5 มิลลิลิตร ที่มีการปรับค่า pH เท่ากับ 4, 7 และ 10 รวมถึง MHB ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0, 0.5, 1, 2, 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาพที่มีการเขย่าตลอดเวลา นอกจากนี้นำเชื้อจุลินทรีย์จากข้อ 1.4 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ไปเพาะเชื้อลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ HMB ผสม 1.5 เปอร์เซ็นต์ NaCl ปริมาตร 9.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่ 25, 30 และ 40 องศาเซลเซียส โดยจะตรวจสอบการเจริญในเวลา 24 ชั่วโมง โดยแต่ละชุดการทดลอง ทำการทดลองละ 3 ซ้ำ (Hyronimus *et al.*, 2000)

1.6 ศึกษาประสิทธิภาพในการครอบครองเชื้อ Vp_{AHPND} ของจุลินทรีย์ด้วยวิธี Co-culture

ดูสารละลายแบคทีเรีย Vp_{AHPND} จากข้อ 1.3 และจุลินทรีย์บาซิลลัส จากข้อ 1.4 มาชนิดละ 0.5 มิลลิลิตร ใส่ใน MHB ที่มีความเข้มข้นของ NaCl 1.5 เปอร์เซ็นต์ 9 มิลลิลิตร โดยกลุ่มควบคุมจะมีเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดเพียงชนิดเดียวเท่านั้น ทำ 3 ซ้ำ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาพที่มีการเขย่าตลอดเวลา แล้วจากนั้นทุก ๆ เวลาที่ 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง นำสารละลาย 100 ไมโครลิตร มาทำการเกลี่ยบนอาหาร TCBS และ NA เพื่อประเมินปริมาณเชื้อ Vp_{AHPND} และบาซิลลัส (Vaseeharan and Ramasamy, 2003)

1.7 การวิเคราะห์ข้อมูล

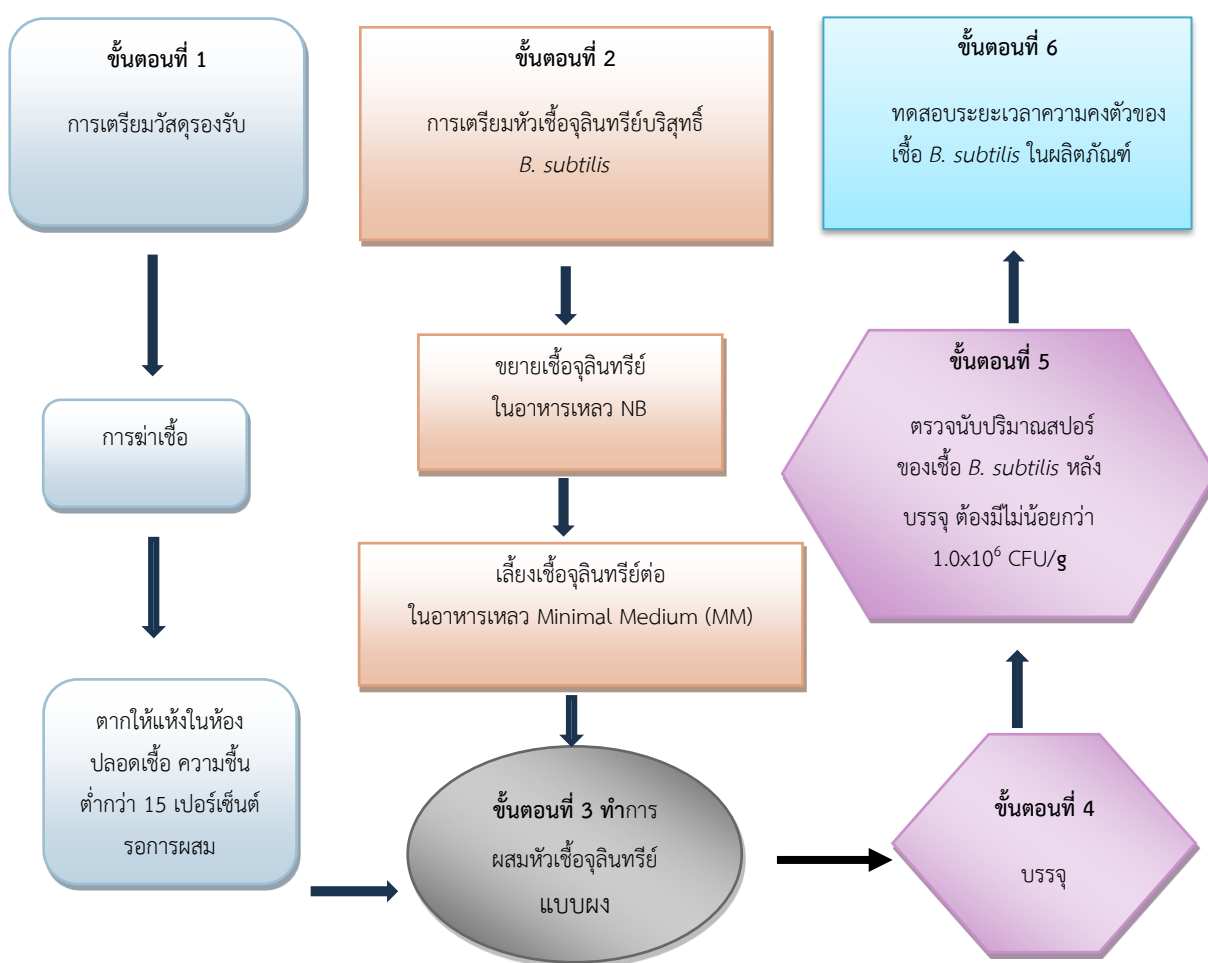
วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยของปริมาณเชื้อ Vp_{AHPND} และบาซิลลัสในแต่ละชนิดในสภาวะที่แตกต่างกันของ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ความเค็ม และการครอบครองเชื้อ Vp_{AHPND} ของบาซิลลัสในแต่ละชนิดในแต่ละช่วงเวลา โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Tests (DMRT) ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ

ส่วนที่ 2 คัดเลือกชนิดของจุลินทรีย์บาซิลลัส พัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ และการตรวจวิเคราะห์และทดสอบสารสำคัญในผลิตภัณฑ์

2.1 คัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการครอบครองเชื้อ Vp_{AHPND} เป็นผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ชนิดผง

คัดเลือกจุลินทรีย์บาซิลลัสที่คัดแยกได้จากพื้นที่เลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมความเค็มต่ำของจังหวัดฉะเชิงเทรา โดยคัดเลือกจุลินทรีย์บาซิลลัสจากผลของประสิทธิภาพในการครอบครองเชื้อ Vp_{AHPND} ได้ดีที่สุด มีสามารถในการเจริญได้ดีในอุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง และความเค็มในช่วงที่เหมาะสม มาผลิตเป็นจุลินทรีย์ชนิดน้ำฉีดพ่นในวัสดุรองรับ เพื่อผลิตเป็นจุลินทรีย์ชนิดผง

2.2 ขั้นตอนการผลิตจุลินทรีย์ผง ประกอบด้วย 6 ขั้นตอน แสดงตามภาพที่ 2



ภาพที่ 2 ขั้นตอนการผลิตจุลินทรีย์ผง

2.3 การเตรียมวัสดุรองรับขั้นตอนการผลิตจุลินทรีย์ผง

2.3.1 เตรียมสื่อผสม (ดินราซบุรี) ที่ต้องการทำจุลินทรีย์ผงมาชั่งน้ำหนักถุงละ 10 กิโลกรัม แล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันสูงที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ 15 นาที

2.3.2 นำสื่อผสมไปตากในห้องปลอดเชื้อที่มีระบบดูดอากาศ ตากประมาณ 3-4 วัน หรือ ความชื้นลดลงเหลือต่ำกว่า 15 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้เครื่องวัดความชื้นในดิน (Soil moisture meter) เพื่อรอการผสม

2.3.2.1 การเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ (เชื้อที่คัดแยกได้จากในพื้นที่)

1) นำ Stock ของเชื้อ *B. subtilis* (CH2) จากหลอด Stock เชื้อต่อลงบนอาหาร NA ที่เติม 1 เปอร์เซ็นต์ NaCl บ่มที่อุณหภูมิ 32-35 °C นาน 18-24 ชั่วโมง

2) เก็บเชื้อโคลนเดี่ยว ๆ ที่อยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA จำนวน 10-15 โคลน (ประมาณ 2 loop) เขี่ยลงในขวดรูปชมพู่ (flask) ขนาด 250 มล. ที่มีอาหาร NB ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ปิด flask ด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ แล้วพันทับด้วยแผ่นพาราฟิล์ม

3) นำอาหารที่มีเชื้อจุลินทรีย์ไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตจากความขุ่นของอาหาร และปริมาณเชื้อในอาหารขยายต้องมีระดับความเข้มข้นเท่ากับ 10^9 CFU/ml

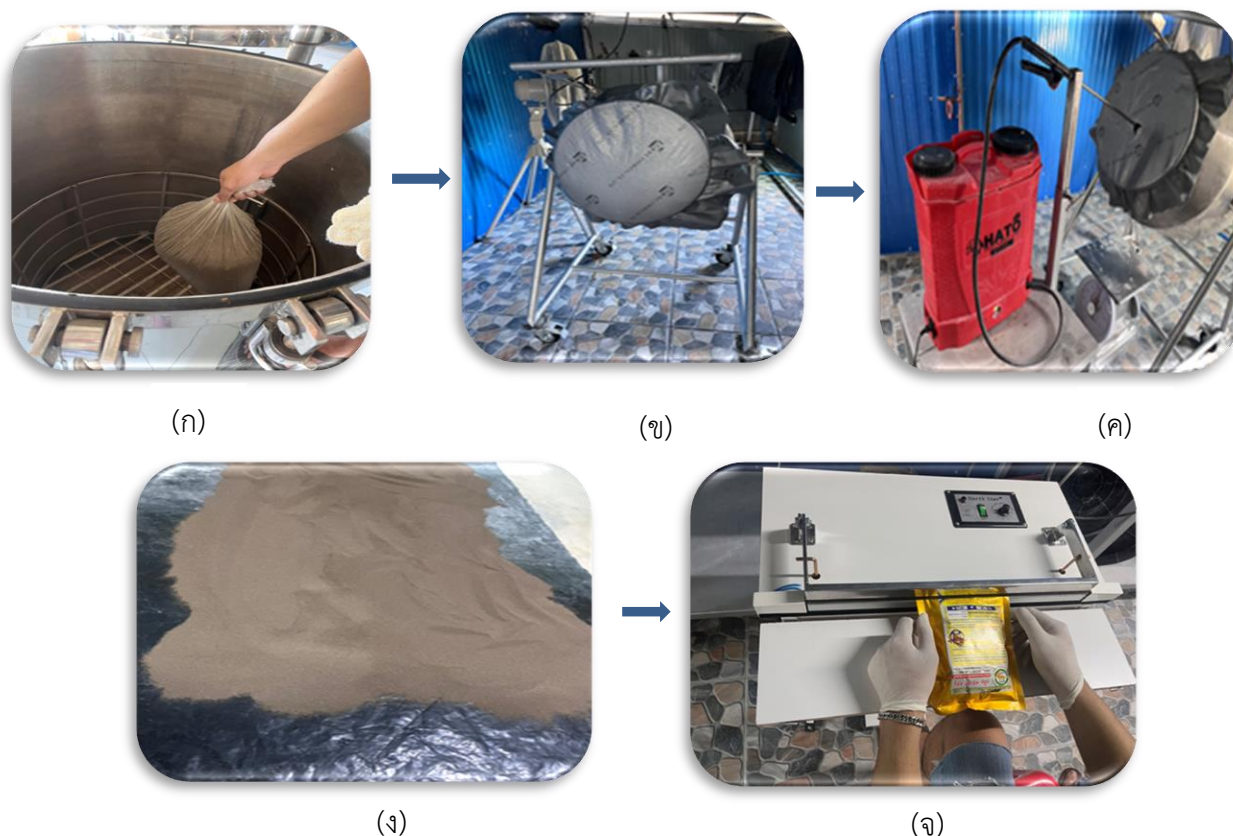
4) นำเชื้อจุลินทรีย์ที่ขยายได้แล้วไปเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณในอาหาร Minimal Medium (MM) ตามคู่มือการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ (ปม.1) ใช้เวลาในการขยายหัวเชื้อจุลินทรีย์ประมาณ 24-36 ชั่วโมง จะได้หัวเชื้อจุลินทรีย์ขยายปริมาณความเข้มข้นที่ 10^9 CFU/ml นำไปผสมกับวัสดุรองรับ

2.4 การผสมหัวเชื้อจุลินทรีย์กับวัสดุรองรับ

2.4.1 ทำความสะอาดและฆ่าเชื้ออุปกรณ์ทุกชิ้นด้วย 70 เปอร์เซ็นต์เมทิลแอลกอฮอล์ โดยเฉพาะสายปั๊มที่ใช้ฉีดหัวเชื้อ ต้องใช้น้ำเปล่าฉีดล้างเพื่อไล่แอลกอฮอล์ออกจากสายให้หมด

2.4.2 นำหัวเชื้อจุลินทรีย์ *B. subtilis* (CH2) ที่ขยายในสูตรอาหาร MM ระดับความเข้มข้นของเชื้อจุลินทรีย์ 10^9 CFU/ml ใส่ในถังเครื่องพ่นละอองฝอย และฉีดพ่นในเครื่องโมัดโนมิติในอัตราสื่อผสม 50 กิโลกรัม : หัวเชื้อจุลินทรีย์น้ำ 10 ลิตร เครื่องพ่นอัตโนมัติจะหมุนไปเรื่อย ๆ จนกว่าน้ำจุลินทรีย์จะหมดจากถังพ่น และเครื่องจะไม่หมุนเพื่อให้หัวเชื้อจุลินทรีย์เข้ากันกับสื่อผสมต่อไปอีก 20 นาที หลังจากน้ำจุลินทรีย์หมด

2.4.3 นำสื่อผสมที่มีหัวเชื้อจุลินทรีย์ผสมเข้ากันเรียบร้อยแล้ว มาตากในห้องปลอดเชื้อและมีระบบระบายอากาศเพื่อไล่ความชื้นอีกรอบ ตากให้แห้งใช้ระยะเวลาประมาณ 7 วัน หรือวัดระดับความชื้นลดลงเหลือ 15 เปอร์เซ็นต์ จึงสามารถนำมาบรรจุในถุงอลูมิเนียมฟอยล์ในปริมาณของละ 100 กรัม (ภาพที่ 3) ในขั้นตอนนี้ หลังจากบรรจุในซองผลิตภัณฑ์แล้ว เก็บรักษาหัวเชื้อไว้ในตู้เย็นหรือในที่ร่มได้นาน 6 เดือน



ภาพที่ 3 ขั้นตอนการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ชนิดผง ก.นึ่งฆ่าเชื้อวัสดุรองรับ ข.วัสดุรองรับในเครื่องผสม ค.ฉีดพ่นน้ำจุลินทรีย์ในเครื่องผสม ง.วัสดุรองรับที่มีหัวเชื้อจุลินทรีย์ผสมตากเพื่อไล่ความชื้นในห้องปลอดเชื้อ จ.บรรจุในถุงออลูมิเนียมฟลอยด์

2.5 การตรวจนับสปอร์ของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดผง ตามวิธีของนฤมล (2560)

ในการผลิตจุลินทรีย์บาซิลลัสชนิดผง มีการควบคุมคุณภาพโดยการสุ่มตัวอย่างผลิตภัณฑ์เพื่อนำมาเพาะเชื้อและนับจำนวนโคโลนี ตลอดจนตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อ *Vibrio* spp. โดยปริมาณบาซิลลัสในของผลิตภัณฑ์ต้องมีปริมาณเชื้อ *B. subtilis* ไม่น้อยกว่า 10^6 CFU/g วิธีการตรวจนับสปอร์ของจุลินทรีย์ชนิดผง ดังนี้

2.5.1 เตรียม NaCl 0.85 เปอร์เซ็นต์ (ซิงโซเดียมคลอไรด์ 0.85 กรัม เติมน้ำกลั่นปรับให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร)

2.5.2 แบ่งน้ำเกลือจากข้อ 1) ใส่ในหลอดทดลองหลอดละ 9 มิลลิลิตร จำนวนหลอดตามที่ต้องการปิดฝาหลอดหลวม ๆ จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นก่อนนำมาใช้งาน

2.5.3 นำจุลินทรีย์ผงในของผลิตภัณฑ์ ชั่งน้ำหนัก 1 กรัม ใส่ใน NaCl 0.85 เปอร์เซ็นต์ 9 มิลลิลิตร จาก 2) ผสมให้มีความเป็นเนื้อเดียวกัน โดยการเขย่าหลอดนาน 15 วินาที หรือเขย่าโดยใช้เครื่องเขย่า (Vertex mixer) จะได้ความเข้มข้นของเชื้อ 10^{-1} นำตัวอย่างในหลอดที่ 1 ไปทำการช็อกด้วยความร้อน (Heat shock) ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที โดยนำไปวางในบีกเกอร์ที่ใส่น้ำ ตั้งบน

เครื่องให้ความร้อน หรือ อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) จากนั้นทำการช็อกด้วยความเย็น (Cold shock) โดยนำมาแช่ในน้ำเย็นทันทีประมาณ 1 นาที หรือจนหลอดทดลองเย็นเพื่อให้ได้สปอร์ของเชื้อจุลินทรีย์

2.5.4 ดูดสารละลายจากหลอดที่ 1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดที่ 2 เขย่าให้เข้ากัน (ความเข้มข้น 10^{-2}) และทำการเจือจางต่อไปเรื่อย ๆ หรือที่เรียกว่า การทำ 10 fold serial dilution จนได้สารละลายที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 10^{-3} , 10^{-4} และ 10^{-5} ตามลำดับ

2.5.5 ดูดสารละลายปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร จากหลอดที่มีความเข้มข้น 10^{-3} , 10^{-4} และ 10^{-5} โดยใช้เครื่องดูดจ่ายสารละลาย (Autopipette) ปล่อยลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร NA (หลอดละ 3 ซ้ำ) จากนั้นใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมทำการเกลี่ยเชื้อให้ทั่ว

2.5.6 บ่มเชื้อในจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.5.7 ตรวจนับโคโลนีที่ขึ้นบนจานเพาะเชื้อ คำนวณเป็นค่า CFU/g

2.5.8 ปริมาณสปอร์ของเชื้อ *B. subtilis* ค่าที่ได้ต้องไม่น้อยกว่า 1.00×10^6 CFU/g

2.6 การทดสอบระยะเวลาความคงตัวของเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์

การทดสอบระยะเวลาความคงตัวของเชื้อจุลินทรีย์ *B. subtilis* ในผลิตภัณฑ์ โดยทำการสุ่มเลือกผลิตภัณฑ์มาจำนวน 12 ถังทุกครั้งที่เกิด และทำการทดสอบโดยการตรวจนับปริมาณสปอร์ของจุลินทรีย์ *B. subtilis* ตามวิธีการตรวจนับสปอร์ของจุลินทรีย์ชนิดผง ทุก ๆ 15 วัน เป็นระยะเวลา 6 เดือน เกณฑ์การยอมรับของผลิตภัณฑ์ ต้องตรวจพบปริมาณสปอร์ของจุลินทรีย์ *B. subtilis* ไม่น้อยกว่า 1.00×10^6 CFU/g ถึงจะผ่านเกณฑ์การยอมรับ (ชัยวุฒิ, 2558)

2.7 การตรวจวิเคราะห์และทดสอบสารสำคัญของหัวเชื้อจุลินทรีย์ *B. subtilis* ในผลิตภัณฑ์

ดำเนินการศึกษาวิจัยตั้งแต่เดือน มีนาคม 2566 ถึง เดือน เมษายน 2566 ทำการตรวจวิเคราะห์ ณ หน่วยความร่วมมือการวิจัย MU-OU:CRC คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

2.7.1 การเตรียมตัวอย่างหัวเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์

2.7.1.1 ชั่งตัวอย่างหัวเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ปริมาณ 25 กรัม ใส่ในถุงพลาสติก เติม Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water (BPB) ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ผสมตัวอย่างด้วยเครื่องตีตัวอย่าง (Stomacher) ให้กระจายทั่ว BPB เป็นเวลา 2 นาที จนได้สารละลายตัวอย่างที่ได้ที่มีการเจือจาง 10^{-1}

2.7.1.2 ปิเปตสารละลายเจือจาง 10^{-1} ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับ BPB ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้ระดับการเจือจาง 10^{-2} เขย่าให้เข้ากัน แล้วทำซ้ำในหลอดต่อไปจนถึงระดับการเจือจางที่เหมาะสม

2.7.2 การตรวจนับปริมาณแบคทีเรีย (Total Aerobic Plate Count)

นำตัวอย่างที่เตรียมไว้จากข้อ 2.7.1.2 ที่เจือจางด้วยความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เทลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar (PCA) โดยทำ 3 ซ้ำ ในแต่ละความเข้มข้น นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีตัวอย่างมาบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เพื่อนำไปตรวจสอบปริมาณและลักษณะของโคโลนีต่อไป

2.7.3 การตรวจนับปริมาณเชื้อ *Bacillus* spp. (Bacillus Count)

นำตัวอย่างที่เตรียมไว้จากข้อ 2.7.1.2 ที่เจือจางด้วยความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เทลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA โดยทำ 3 ซ้ำ ในแต่ละความเข้มข้น นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีตัวอย่างมาบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อนำไปตรวจสอบปริมาณและลักษณะของโคโลนีต่อไป (FDA BAM online, chapter 3)

2.7.4 การปนเปื้อนของยีสต์และรา

2.7.4.1 เตรียมตัวอย่างหัวเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์โดยชั่งตัวอย่างปริมาณ 25 กรัม ใส่ในถุงพลาสติก เติม 0.1 เปอร์เซ็นต์ Peptone Water (PW) ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ผสมตัวอย่างด้วยเครื่องตีตัวอย่างให้กระจายทั่ว PW เป็นเวลา 2 นาที จนได้สารละลายตัวอย่างที่ระดับการเจือจาง 10^{-1}

2.7.4.2 นำตัวอย่างสารละลายมาเจือจาง โดยปิเปตตัวอย่างที่เจือจาง 10^{-1} จากข้อ 1) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับ PW ปริมาตร 9 มิลลิลิตร (เจือจาง 10^{-2}) เขย่าให้เข้ากันแล้วทำซ้ำในหลอดต่อไปจนถึงระดับการเจือจางที่ 10^{-3}

2.7.4.3 นำตัวอย่างที่เจือจางด้วยความเข้มข้น 10^{-1} ถึง 10^{-3} ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เทลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Dichloram Rose Bengal Chloramphenical Agar (DRBC) ในแต่ละความเข้มข้น ทำ 3 ซ้ำ นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีตัวอย่าง มาบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน โดยไม่ต้องคว่ำจานเพาะเชื้อ และวางซ้อนกันไม่เกิน 3 ชั้น จากนั้นนำไปตรวจสอบปริมาณและลักษณะของโคโลนีต่อไป หากยังไม่พบเชื้อภายในเวลาดังกล่าว นำไปบ่มต่ออีก 48 ชั่วโมง และนับจำนวน (FDA BAM online, chapter 18)

2.7.5 การจำแนกชนิดของจุลินทรีย์บาซิลลัสด้วยวิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rRNA gene

นำผลิตภัณฑ์มาแยกเชื้อทำให้บริสุทธิ์ และเลือกตัวแทนเชื้อจำนวน 1 โคโลนี เพื่อขยายปริมาณโดยการเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเชื้อโคโลนีทำการสกัด genomic DNA และนำไปทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primers สำหรับ 16S rRNA gene แล้วนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอด้วยวิธี DNA sequencing หลังจากนั้นนำข้อมูล DNA sequencing ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลเชื้อใน GenBank Database

2.7.6 การทดสอบการไม่สร้างยาปฏิชีวนะของเชื้อ *B. subtilis* ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์ ด้วยวิธี Agar Well Diffusion Assay

2.7.6.1 การเตรียมตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียบ่งชี้ (Indicator bacteria)

นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรียที่ใช้เป็นตัวบ่งชี้ 2 ชนิด ได้แก่ ชนิดแกรมบวก คือ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และชนิดแกรมลบ คือ *Escherichia coli* ATCC 25922 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

2.7.6.2 การเตรียมตัวอย่างเชื้อบาซิลลัสที่ทดสอบ

นำตัวอย่างโคโลนีเดี่ยวของเชื้อบาซิลลัสที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์ มาเพิ่มปริมาณในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างเชื้อที่ได้ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร (2 เปอร์เซ็นต์ inoculum) โดยเลี้ยงแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่เวลา 24, 48

และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ และนำตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที โดยแบ่งตัวอย่างที่เก็บได้เป็น 2 ชุดการทดลอง ดังนี้

ชุดที่ 1 Cell Pellet (CP) เป็นส่วนของเซลล์ที่ตกตะกอนหลังการปั่นเหวี่ยง โดยนำตะกอนเซลล์ที่ได้มาเติม Physiological Saline Solution 0.85 เปอร์เซ็นต์ (0.85% PSS) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากัน

ชุดที่ 2 Supernatant (SP) เป็นส่วนของของเหลวที่ได้หลังการปั่นเหวี่ยง ซึ่งผ่านการกรองด้วยแผ่นกรองขนาดรูเปิด 0.45 ไมโครเมตร (μm)

2.7.7 การทดสอบการยับยั้งเชื้อด้วยวิธี Agar Well Diffusion Assay

นำเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบที่ใช้เป็นแบคทีเรียบ่งชี้ที่เตรียมไว้ มาปรับความเข้มข้นของเชื้อ โดยใช้สารละลาย 0.85 เปอร์เซ็นต์ PSS (Physiological Saline Solution) เทียบกับ 0.5 McFarland standard ให้ได้ปริมาณเชื้อ 1.50×10^8 CFU/ml และใช้ไม้ปั่นสำลีที่ปราศจากเชื้อมาจุ่มลงในตัวอย่างแบคทีเรียบ่งชี้ เพื่อทำให้ทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA 1 ชนิดต่อ 1 จานอาหารหลังจากนั้นใช้ที่เจาะไม้ก๊อกที่ฆ่าเชื้อแล้ว (Sterile cork borer) เส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร เจาะหลุมจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA หยดตัวอย่างเชื้อ *B. subtilis* ที่ต้องการทดสอบ ทั้ง CP และ SP ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในหลุมที่เจาะเตรียมไว้ โดยมีตัวอย่างควบคุมชนิด Positive control เป็นยาปฏิชีวนะ (Ampicillin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม /มิลลิลิตร) และชนิด Negative control เป็น TSB ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อสังเกตวงใสบริเวณที่เชื้อไม่ขึ้น (Inhibition zone) แล้วบันทึกผลหน่วยเป็นมิลลิเมตร

2.8 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์จากผลการวิเคราะห์และทดสอบผลิตภัณฑ์ ตามหลักเกณฑ์การขึ้นทะเบียนผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ปรับสภาพน้ำที่ใช้ทางการประมง (ภาคผนวกที่ 2)

ส่วนที่ 3 การทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์บาซิลลัสในการควบคุมสารอินทรีย์ที่เป็นของเสียจากสิ่งขับถ่ายของกุ้งที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ดำเนินการศึกษาวิจัยประสิทธิภาพของจุลินทรีย์บาซิลลัสในการควบคุมสารอินทรีย์ในของเสียสิ่งขับถ่ายจากการเลี้ยงกุ้งในห้องปฏิบัติการ ตั้งแต่เดือนมีนาคม 2566 ถึง เดือน เมษายน 2566 ณ.ห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยธุรกิจเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาชีววิทยาประมง คณะประมงมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิธีดำเนินการ

3.1 การเตรียมสารอินทรีย์

รวบรวมสารอินทรีย์จากการเลี้ยงกุ้งในห้องปฏิบัติการ โดยทำการเลี้ยงกุ้งขนาด 12 กรัม จำนวน 30 ตัว ในถังไฟเบอร์กลาสขนาดความจุ 500 ลิตร จำนวน 12 ถัง ใช้น้ำทะเลความเค็ม 20 ส่วนในพันส่วนให้อาหาร 3 มื้อต่อวัน (3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว) หลังจากเลี้ยงกุ้งนาน 7 วัน ทำการเก็บรวบรวมสารอินทรีย์ในแต่ละถังจนได้ปริมาตรรวมประมาณ 400 ลิตร

3.2 การเตรียมน้ำทะเลสำหรับการทดลอง

ก่อนนำน้ำมาใช้ในการทดลอง 7 วัน น้ำใช้ต้องผ่านการฆ่าเชื้อด้วยแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ 70 เปอร์เซ็นต์ ในระดับความเข้มข้น 25 ส่วนในล้านส่วน (พีพีเอ็ม) เปิดเครื่องให้อากาศตลอดเวลาเพื่อกำจัดคลอรีนที่หลงเหลืออยู่ออกจนหมด และใช้โพแทสเซียมไอโอไดด์ตรวจสอบน้ำต้องไม่มีคลอรีนหลงเหลืออยู่ พร้อมทั้งฆ่าเชื้ออุปกรณ์ที่นำมาใช้ด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3.3 การเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์จากผลิตภัณฑ์ CH2

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองเป็นผลิตภัณฑ์ชนิดผงที่มีปริมาณสปอร์ของจุลินทรีย์ *B.subtilis* (CH2) ไม่น้อยกว่า 1.00×10^6 CFU/g ซึ่งเป็นกลุ่มบาสิลลัสที่แยกได้จากพื้นที่ โดยคัดเลือกจุลินทรีย์ 1 ชนิด ที่มีคุณสมบัติในการย่อยสลายสารอินทรีย์ โดยใช้ผลิตภัณฑ์ CH2 200 กรัม และอาหารกึ่งบดละเอียด 200 กรัม ผสมในน้ำสะอาด 200 ลิตร แล้วให้อากาศเป็นระยะเวลา 36-38 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้ในการทดลอง

3.4 การดำเนินการทดลอง

3.4.1 สุ่มสารอินทรีย์จากข้อ 3.1 ไปวิเคราะห์ปริมาณสารอินทรีย์ (organic matter) และนำไปใส่ในตู้กระจกทดลองขนาด 40X70X40 เซนติเมตร ที่มีปริมาตร 110 ลิตร โดยใส่สารอินทรีย์ลงไปปริมาตรตู้ละ 20 ลิตร แล้วเติมน้ำสะอาดให้ได้ปริมาตรตู้ละ 60 ลิตร จำนวน 20 ตู้ ตั้งไว้ในอุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส มีเครื่องให้อากาศตลอดเวลา จากนั้นจึงเริ่มทำการทดลองโดยเติมผลิตภัณฑ์ CH2 ที่เพิ่มปริมาณตามข้อ 3.3 แบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้

ชุดทดลองที่ 1 (กลุ่มควบคุม) ไม่มีการเติม CH2 ที่เพิ่มปริมาณตามข้อ 3.3 ในตู้กระจกทดลอง จำนวน 5 ตู้

ชุดทดลองที่ 2 (300 ลิตร/ไร่) เติม CH2 ที่เพิ่มปริมาณตามข้อ 3.3 ปริมาณ 11.40 มิลลิลิตรต่อตู้ จำนวน 5 ตู้

ชุดทดลองที่ 3 (500 ลิตร/ไร่) เติม CH2 ที่เพิ่มปริมาณตามข้อ 3.3 ปริมาณ 18.60 มิลลิลิตรต่อตู้ จำนวน 5 ตู้

ชุดทดลองที่ 4 (700 ลิตร/ไร่) เติม CH2 ที่เพิ่มปริมาณตามข้อ 3.3 ปริมาณ 26.40 มิลลิลิตรต่อตู้ จำนวน 5 ตู้

หมายเหตุ : คำนวณอัตราส่วนการเติมผลิตภัณฑ์ต่อพื้นที่ 1 ไร่ น้ำลึก 1 เมตร

3.4.2 เริ่มต้นสุ่มวิเคราะห์ปริมาณสารอินทรีย์รวมจากทุกกลุ่มการทดลอง หลังจากนั้นกลุ่มที่ 2, 3 และ 4 ใส่ผลิตภัณฑ์ในปริมาณดังที่กล่าวไว้ข้างต้น และทุก ๆ 7 วัน ในวันที่ 7, 14 และ 21 ของการทดลอง เก็บตัวอย่างตะกอนบริเวณก้นตู้นำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารอินทรีย์รวม โดยวิธี Ignition loss (นิคม และยงยุทธ, 2546) ดังนี้

3.4.2.1 เก็บสารอินทรีย์บริเวณก้นตู้โดยใช้กระบอกล้างสุญญากาศให้ได้สารอินทรีย์ในปริมาณรวม 2 กรัม ในแต่ละกลุ่มการทดลองมาอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน จากนั้นนำสารอินทรีย์ไปบดให้ละเอียดเพื่อนำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

3.4.2.2 นำถ้วยcrucible (crucible) ที่ผ่านการเผาที่อุณหภูมิ 450 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง เสร็จแล้วนำไปพักไว้ในโถดูดความชื้นเพื่อรอให้ crucible เย็นลง ทำการการชั่งน้ำหนัก crucible และจดบันทึกน้ำหนัก (Cunniff, 1995)

3.4.3 นำตัวอย่างสารอินทรีย์ที่ผ่านการบดแล้ว มาชั่งลงใน crucible ที่ทราบน้ำหนัก จากนั้น นำตัวอย่างสารอินทรีย์ที่ชั่งได้ไปเผาที่อุณหภูมิ 550 ± 50 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง เสร็จแล้วทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น นำ crucible ไปชั่งเพื่อหาน้ำหนักสารอินทรีย์หลังเผาแล้วคำนวณหาน้ำหนักที่หายไป และคำนวณหาค่า organic matter content (เปอร์เซ็นต์) โดยใช้สูตร

$$\text{organic matter content (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{(\text{น้ำหนักสารอินทรีย์แห้งที่หายไป} \times 100)}{\text{น้ำหนักสารอินทรีย์ก่อนเผา}}$$

3.5 การวิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำ

เก็บตัวอย่างน้ำในตู้กระจกทดลองทั้ง 20 ตู้ ทั้ง 4 กลุ่มการทดลอง โดยเก็บตัวอย่างน้ำทุก ๆ 7 วัน จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง โดยเริ่มเก็บตัวอย่างตั้งแต่เริ่มการทดลองเพื่อวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียรวม (Total ammonia-nitrogen) วัดโดยวิธี Phenol-hypochlorite method และปริมาณ ไนไตรท์ (Nitrite-nitrogen) (APHA *et al.*, 1995)

3.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของปริมาณสารอินทรีย์รวม โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มทดลองโดยใช้วิธี Duncan's new Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ

ส่วนที่ 4 สํารวจความพึงพอใจของเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในการใช้จุลินทรีย์ชนิดที่คัดแยกได้จากพื้นที่ความเค็มต่ำจังหวัดฉะเชิงเทรา

วิธีดำเนินการ

4.1 เก็บรวบรวมข้อมูลจากแบบสำรวจความพึงพอใจของเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมที่ใช้จุลินทรีย์ชนิดที่คัดแยกได้จากพื้นที่ความเค็มต่ำจังหวัดฉะเชิงเทรา จำนวน 51 ราย ในเดือนกันยายน 2566

โดยการคัดเลือกเกษตรกรจากการสุ่มอย่างเฉพาะเจาะจง (Purposive Sampling) และไม่เปิดเผยรายชื่อเกษตรกรผู้ให้สัมภาษณ์ เครื่องมือในการสัมภาษณ์ใช้แบบสอบถาม เพื่อรวบรวมข้อมูลเกษตรกร ข้อมูลฟาร์มเลี้ยงกุ้งทะเล การใช้จุลินทรีย์ การกระจายผลผลิตและการตลาด และความพึงพอใจต่อการใช้จุลินทรีย์ ตามภาคผนวกที่ 1 โดยมีหัวข้อดังแสดงในตารางที่ 1 และวิเคราะห์ข้อมูล โดยนำข้อมูลจากแบบสำรวจเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมชนิดที่คัดแยกได้จากพื้นที่ฉะเชิงเทรา มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของแต่ละรายการที่ทำการสำรวจ เพื่อให้เห็นถึงแนวทางในการพัฒนาทางเทคนิคต่าง ๆ ในการเลี้ยงที่มีการปรับใช้จุลินทรีย์ในการจัดการฟาร์ม

ตารางที่ 1 ข้อมูลสำรวจความพึงพอใจของเกษตรกรที่ใช้จุลินทรีย์ชนิดที่คัดแยกได้จากพื้นที่ความเค็มต่ำ
จังหวัดฉะเชิงเทรา

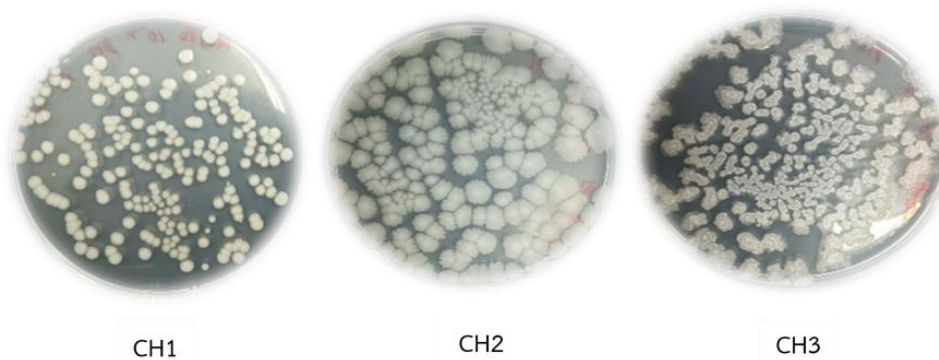
ประเภทข้อมูล	ข้อมูล
1. ข้อมูลเกษตรกร	1. ชื่อ - สกุล เจ้าของฟาร์ม 2. เพศ 3. ระดับวุฒิการศึกษา 4. จำนวนสมาชิกในครัวเรือนทั้งหมด 5. อาชีพหลัก/อาชีพรอง/อาชีพเสริม
2. ข้อมูลฟาร์มเลี้ยงกุ้งทะเล	1. ชื่อฟาร์ม/ประสบการณ์ในการเลี้ยงกุ้งทะเล 2. ที่ตั้งฟาร์ม 3. เป็นสมาชิกของกลุ่มต่าง ๆ ในธุรกิจเกี่ยวกับกุ้ง 4. ประเภทของการจดทะเบียนฟาร์ม 5. พื้นที่ฟาร์มทั้งหมด 6. โครงสร้างบ่อเลี้ยง 7. ลักษณะการเลี้ยง 8. มาตรฐานฟาร์มในการเลี้ยงกุ้งทะเล 9. ระบบการเลี้ยง จำแนกตามการใช้ น้ำ 10. แหล่งน้ำที่ใช้การเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล 11. รูปแบบของเทคโนโลยี/นวัตกรรม
3. การใช้จุลินทรีย์ในการเพาะเลี้ยงกุ้ง	1. หัวเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ 2. กิจกรรมและปริมาณการใช้จุลินทรีย์
4. การกระจายผลผลิตและการตลาดกุ้งทะเล	1. ลักษณะการจำหน่าย/ช่องทางการจำหน่ายผลผลิต 2. ลักษณะการจับกุ้ง/รูปแบบการจำหน่าย 3. ราคากุ้งที่จับขายแต่ละขนาด 4. เหตุที่จับขาย ลักษณะการจำหน่ายกุ้ง 5. จำนวนผลผลิตทั้งหมด
5. ความพึงพอใจต่อการใช้อหัวเชื้อจุลินทรีย์	1. ประสิทธิภาพในการจัดการคุณภาพน้ำ 2. ประสิทธิภาพในการป้องกันการเกิดโรค 3. ประสิทธิภาพในการรักษาโรค 4. ประสิทธิภาพต่อความแข็งแรงของกุ้ง 5. ช่วยลดต้นทุนการผลิต/ช่วยเพิ่มผลผลิต

ผลการศึกษา

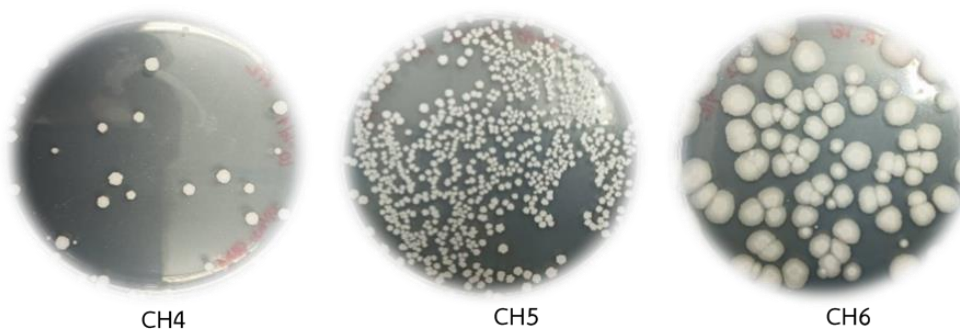
ส่วนที่ 1 ผลการศึกษาชนิดของจุลินทรีย์บาซิลลัสจากฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในพื้นที่เลี้ยงความเค็มต่ำของจังหวัดฉะเชิงเทรา และความสามารถในการครอบครองเชื้อ Vp_{AHPND}

1.1 สันฐานวิทยาภายนอกของโคโลนีจุลินทรีย์บาซิลลัส

การคัดแยกจุลินทรีย์จากดินก้นบ่อเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมแบบพัฒนาในพื้นที่ความเค็มต่ำที่ประสบความสำเร็จในการเลี้ยงด้วยจุลินทรีย์ และตรวจไม่พบเชื้อ Vp_{AHPND} ในฟาร์มเลี้ยงกุ้งติดต่อกันมาเป็นระยะเวลา 3 ปี พบเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มบาซิลลัสที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จำนวน 6 ชนิด มีลักษณะสันฐานวิทยาภายนอกของโคโลนีจุลินทรีย์บาซิลลัส ดังนี้ มีลักษณะกลม ขอบหยัก ขอบเรียบ ผิวมันวาวใส มีสีขาวขุ่น ผิวเมือกเยิ้ม รายละเอียดดังตารางที่ 2 (ภาพที่ 4 และภาพที่ 5)



ภาพที่ 4 ลักษณะของโคโลนีของจุลินทรีย์ที่ตรวจพบจากตัวอย่างดิน CH1 – CH3



ภาพที่ 5 ลักษณะของโคโลนีของจุลินทรีย์ที่ตรวจพบจากตัวอย่างดิน CH4 – CH6

1.2 การตรวจสอบลักษณะของเซลล์ และการย้อมแกรมจุลินทรีย์

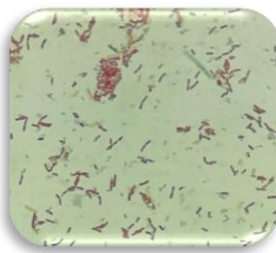
ผลจากการย้อมแกรมของเซลล์จุลินทรีย์ที่ได้จากตัวอย่างดินในบ่อเลี้ยงกุ้งแบบพัฒนาในพื้นที่ความเค็มต่ำของฟาร์มที่มีการจัดการการเลี้ยงด้วยจุลินทรีย์ตลอดการเลี้ยงจังหวัดฉะเชิงเทรา พบว่า เซลล์จุลินทรีย์ทั้ง 6 สายพันธุ์ เป็นรูปแท่ง แกรมบวก ติดสีม่วงหรือน้ำเงินของสี Crystal violet รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 2 และภาพที่ 6

ตารางที่ 2 สัณฐานวิทยาภายนอกของจุลินทรีย์ทั้ง 6 ชนิด

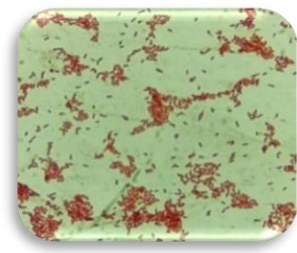
ลำดับที่	รหัส	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะของเซลล์	แกรม บวก/ลบ
1	CH1	กลมสีขาวครีม ขอบเรียบ ผิวเยิ้ม	รูปแท่ง ติดสื่อน้ำเงินม่วง	บวก
2	CH2	สีขาวครีม ขอบหยัก แบนติดผิวอาหาร	รูปแท่ง ติดสื่อน้ำเงินม่วง	บวก
3	CH3	สีขาวครีม ขอบหยัก นูนติดผิวอาหาร	รูปแท่ง ติดสื่อน้ำเงินม่วง	บวก
4	CH4	สีขาวครีม ขอบหยัก	รูปแท่ง ติดสื่อน้ำเงินม่วง	บวก
5	CH5	สีขาวครีม ขอบหยัก แบนติดผิวอาหาร	รูปแท่ง ติดสื่อน้ำเงินม่วง	บวก
6	CH6	สีขาวครีม ขอบเรียบ ผิวเมือกเยิ้ม	รูปแท่ง ติดสื่อน้ำเงินม่วง	บวก



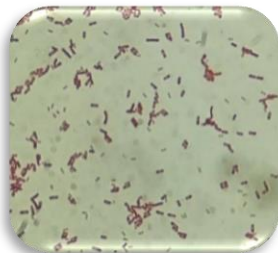
CH1



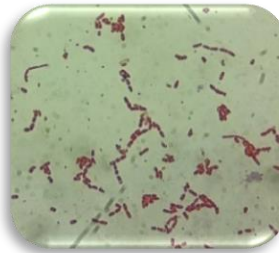
CH2



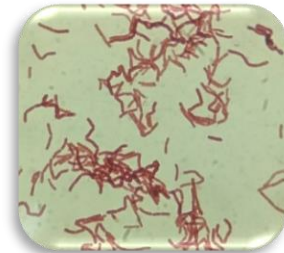
CH3



CH4



CH5



CH6

ภาพที่ 6 ลักษณะของเซลล์จุลินทรีย์ที่ได้จากการย้อมแกรม จำนวน 6 ชนิด

1.3 การจำแนกชนิดของจุลินทรีย์คัดเลือkdด้วยวิธี 16S rRNA

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยวิธี 16S rRNA พบว่าจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ จำนวน 6 ไอโซเลท (Isolate) จัดอยู่ในครอบครัว Bacillaceae ได้แก่ *B. megaterium* (CH1), *B. subtilis* (CH2), *B. paralicheniformis* (CH3), *B. amyloliquefaciens* (CH4), *B. siamensis* (CH5) และ *B. velezensis* (CH6) โดยจุลินทรีย์ทั้ง 6 ไอโซเลท (Isolate) มีค่าความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ (Similarity) 99.00 เปอร์เซนต์ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 จำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี 16S rRNA

ลำดับที่	รหัส	ชนิดของจุลินทรีย์	ค่าความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ (เปอร์เซ็นต์)
1	CH1	<i>B. megaterium</i>	99.00
2	CH2	<i>B. subtilis</i>	99.00
3	CH3	<i>B. paralicheniformis</i>	99.00
4	CH4	<i>B. amyloliquefaciens</i>	99.00
5	CH5	<i>B. siamensis</i>	99.00
6	CH6	<i>B. velezensis</i>	99.00

1.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์บาซิลลัสในหลอดทดลอง

ผลการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์บาซิลลัส ได้แก่ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และความเค็ม ดังนี้

1.4.1 อุณหภูมิ

ความสามารถในการเจริญของจุลินทรีย์บาซิลลัสในระดับของอุณหภูมิที่ 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส ผลการศึกษาพบว่า *B. subtilis* (CH2) มีการเจริญดีที่สุดที่ระดับอุณหภูมิ 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส โดยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และมีการเจริญดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์บาซิลลัสอีก 5 ชนิด โดยที่อุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส จุลินทรีย์ *B. subtilis* (CH2) มีปริมาณจุลินทรีย์ เท่ากับ $2.70 \times 10^7 \pm 7.07 \times 10^2$ CFU/ml รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ความสามารถในการเจริญของจุลินทรีย์บาซิลลัสในแต่ละระดับของอุณหภูมิ

เชื้อทดสอบ	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) / (CFU/ml)		
	30	35	40
<i>B. megaterium</i> (CH1)	$1.84 \times 10^7 \pm 3.53 \times 10^2$ ^{aA}	$3.75 \times 10^7 \pm 6.50 \times 10^4$ ^{aA}	$5.40 \times 10^7 \pm 1.48 \times 10^2$ ^{aA}
<i>B. subtilis</i> (CH2)	$2.70 \times 10^7 \pm 7.07 \times 10^2$ ^{aA}	$5.92 \times 10^7 \pm 1.41 \times 10^2$ ^{aA}	$8.57 \times 10^7 \pm 1.27 \times 10^3$ ^{aA}
<i>B. paralicheniformis</i> (CH3)	$1.79 \times 10^7 \pm 6.36 \times 10^3$ ^{aA}	$2.47 \times 10^7 \pm 8.48 \times 10^2$ ^{aA}	$3.60 \times 10^7 \pm 8.48 \times 10^3$ ^{aA}
<i>B. amyloliquefaciens</i> (CH4)	$6.00 \times 10^6 \pm 2.82 \times 10^2$ ^{bB}	$7.10 \times 10^6 \pm 1.55 \times 10^3$ ^{bB}	$8.15 \times 10^6 \pm 6.36 \times 10^2$ ^{bB}
<i>B. siamensis</i> (CH5)	$2.05 \times 10^7 \pm 4.17 \times 10^3$ ^{aA}	$2.63 \times 10^7 \pm 2.61 \times 10^2$ ^{aA}	$2.95 \times 10^7 \pm 1.41 \times 10^3$ ^{aA}
<i>B. velezensis</i> (CH6)	$2.51 \times 10^7 \pm 3.18 \times 10^2$ ^{aA}	$3.94 \times 10^7 \pm 6.15 \times 10^3$ ^{aA}	$5.10 \times 10^7 \pm 4.94 \times 10^4$ ^{aA}

หมายเหตุ อักษรที่กำกับด้วยภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กในแนวนอน และอักษรที่กำกับด้วยภาษาอังกฤษตัวพิมพ์ใหญ่ในแนวนอน ที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

1.4.2 ความเป็นกรด-ด่าง (pH)

ความสามารถในการเจริญของจุลินทรีย์บาซิลลัสในระดับของค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่ pH 4 , 7 และ 10 ผลการศึกษาพบว่าที่ระดับ pH 4 จุลินทรีย์ *B. siamensis* (CH5) มีการเจริญดีที่สุด โดยมีปริมาณจุลินทรีย์ เท่ากับ $9.20 \times 10^7 \pm 6.30 \times 10^2$ CFU/ml และที่ระดับ pH 7 จุลินทรีย์ *B. siamensis* (CH5) มีการเจริญดีที่สุด โดยมีปริมาณจุลินทรีย์เท่ากับ $1.17 \times 10^8 \pm 8.62 \times 10^3$ CFU/ml และที่ระดับ pH 10 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้ง 6 ชนิดมีปริมาณลดลงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ความสามารถในการเจริญของจุลินทรีย์บาซิลลัสต่อค่าความเป็นกรด - ด่าง (pH)

เชื้อทดสอบ	ค่าความเป็นกรด - ด่าง (pH) (CFU/ml)		
	4	7	10
<i>B. megaterium</i> (CH1)	$3.39 \times 10^7 \pm 1.60 \times 10^2$ bA	$2.24 \times 10^7 \pm 6.35 \times 10^3$ bA	$1.00 \times 10^5 \pm 1.40 \times 10^2$ cC
<i>B. subtilis</i> (CH2)	$7.60 \times 10^7 \pm 2.82 \times 10^3$ bA	$8.24 \times 10^7 \pm 4.24 \times 10^3$ bA	$1.65 \times 10^6 \pm 3.53 \times 10^3$ bB
<i>B. paralicheniformis</i> (CH3)	$3.28 \times 10^7 \pm 4.94 \times 10^3$ bA	$4.04 \times 10^7 \pm 1.30 \times 10^2$ bA	$3.50 \times 10^6 \pm 8.48 \times 10^3$ bB
<i>B. amyloliquefaciens</i> (CH4)	$3.90 \times 10^7 \pm 2.47 \times 10^3$ bA	$3.90 \times 10^7 \pm 9.80 \times 10^2$ bA	$4.50 \times 10^5 \pm 2.10 \times 10^2$ cC
<i>B. siamensis</i> (CH5)	$9.20 \times 10^7 \pm 6.30 \times 10^2$ bA	$1.17 \times 10^8 \pm 8.62 \times 10^3$ aA	$1.00 \times 10^5 \pm 7.20 \times 10^2$ cC
<i>B. velezensis</i> (CH6)	$2.40 \times 10^6 \pm 5.61 \times 10^3$ cB	$2.55 \times 10^6 \pm 7.20 \times 10^2$ cB	$1.70 \times 10^6 \pm 2.82 \times 10^3$ dB

หมายเหตุ อักษรที่กำกับด้วยภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กในแนวนตั้ง และอักษรที่กำกับด้วยภาษาอังกฤษตัวพิมพ์ใหญ่ในแนวนอน ที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

1.4.3 ความเค็ม

การศึกษาความสามารถในการเจริญของจุลินทรีย์บาซิลลัสในระดับความเค็มที่ 0-40 ส่วนในพันส่วน พบว่า *B. paralicheniformis* (CH3) มีการเจริญดีที่สุดในช่วงความเค็ม 0 – 40 ส่วนในพันส่วน โดยมีปริมาณจุลินทรีย์สูงสุดในระดับความเค็มที่ 30 ส่วนในพันส่วน เท่ากับ $2.21 \times 10^8 \pm 1.64 \times 10^3$ CFU/ml รองลงมา คือ *B. siamensis* (CH5) ที่มีการเจริญดีช่วงความเค็ม 0 - 20 ส่วนในพันส่วน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วน *B. amyloliquefaciens* (CH4) มีการเจริญดีที่สุดในช่วงความเค็มที่ 40 ส่วนในพันส่วน โดยมีปริมาณจุลินทรีย์สูงสุด เท่ากับ $1.34 \times 10^8 \pm 9.19 \times 10^3$ CFU/ml แต่ก็ยังมีการเจริญน้อยกว่า *B. paralicheniformis* (CH3) มีการเจริญดีที่สุด โดยมีปริมาณจุลินทรีย์เท่ากับ $1.54 \times 10^8 \pm 3.60 \times 10^3$ CFU/ml รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ความสามารถในการเจริญของจุลินทรีย์บาซิลลัสในแต่ละระดับความเค็ม

เชื้อทดสอบ	ระดับความเค็ม (ส่วนในพันส่วน) (CFU/ml)					
	0	5	10	20	30	40
40 <i>B. megaterium</i> (CH1)	$1.10 \times 10^7 \pm 1.34 \times 10^3$ ^{bA}	$6.90 \times 10^7 \pm 4.90 \times 10^2$ ^{bA}	$4.81 \times 10^7 \pm 8.40 \times 10^2$ ^{bA}	$3.40 \times 10^7 \pm 8.48 \times 10^3$ ^{bB}	$5.08 \times 10^7 \pm 6.71 \times 10^3$ ^{bB}	$3.85 \times 10^7 \pm 5.51 \times 10^3$ ^{bB}
<i>B. subtilis</i> (CH2)	$6.08 \times 10^7 \pm 4.24 \times 10^3$ ^{bA}	$7.98 \times 10^7 \pm 4.20 \times 10^2$ ^{bA}	$4.56 \times 10^7 \pm 1.06 \times 10^2$ ^{bA}	$6.30 \times 10^7 \pm 4.94 \times 10^3$ ^{bB}	$4.32 \times 10^7 \pm 9.89 \times 10^3$ ^{bB}	$9.40 \times 10^7 \pm 1.48 \times 10^3$ ^{bB}
<i>B. paralicheniformis</i> (CH3)	$2.09 \times 10^8 \pm 5.65 \times 10^3$ ^{aA}	$1.66 \times 10^8 \pm 2.26 \times 10^3$ ^{aA}	$1.74 \times 10^8 \pm 7.77 \times 10^3$ ^{aA}	$1.27 \times 10^8 \pm 1.55 \times 10^3$ ^{aA}	$2.21 \times 10^8 \pm 1.64 \times 10^3$ ^{aA}	$1.54 \times 10^8 \pm 3.60 \times 10^3$ ^{aA}
<i>B. amyloliquefaciens</i> (CH4)	$4.14 \times 10^7 \pm 1.13 \times 10^4$ ^{bA}	$6.88 \times 10^7 \pm 5.65 \times 10^3$ ^{bA}	$1.66 \times 10^7 \pm 2.10 \times 10^2$ ^{bA}	$1.70 \times 10^6 \pm 2.82 \times 10^3$ ^{CC}	$8.50 \times 10^7 \pm 7.00 \times 10^2$ ^{bB}	$1.34 \times 10^8 \pm 9.19 \times 10^3$ ^{aA}
<i>B. siamensis</i> (CH5)	$1.02 \times 10^8 \pm 9.61 \times 10^3$ ^{aA}	$1.33 \times 10^8 \pm 1.21 \times 10^3$ ^{aA}	$1.72 \times 10^8 \pm 1.30 \times 10^2$ ^{aA}	$1.61 \times 10^8 \pm 141 \times 10^4$ ^{aA}	$1.24 \times 10^7 \pm 1.55 \times 10^3$ ^{bB}	$1.86 \times 10^7 \pm 2.30 \times 10^2$ ^{bB}
<i>B. velezensis</i> (CH6)	$6.80 \times 10^6 \pm 1.50 \times 10^2$ ^{cB}	$4.06 \times 10^7 \pm 1.50 \times 10^3$ ^{bA}	$1.47 \times 10^7 \pm 9.80 \times 10^2$ ^{bA}	$1.14 \times 10^7 \pm 3.53 \times 10^3$ ^{bB}	$3.71 \times 10^7 \pm 4.73 \times 10^3$ ^{bB}	$3.75 \times 10^7 \pm 1.20 \times 10^2$ ^{bB}

หมายเหตุ อักษรที่กำกับด้วยภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กในแนวนอน และอักษรที่กำกับด้วยภาษาอังกฤษตัวพิมพ์ใหญ่ในแนวนอน ที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

1.5. ประสิทธิภาพในการครอบครองเชื้อ Vp_{AHPND} ของจุลินทรีย์บาซิลลัส ด้วยวิธี Co-culture

ในระยะเวลาเริ่มต้น ปริมาณเชื้อ Vp_{AHPND} ในชุดควบคุม มีปริมาณความเข้มข้นของเชื้อ Vp_{AHPND} $1.20 \times 10^7 \pm 4.94 \times 10^3$ CFU/ml ปริมาณเชื้อบาซิลลัสในแต่ละชนิดอยู่ในช่วง $1.30 \times 10^7 \pm 1.37 \times 10^3$ - $2.35 \times 10^7 \pm 7.70 \times 10^2$ CFU/ml เมื่อนำเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดมาเลี้ยงร่วมกันกับเชื้อ Vp_{AHPND} ในหลอดทดลอง และผลการทดลองประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์บาซิลลัสต่อการครอบครองเชื้อ Vp_{AHPND} ในหลอดทดลองโดยวิธี Co-culture มีดังนี้

จากการทดลองเลี้ยงร่วมกันระหว่างเชื้อจุลินทรีย์บาซิลลัสในแต่ละชนิดกับเชื้อ Vp_{AHPND} ในหลอดทดลอง พบว่า *B. subtilis* (CH2) เป็นจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการครอบครองเชื้อ Vp_{AHPND} ได้มากที่สุด ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 และ ชั่วโมงที่ 24 โดยปริมาณเชื้อ Vp_{AHPND} ในหลอดทดลองลดลง $2.00 \times 10^4 \pm 7.78 \times 10^3$ CFU/ml และ $3.10 \times 10^2 \pm 2.80 \times 10^1$ CFU/ml ตามลำดับ และในเวลา 36 ชั่วโมง เชื้อจุลินทรีย์ *B. amyloliquefaciens* (CH4) มีประสิทธิภาพในการครอบครองเชื้อ Vp_{AHPND} ได้มากที่สุด รองลงมาได้แก่ *B. velezensis* (CH6), *B. subtilis* (CH2), *B. paralicheniformis* (CH3) และ *B. megaterium* (CH1) โดยมีปริมาณเชื้อ Vp_{AHPND} ลดลง $2.50 \times 10^2 \pm 4.20 \times 10^1$, $4.00 \times 10^2 \pm 1.38 \times 10^3$, $4.32 \times 10^2 \pm 3.50 \times 10^1$, $5.40 \times 10^2 \pm 2.80 \times 10^1$ และ $7.50 \times 10^2 \pm 7.70 \times 10^1$ CFU/ml ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่า มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณเชื้อ Vp_{AHPND} ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่จะแตกต่างกับ *B. siamensis* (CH5) และเชื้อ Vp_{AHPND} ชุดควบคุม ที่มีปริมาณเชื้อ Vp_{AHPND} ในหลอดทดลอง $2.74 \times 10^4 \pm 9.10 \times 10^2$ และ $5.25 \times 10^7 \pm 6.36 \times 10^3$ CFU/ml อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ระยะเวลาที่ 48 ชั่วโมง ปริมาณเชื้อ Vp_{AHPND} เริ่มสูงขึ้นเล็กน้อยอยู่ในระดับ 10^3 CFU/ml เชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการครอบครองเชื้อ Vp_{AHPND} ในเวลา 48 ชั่วโมง ได้แก่เชื้อจุลินทรีย์ *B. amyloliquefaciens* (CH4), *B. velezensis* (CH6), *B. megaterium* (CH1) และ *B. paralicheniformis* (CH3) โดยมีปริมาณเชื้อ Vp_{AHPND} ลดลงที่ $1.78 \times 10^3 \pm 4.24 \times 10^2$, $3.95 \times 10^3 \pm 7.54 \times 10^3$, $6.70 \times 10^3 \pm 5.66 \times 10^2$ และ $6.78 \times 10^3 \pm 6.36 \times 10^2$ CFU/ml ตามลำดับ ในส่วนของ *B. subtilis* (CH2) และ *B. siamensis* (CH5) มีประสิทธิภาพในการครอบครองเชื้อ Vp_{AHPND} ลดน้อยลง โดยพบเชื้อ Vp_{AHPND} เริ่มสูงมากขึ้น 7.05×10^4 และ 1.65×10^5 CFU/ml (ตารางที่ 7)

นอกจากศึกษาประสิทธิภาพในการครอบครองเชื้อไวรัส Vp_{AHPND} แล้วยังตรวจนับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหาร NA เพื่อตรวจสอบความสอดคล้องของปริมาณจุลินทรีย์บาซิลลัสในหลอดทดลองที่เลี้ยงแบบ Co-culture โดยผลการศึกษา ดังนี้

ในเวลาเริ่มต้นที่ 0 ชั่วโมง ปริมาณเชื้อ Vp_{AHPND} ชุดควบคุมที่เจริญบนอาหาร NA มีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ Vp_{AHPND} $1.65 \times 10^7 \pm 2.82 \times 10^4$ CFU/ml ปริมาณเชื้อบาซิลลัสในแต่ละชนิดเจริญบนอาหาร NA มีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในช่วง $1.30 \times 10^7 \pm 1.47 \times 10^3$ - $2.01 \times 10^7 \pm 1.06 \times 10^3$ CFU/ml เมื่อนำเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดมาเลี้ยงร่วมกันกับเชื้อ Vp_{AHPND} ในหลอดทดลอง ผลการเจริญของจุลินทรีย์บาซิลลัสบนอาหาร NA ในระยะเวลาเริ่มต้น 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง ผลการศึกษาดังนี้

ระยะเวลาที่ 12 ชั่วโมง ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์บาซิลลัสทั้ง 6 ชนิด ที่เจริญเติบโตบนอาหาร NA พบว่า จุลินทรีย์ *B. megaterium* (CH1) มีปริมาณจุลินทรีย์มากที่สุด $7.50 \times 10^7 \pm 7.07 \times 10^2$ CFU/ml รองลงมาได้แก่ จุลินทรีย์ *B. paralicheniformis* (CH3), *B. velezensis* (CH6), *B. siamensis* (CH5), *B. amyloliquefaciens* (CH4) และ *B. subtilis* (CH2) โดยมีปริมาณจุลินทรีย์ในหลอดทดลอง $5.80 \times 10^7 \pm 2.50 \times 10^3$, $4.9 \times 10^7 \pm 2.18 \times 10^3$, $3.00 \times 10^7 \pm 1.55 \times 10^3$, $1.90 \times 10^7 \pm 2.12 \times 10^4$ และ $1.30 \times 10^7 \pm 3.90 \times 10^3$ CFU/ml ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลทางสถิติ การเจริญของจุลินทรีย์บาซิลลัสทั้ง 6 ชนิดที่เจริญบนอาหาร NA ในระยะเวลา 12 ชั่วโมง ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

ระยะเวลาที่ 24 ชั่วโมง พบปริมาณจุลินทรีย์ที่เจริญเติบโตบนอาหาร NA เพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะ จุลินทรีย์ *B. megaterium* (CH1), *B. subtilis* (CH2) และ *B. siamensis* (CH5) มีปริมาณจุลินทรีย์มากที่สุด $4.40 \times 10^9 \pm 1.54 \times 10^2$, $3.60 \times 10^9 \pm 9.89 \times 10^5$ และ $1.20 \times 10^9 \pm 8.62 \times 10^5$ CFU/ml ตามลำดับ รองลงมาได้แก่ จุลินทรีย์ *B. paralicheniformis* (CH3), *B. amyloliquefaciens* (CH4) และ *B. velezensis* (CH6) มีปริมาณจุลินทรีย์เจริญบนอาหาร NA $8.50 \times 10^8 \pm 1.64 \times 10^5$, $7.80 \times 10^8 \pm 6.50 \times 10^4$ และ $4.90 \times 10^8 \pm 1.75 \times 10^3$ CFU/ml ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลทางสถิติ พบว่าการเจริญของจุลินทรีย์บาซิลลัสทั้ง 6 ชนิดที่เจริญบนอาหาร NA ในระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีปริมาณเพิ่มมากขึ้นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับเชื้อ *Vp_{AHPND}* (ควบคุม) ที่มีปริมาณจุลินทรีย์เจริญบนอาหาร NA $3.70 \times 10^7 \pm 1.06 \times 10^4$ CFU/ml

ระยะเวลาที่ 36 ชั่วโมง พบปริมาณจุลินทรีย์ที่เจริญเติบโตบนอาหาร NA เพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะ จุลินทรีย์ *B. megaterium* (CH1), *B. subtilis* (CH2) และ *B. velezensis* (CH6) มีปริมาณจุลินทรีย์มากที่สุด $9.71 \times 10^9 \pm 1.76 \times 10^1$, $7.80 \times 10^9 \pm 6.38 \times 10^3$ และ $1.20 \times 10^9 \pm 6.58 \times 10^3$ CFU/ml ตามลำดับ รองลงมาได้แก่ จุลินทรีย์ *B. paralicheniformis* (CH3), *B. amyloliquefaciens* (CH4) และ *B. siamensis* (CH5) มีปริมาณจุลินทรีย์เจริญบนอาหาร NA ที่ระดับ $8.90 \times 10^8 \pm 3.35 \times 10^4$, $6.50 \times 10^8 \pm 2.33 \times 10^3$ และ $1.79 \times 10^8 \pm 2.24 \times 10^3$ CFU/ml ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลทางสถิติ พบว่าการเจริญของจุลินทรีย์บาซิลลัสทั้ง 6 ชนิด ที่เจริญบนอาหาร NA ในระยะเวลา 36 ชั่วโมง มีปริมาณเพิ่มมากขึ้นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับเชื้อ *Vp_{AHPND}* (ควบคุม) ที่มีปริมาณจุลินทรีย์เจริญบนอาหาร NA $1.87 \times 10^7 \pm 4.70 \times 10^3$ CFU/ml

ระยะเวลาที่ 48 ชั่วโมง พบปริมาณจุลินทรีย์ที่เจริญเติบโตบนอาหาร NA เพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะ จุลินทรีย์ *B. megaterium* (CH1), *B. subtilis* (CH2), *B. paralicheniformis* (CH3) และ *B. velezensis* (CH6) มีปริมาณจุลินทรีย์มากที่สุดที่ $7.65 \times 10^9 \pm 1.58 \times 10^2$, $7.45 \times 10^9 \pm 6.33 \times 10^3$, $7.37 \times 10^9 \pm 2.72 \times 10^4$ และ $3.75 \times 10^9 \pm 2.56 \times 10^3$ CFU/ml ตามลำดับ รองลงมาได้แก่ จุลินทรีย์ *B. amyloliquefaciens* (CH4) และ *B. siamensis* (CH5) มีปริมาณจุลินทรีย์เจริญบนอาหาร NA $9.25 \times 10^8 \pm 2.82 \times 10^5$ และ $8.23 \times 10^8 \pm 7.15 \times 10^4$ CFU/ml ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลทางสถิติ พบว่าการเจริญของจุลินทรีย์บาซิลลัสทั้ง 6 ชนิดที่เจริญบนอาหาร NA ในระยะเวลา 48 ชั่วโมง มีปริมาณเพิ่มมากขึ้นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับเชื้อ *Vp_{AHPND}* (ควบคุม) ที่มีปริมาณจุลินทรีย์เจริญบนอาหาร NA $1.20 \times 10^8 \pm 2.41 \times 10^4$ CFU/ml (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 7 ประสิทธิภาพในการครอบครองเชื้อ Vp_{AHPND} ของจุลินทรีย์บาซิลลัส 6 สายพันธุ์

เชื้อทดสอบ	ปริมาณเชื้อ Vp_{AHPND} (CFU/ml) ในอาหาร TCBS				
	0 ชม.	12 ชม.	24 ชม.	36 ชม.	48 ชม.
Vp_{AHPND} (ควบคุม)	$1.20 \times 10^7 \pm 4.94 \times 10^3$ dD	$3.20 \times 10^7 \pm 9.89 \times 10^3$ dD	$2.78 \times 10^7 \pm 5.65 \times 10^3$ dD	$5.25 \times 10^7 \pm 6.36 \times 10^3$ dD	$6.23 \times 10^8 \pm 7.77 \times 10^4$ eG
<i>B. megaterium</i> (CH1)	$2.35 \times 10^7 \pm 7.70 \times 10^2$ dD	$3.40 \times 10^4 \pm 1.20 \times 10^2$ cC	$9.00 \times 10^2 \pm 1.40 \times 10^{1aA}$	$7.50 \times 10^2 \pm 7.70 \times 10^1$ aA	$6.70 \times 10^3 \pm 5.66 \times 10^2$ bB
<i>B. subtilis</i> (CH2)	$1.87 \times 10^7 \pm 9.10 \times 10^2$ dD	$2.00 \times 10^4 \pm 7.78 \times 10^3$ cC	$3.10 \times 10^2 \pm 2.80 \times 10^1$ aA	$4.32 \times 10^2 \pm 3.50 \times 10^1$ aA	$7.05 \times 10^4 \pm 9.19 \times 10^3$ cC
<i>B. paralicheniformis</i> (CH3)	$1.95 \times 10^7 \pm 6.36 \times 10^3$ dD	$1.10 \times 10^6 \pm 5.65 \times 10^3$ cC	$7.90 \times 10^2 \pm 2.10 \times 10^1$ aA	$5.40 \times 10^2 \pm 2.80 \times 10^1$ aA	$6.78 \times 10^3 \pm 6.36 \times 10^2$ bB
<i>B. amyloliquefaciens</i> (CH4)	$2.03 \times 10^7 \pm 1.06 \times 10^3$ dD	$3.00 \times 10^6 \pm 1.06 \times 10^3$ cC	$1.74 \times 10^4 \pm 5.66 \times 10^2$ cC	$2.50 \times 10^2 \pm 4.20 \times 10^1$ aA	$1.78 \times 10^3 \pm 4.24 \times 10^2$ bB
<i>B. siamensis</i> (CH5)	$1.95 \times 10^7 \pm 8.48 \times 10^3$ dD	$3.00 \times 10^6 \pm 7.10 \times 10^2$ cD	$2.98 \times 10^6 \pm 8.48 \times 10^3$ dD	$2.74 \times 10^4 \pm 9.10 \times 10^2$ cC	$1.65 \times 10^5 \pm 4.95 \times 10^3$ cE
<i>B. velezensis</i> (CH6)	$1.30 \times 10^7 \pm 1.37 \times 10^3$ dD	$1.20 \times 10^6 \pm 2.57 \times 10^3$ cD	$4.00 \times 10^2 \pm 1.53 \times 10^3$ aA	$4.00 \times 10^2 \pm 1.38 \times 10^2$ aA	$3.95 \times 10^3 \pm 7.54 \times 10^3$ bB

หมายเหตุ: อักษรที่กำกับด้วยภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กในแนวตั้ง และอักษรที่กำกับด้วยภาษาอังกฤษตัวพิมพ์ใหญ่ในแนวนอน ที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางที่ 8 การเจริญของจุลินทรีย์ในหลอดทดลองที่เลี้ยงแบบ Co-culture บนอาหาร NA

เชื้อทดสอบ	ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ (CFU/ml) บนอาหาร NA				
	0 ชม.	12 ชม.	24 ชม.	36 ชม.	48 ชม.
<i>Vp_{AHPND}</i> (ควบคุม)	$1.65 \times 10^7 \pm 2.82 \times 10^4$ cC	$4.20 \times 10^7 \pm 1.87 \times 10^4$ cC	$3.70 \times 10^7 \pm 1.06 \times 10^4$ cC	$1.87 \times 10^7 \pm 4.70 \times 10^3$ cC	$1.20 \times 10^8 \pm 2.41 \times 10^4$ bB
<i>B. megaterium</i> (CH1)	$1.35 \times 10^7 \pm 7.70 \times 10^2$ cC	$7.50 \times 10^7 \pm 7.07 \times 10^2$ cC	$4.40 \times 10^9 \pm 1.54 \times 10^2$ aA	$9.71 \times 10^9 \pm 1.76 \times 10^1$ aA	$7.65 \times 10^9 \pm 1.58 \times 10^2$ aA
<i>B. subtilis</i> (CH2)	$1.93 \times 10^7 \pm 9.10 \times 10^2$ cC	$1.30 \times 10^7 \pm 3.90 \times 10^3$ cC	$3.60 \times 10^9 \pm 9.89 \times 10^5$ aA	$7.80 \times 10^9 \pm 6.38 \times 10^3$ aA	$7.45 \times 10^9 \pm 6.33 \times 10^3$ aA
<i>B. paralicheniformis</i> (CH3)	$1.98 \times 10^7 \pm 6.36 \times 10^3$ cC	$5.80 \times 10^7 \pm 2.50 \times 10^3$ cC	$8.50 \times 10^8 \pm 1.64 \times 10^5$ bB	$8.90 \times 10^8 \pm 3.35 \times 10^4$ bB	$7.37 \times 10^9 \pm 2.72 \times 10^4$ aA
<i>B. amyloliquefaciens</i> (CH4)	$2.01 \times 10^7 \pm 1.06 \times 10^3$ cC	$1.90 \times 10^7 \pm 2.12 \times 10^4$ cC	$7.80 \times 10^8 \pm 6.50 \times 10^4$ bB	$6.50 \times 10^8 \pm 2.33 \times 10^3$ bB	$9.25 \times 10^8 \pm 2.82 \times 10^5$ bB
<i>B. siamensis</i> (CH5)	$1.65 \times 10^7 \pm 8.48 \times 10^3$ cC	$3.00 \times 10^7 \pm 1.55 \times 10^3$ cC	$1.20 \times 10^9 \pm 8.62 \times 10^5$ aA	$1.79 \times 10^8 \pm 2.24 \times 10^3$ bB	$8.23 \times 10^8 \pm 7.15 \times 10^4$ bB
<i>B. velezensis</i> (CH6)	$1.30 \times 10^7 \pm 1.47 \times 10^3$ cC	$4.9 \times 10^7 \pm 2.18 \times 10^3$ cC	$4.90 \times 10^8 \pm 1.75 \times 10^3$ bB	$1.20 \times 10^9 \pm 6.58 \times 10^3$ aA	$3.75 \times 10^9 \pm 2.56 \times 10^3$ aA

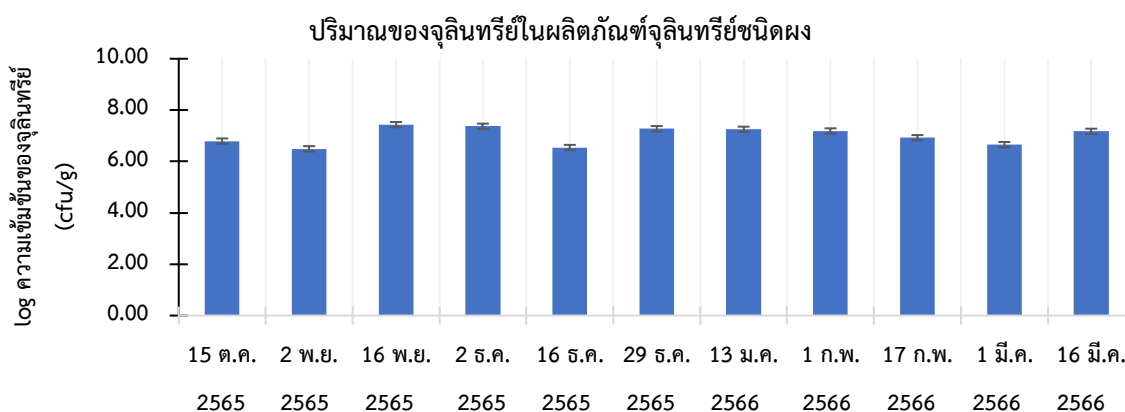
หมายเหตุ อักษรที่กำกับด้วยภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กในแนวตั้ง และอักษรที่กำกับด้วยภาษาอังกฤษตัวพิมพ์ใหญ่ในแนวนอน ที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ส่วนที่ 2 ผลของการคัดเลือกชนิดของจุลินทรีย์บาซิลลัส เพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ และการตรวจวิเคราะห์ และทดสอบสารสำคัญในผลิตภัณฑ์

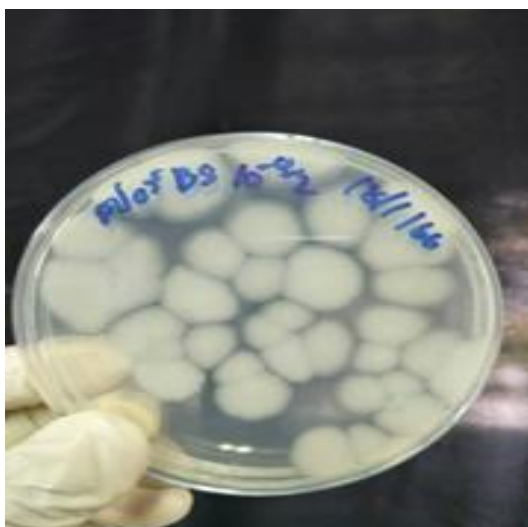
จากผลการศึกษาในส่วนที่ 1 พบว่า *B. subtilis* (CH2) เป็นจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการครอบครองเชื้อ *Vp_{AHPND}* ได้มากที่สุด ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 และ ชั่วโมงที่ 24. และ มีการเจริญเติบโตที่ระดับอุณหภูมิ 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส จึงคัดเลือก *B. subtilis* (CH2) มาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ผง ซึ่งมีผลการวิเคราะห์ และการทดสอบสารสำคัญของผลิตภัณฑ์ ดังนี้

2.1 การทดสอบระยะเวลาคงตัวของจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ (CH2)

ผลการทดสอบระยะเวลาคงตัวของจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ (CH2) ที่เก็บรักษาในอุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 6 เดือน (ตุลาคม 2565 - มีนาคม 2566) พบว่าการตรวจหาปริมาณจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ ทั้งหมด 11 ครั้ง มีปริมาณโคโลนีของจุลินทรีย์ *B. subtilis* (CH2) อยู่ในช่วง 3.12×10^6 - 4.90×10^7 CFU/g (ภาพที่ 7 และ ภาพที่ 8)



ภาพที่ 7 ปริมาณความคงตัวของจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์



ภาพที่ 8 ลักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์ *B. subtilis* (CH2) ในผลิตภัณฑ์

2.2 ผลการวิเคราะห์และทดสอบสารสำคัญในผลิตภัณฑ์หัวเชื้อจุลินทรีย์ชนิดผง

2.2.1 ปริมาณแบคทีเรีย (Aerobic Plate Count)

จากการวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ (ตารางที่ 9) พบว่า มีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดเท่ากับ $1.05 \times 10^8 \pm 5.00 \times 10^6$ CFU/g โดยมีลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่พบ ดังภาพที่ 9

ตารางที่ 9 ปริมาณแบคทีเรียจากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์

รายการทดสอบ	การเจือจาง	ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ (CFU/g)				ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD (CFU/g)
		ซ้ำที่	ซ้ำที่	ซ้ำที่	ค่าเฉลี่ย	
		1	2	3		
ปริมาณแบคทีเรีย	10^{-5}	100	110	105	105.00	$1.05 \times 10^8 \pm 5.00 \times 10^6$



ภาพที่ 9 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่พบในผลิตภัณฑ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.2.2 ปริมาณเชื้อ *Bacillus* spp.

จากการตรวจวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ *Bacillus* spp. ในผลิตภัณฑ์ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า มีกลุ่มเชื้อ *Bacillus* spp. ที่มีลักษณะโคโลนีคล้ายคลึงกันจำนวน 1 กลุ่ม โดยมีลักษณะโคโลนีสีครีม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 6-7 มิลลิเมตร มีลักษณะ แผ่กว้าง ขอบหยัก และมีผิวโคโลนีด้าน โดยมีปริมาณเชื้อ รวมเท่ากับ $1.11 \times 10^8 \pm 3.78 \times 10^6$ CFU/g ของผลิตภัณฑ์โดยมีปริมาณเชื้อ *Bacillus* spp. ดังแสดงใน ตารางที่ 10 และมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกลุ่มเชื้อที่พบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังภาพที่ 10

ตารางที่ 10 ปริมาณเชื้อ *Bacillus* spp. ที่ได้จากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ CH2

รายการทดสอบ	การเจือจาง	ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ (CFU/g)				ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD (CFU/g)
		ซ้ำที่	ซ้ำที่	ซ้ำที่	ค่าเฉลี่ย	
		1	2	3		
ปริมาณเชื้อ <i>Bacillus</i> spp.	10^{-5}	107	114	113	111.33	$1.11 \times 10^8 \pm 3.78 \times 10^6$



ภาพที่ 10 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Bacillus* spp. ที่พบในผลิตภัณฑ์ CH2 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.2.3 การปนเปื้อนของยีสต์และรา

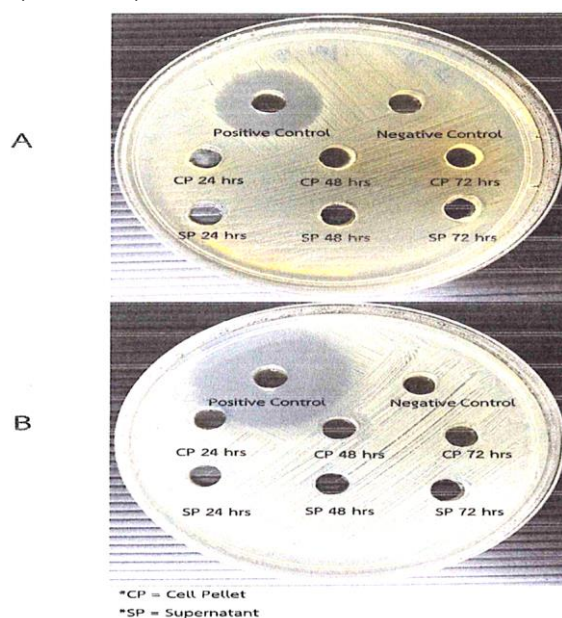
ไม่พบการปนเปื้อนของยีสต์และราในผลิตภัณฑ์

2.2.4 การจำแนกชนิดของจุลินทรีย์บาซิลลัส ด้วยวิธี 16S rRNA gene

ชนิดของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์ มีผล DNA sequence คล้ายกับเชื้อ *B. subtilis* ; *B. subtilis* subsp. *Inaquosorum*/ *B. amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* muj 100 เปอร์เซ็นต์ โดยมี ความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ประมาณ 1500 เบส

2.2.5 การทดสอบการไม่สร้างยาปฏิชีวนะของเชื้อ *B. subtilis* ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์ด้วยวิธี Agar Well Diffusion Assay

จากการทดสอบตัวอย่างเชื้อ ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์ ไม่พบการยับยั้งเชื้อแกรมบวกและแกรมลบ ในตัวอย่างชุด CP และ SP (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 11 แสดงการทดสอบการไม่สร้างยาปฏิชีวนะของจุลินทรีย์บาซิลลัส จากตัวอย่างผลิตภัณฑ์ ด้วยวิธี Agar Well Diffusion Assay โดย A คือการทดสอบกับ *E. coli* ATCC 25922 (แบคทีเรียแกรมลบ) และ B คือ การทดสอบกับ *S. aureus* ATCC 25923 (แบคทีเรียแกรมบวก)

2.2.6 สรุปผลการวิเคราะห์และทดสอบผลิตภัณฑ์

ผลการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ อ้างอิงตามเกณฑ์มาตรฐาน กลุ่มควบคุมวัตถุดิบอันตราย และการค้าปัจจัยการผลิต กองตรวจสอบเรือประมง สิ้นค้าสัตว์น้ำ และปัจจัยการผลิต กรมประมง พบว่าผลการวิเคราะห์ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ จุลินทรีย์ที่เป็นสารสำคัญในผลิตภัณฑ์ โดยชนิดของจุลินทรีย์ตรงตามที่ระบุในผลิตภัณฑ์ที่ศึกษา และปริมาณจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ทั้งหมดไม่น้อยกว่า 10^6 (CFU/g ของผลิตภัณฑ์) การปนเปื้อนของยีสต์และราในผลิตภัณฑ์ โดยผลิตภัณฑ์มียีสต์ปนเปื้อนไม่เกิน 10 cfu/g และราปนเปื้อนไม่เกิน 10 cfu/g (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 สรุปผลการวิเคราะห์และทดสอบผลิตภัณฑ์

รายการตรวจวิเคราะห์	ผลการวิเคราะห์ (CFU/g ของผลิตภัณฑ์)	เกณฑ์มาตรฐานของ กรมประมง	ผลการประเมิน (ผ่าน/ไม่ผ่าน)
ปริมาณแบคทีเรีย	$1.05 \times 10^8 \pm 5.00 \times 10^6$	ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ต้องได้ไม่น้อยกว่าที่ขอ ขึ้นทะเบียนผลิตภัณฑ์	ผ่าน
ปริมาณเชื้อ <i>Bacillus</i> spp.	$1.11 \times 10^8 \pm 3.78 \times 10^6$	ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ต้องได้ไม่น้อยกว่าที่ขอ ขึ้นทะเบียนผลิตภัณฑ์	ผ่าน
การปนเปื้อนของเชื้อ Yeast และ Mold	ไม่พบ	ยีสต์ และราปนเปื้อน ไม่เกิน 10 cfu/g	ผ่าน
การบ่งชี้ชนิดเชื้อในตัวอย่าง ผลิตภัณฑ์	<i>B. subtilis</i> / <i>B. subtilis</i> subsp. <i>Inaquosorum</i> / <i>B. amyloliquefaciens</i> subsp. <i>amyloliquefaciens</i>	จุลินทรีย์ที่เป็นสาร สำคัญในผลิตภัณฑ์ โดยชนิดของจุลินทรีย์ ต้องตรงตามที่ระบุใน ผลิตภัณฑ์	ผ่าน
การทดสอบการไม่สร้างยา ปฏิชีวนะของเชื้อ <i>B. subtilis</i> ในผลิตภัณฑ์	ไม่พบการสร้างยาปฏิชีวนะ	ผลิตภัณฑ์ต้องไม่พบ การสร้างยาปฏิชีวนะ	ผ่าน

ที่มา : เกณฑ์มาตรฐานในคู่มือประชาชนเรื่องการขึ้นทะเบียนวัตถุดิบอันตรายทางการประมง

<https://www.opsmoac.go.th/news-files-441891791957>

ส่วนที่ 3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการลดปริมาณสารอินทรีย์ในของเสียสิ่งขับถ่ายจากการเลี้ยงกุ้งใน ห้องปฏิบัติการ

จากการทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ในการลดปริมาณสารอินทรีย์ในของเสียสิ่งขับถ่ายจากการเลี้ยงกุ้งในห้องปฏิบัติการ พบว่าปริมาณสารอินทรีย์เริ่มต้นของกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่เติมผลิตภัณฑ์ CH₂ ในอัตราส่วน 300, 500 และ 700 ลิตร/ไร่ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่พบว่าปริมาณสารอินทรีย์จะมีค่าลดลงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ตั้งแต่วันที่ 7 ของการทดลองเป็นต้นไป และเมื่อทำการทดลองครบ 21 วัน ชุดการทดลองที่ 3 (500 ลิตร/ไร่) และ ชุดการทดลองที่ 4 (700 ลิตร/ไร่) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยมีค่าเฉลี่ยของปริมาณสารอินทรีย์ 62.34 ± 0.49 , และ 62.19 ± 0.74 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ มีปริมาณสารอินทรีย์ในของเสียจากสิ่งขับถ่ายในการเลี้ยงกุ้งในห้องปฏิบัติการลดลงมากถึง 22.11 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 12 และ ตารางที่ 13 จากผลการทดลองนี้ สรุปได้ว่า ชุดการทดลองที่ 3 (500 ลิตร/ไร่) เป็นปริมาณที่เหมาะสมในการลดปริมาณของสารอินทรีย์ในระยะเวลา 21 วัน

ตารางที่ 12 ปริมาณสารอินทรีย์ (เปอร์เซ็นต์) ในของเสียจากสิ่งขับถ่ายในการเลี้ยงกุ้งในห้องปฏิบัติการ

ระยะเวลา	ชุดการทดลอง (หน่วย : เปอร์เซ็นต์)			
	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2	ชุดที่ 3	ชุดที่ 4
	กลุ่มควบคุม	(300 ลิตร/ไร่)	(500 ลิตร/ไร่)	(700 ลิตร/ไร่)
เริ่มต้น	80.30 ± 0.21^{aA}	80.60 ± 1.16^{aA}	80.29 ± 0.65^{aA}	80.70 ± 0.68^{aA}
7 วัน	80.30 ± 0.01^{aA}	76.63 ± 0.66^{bB}	73.94 ± 0.34^{cB}	73.90 ± 0.40^{cB}
14 วัน	80.18 ± 0.06^{aA}	74.50 ± 0.51^{bC}	65.43 ± 0.63^{cC}	65.30 ± 2.11^{cC}
21 วัน	80.11 ± 0.31^{aA}	74.30 ± 0.75^{bC}	62.34 ± 0.49^{cD}	62.19 ± 0.74^{cD}

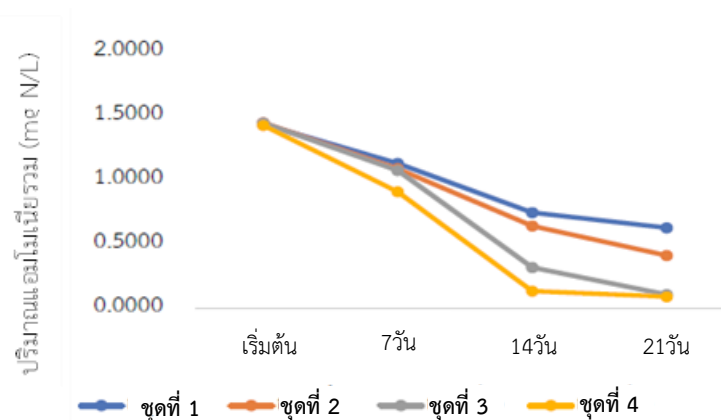
หมายเหตุ ตัวอักษรที่กำกับด้วยภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กในแนวนอนและตัวอักษรภาษาอังกฤษในแนวตั้งที่กำกับด้วยตัวพิมพ์ใหญ่ที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางที่ 13 ปริมาณสารอินทรีย์คงเหลือ เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณสารอินทรีย์เริ่มต้นของกลุ่มควบคุม

ระยะเวลา	ชุดทดลอง (หน่วย : เปอร์เซ็นต์)			
	ชุดที่1	ชุดที่2	ชุดที่3	ชุดที่4
	กลุ่มควบคุม	(300 ลิตร/ไร่)	(500 ลิตร/ไร่)	(700 ลิตร/ไร่)
ปริมาณสารอินทรีย์เริ่มต้น	100	100	100	100
ปริมาณสารอินทรีย์ ครั้งที่1 (7 วัน)	100.00 ± 0.24^a	95.08 ± 1.86^b	92.09 ± 1.01^c	91.58 ± 1.05^c
ปริมาณสารอินทรีย์ ครั้งที่2 (14 วัน)	99.85 ± 0.33^a	92.43 ± 1.93^b	81.49 ± 1.08^b	80.92 ± 2.81^c
ปริมาณสารอินทรีย์ ครั้งที่3 (21 วัน)	99.76 ± 0.44^a	92.19 ± 1.91^b	77.65 ± 0.97^b	77.07 ± 0.00^c
ปริมาณสารอินทรีย์ ที่ลดลงเทียบกับ กลุ่มควบคุม		7.58	22.11	22.69

หมายเหตุ ตัวอักษรที่กำกับด้วยภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่ต่างกันแนวนอนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ผลของคุณภาพน้ำพบว่าปริมาณแอมโมเนียรวม (Total ammonia-nitrogen) (ภาพที่ 12) เริ่มต้นของทุกกลุ่มอยู่ในช่วง 1.42-1.44 มิลลิกรัม/ลิตร ตลอดระยะเวลาการทดลอง พบว่าทุกกลุ่มมีปริมาณแอมโมเนียรวมลดลง และในวันที่ 21 กลุ่มที่เติมจุลินทรีย์มีปริมาณแอมโมเนียรวมช่วง 0.09-0.41 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งต่ำกว่าค่าแอมโมเนียรวมในกลุ่มควบคุม คือ 0.62 มิลลิกรัม/ลิตร (ภาพที่ 13) ในระยะเริ่มต้นการทดลองพบว่าปริมาณไนโตรเจนในทุกล้อมมีปริมาณไม่แตกต่างกัน ซึ่งอยู่ช่วง 0.0758-0.0802 มิลลิกรัม/ลิตร หลังจากเติมจุลินทรีย์ทุกวัน และตรวจคุณภาพน้ำทุกวันที่ 7, 14 และ 21 วัน พบว่าปริมาณไนโตรเจนเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ในทุกกลุ่ม ซึ่งเพิ่มขึ้นมาอยู่ในช่วง 0.15-0.30 มิลลิกรัม/ลิตร



ภาพที่ 12 ปริมาณแอมโมเนียรวมของน้ำระหว่างการทดลองหลังจากใส่ผลิตภัณฑ์ในแต่ละครั้งของแต่ละกลุ่มทดลอง



ภาพที่ 13 ปริมาณไนไตรท์ของน้ำระหว่างการทดลองหลังจากใส่ผลิตภัณฑ์ในแต่ละครั้งของแต่ละกลุ่มทดลอง

การนำไปใช้ประโยชน์ของหัวเชื้อจุลินทรีย์ *B. subtilis* (CH2) ที่แยกได้จากฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมพื้นที่ความเค็มต่ำจังหวัดฉะเชิงเทรา สูตรขยายหัวเชื้อจุลินทรีย์ *B. subtilis* (CH2) ชนิดน้ำ ขนาด 300 มิลลิลิตร หรือ หัวเชื้อจุลินทรีย์ *B. subtilis* (CH2) ชนิดผง ขนาด 200 กรัม ขยายโดยการนำจุลินทรีย์ชนิดน้ำหรือชนิดผงขยายในน้ำสะอาด หรือน้ำประปาที่เป่าคลอรีนประมาณ 6 ชั่วโมง ปรับความเค็มน้ำในถังขยายให้ใกล้เคียงกับความเค็มของน้ำในบ่อ จำนวน 200 ลิตร ใช้น้ำตาลโมโนเด็คโตส 0.5 กิโลกรัม อาหารกุ้งเบอร์เล็ก 200 กรัม เป่าอากาศตลอดเวลา ขยายเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง หรือจนกว่าน้ำขยายในถังได้ pH 4.5-5 ก็สามารถเติมบ่อได้ ในช่วงเวลา 9.00-11.00 น. ในกรณีที่ต้องการใช้เพื่อลดความเค็มของน้ำให้ใส่น้ำขยายจุลินทรีย์ลงในช่วงเวลา 13.00 น. (ภาพที่ 14)



ภาพที่ 14 การขยายและการใช้ประโยชน์จากหัวเชื้อจุลินทรีย์ *B. subtilis* (CH2) และผลผลิตกุ้งขาวแวนนาไมจากบ่อที่มีการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ตลอดระยะเวลาการเลี้ยง

ส่วนที่ 4 ผลการสำรวจความพึงพอใจของเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในการใช้จุลินทรีย์ชนิดที่คัดแยกได้จากพื้นที่ความเค็มต่ำจังหวัดฉะเชิงเทรา

ข้อมูลที่ได้จากการสอบถามตามแบบสำรวจความพึงพอใจของเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมที่มีการใช้จุลินทรีย์ และผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์ที่คัดแยกจากพื้นที่จังหวัดฉะเชิงเทรา จำนวน 51 ราย ดังนี้

4.1 ข้อมูลทั่วไปของเกษตรกร

เกษตรกรที่ตอบแบบสำรวจความพึงพอใจทั้งหมดจำนวน 51 ราย ส่วนใหญ่เกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงกุ้งทะเลของจังหวัดฉะเชิงเทรา สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี ถึง 47 เปอร์เซ็นต์ และเลือกทำอาชีพหลักคือการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ถึง 82 เปอร์เซ็นต์ ส่วนใหญ่สมาชิกที่ประกอบอาชีพหลักคือการเลี้ยงกุ้ง 69 เปอร์เซ็นต์ มาจากครอบครัวขนาดกลางที่มีสมาชิกในครัวเรือนจำนวน 4-6 คน แต่สมาชิกที่ทำอาชีพเลี้ยงกุ้งเพียงอย่างเดียว สูงถึง 92 เปอร์เซ็นต์ มาจากครอบครัวขนาดเล็กที่มีสมาชิกในครัวเรือน 1-3 คน (ตารางที่ 14)

4.2 ข้อมูลฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม

โครงสร้างบ่อเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในพื้นที่จังหวัดฉะเชิงเทรา มีรูปแบบโครงสร้างบ่อเลี้ยงในแต่ละฟาร์ม 9 รูปแบบ ส่วนใหญ่ 45 เปอร์เซ็นต์จะมีโครงสร้างบ่อเป็นบ่อดินปูทับด้วยแผ่น PE ทั้งบ่อ รองลงมา 17 เปอร์เซ็นต์เป็นบ่อดินเพียงอย่างเดียว และ 16 เปอร์เซ็นต์ เป็นบ่อดินที่ปูทับด้วยแผ่น PE เฉพาะบริเวณขอบบ่อ (ตารางที่ 15)

4.3 รูปแบบการเลี้ยง

เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งส่วนใหญ่ 96 เปอร์เซ็นต์ มีการเลี้ยงแบบเดี่ยว เลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในบ่อเพียงชนิดเดียว และมีเพียง 4 เปอร์เซ็นต์ที่มีการเลี้ยงแบบผสมผสานในบ่อเลี้ยง เช่น เลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมร่วมกับกุ้งก้ามกราม หรือ เลี้ยงร่วมกับปลา ระบบการเลี้ยงของเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งส่วนใหญ่ 98 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงกุ้งระบบปิด และ มีการเลี้ยงในระบบน้ำหมุนเวียนเพียง 2 เปอร์เซ็นต์ แหล่งน้ำที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล ใช้น้ำจากคลองชลประทาน เขื่อน อ่างเก็บน้ำ และคลองซอย 49 เปอร์เซ็นต์ ใช้น้ำจากแม่น้ำลำคลอง 49 เปอร์เซ็นต์ และมีเพียง 2 เปอร์เซ็นต์ ที่ใช้น้ำแหล่งน้ำอื่น ๆ เกษตรกรมีรูปแบบการใช้เทคโนโลยีและนวัตกรรมในการเลี้ยงกุ้งทะเล หลายรูปแบบ และที่นิยมใช้มากถึง 82 เปอร์เซ็นต์ จะใช้มอเตอร์ไฟฟ้ากระแสน้ำกับเครื่องตีน้ำ และใช้มอเตอร์ไฟฟ้ากระแสน้ำกับเครื่องตีน้ำและมีการใช้ Solar cell ในฟาร์มเลี้ยงกุ้งเพียง 10 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 15)

4.4 การจัดการฟาร์มเลี้ยง

เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมที่ใช้จุลินทรีย์สายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากพื้นที่ความเค็มต่ำ จังหวัดฉะเชิงเทรา มีการเตรียมบ่อหลายรูปแบบ ส่วนใหญ่ 82 เปอร์เซ็นต์ มีการเตรียมบ่อโดยวิธีการ ฉีดเลน และตากบ่อ การเตรียมน้ำในบ่อพักน้ำ โดยการสูบน้ำเข้าบ่อพักและมีการเติมอากาศ 49 เปอร์เซ็นต์ สูบน้ำเข้าบ่อพักและมีการเติมจุลินทรีย์ในบ่อพักน้ำ 31 เปอร์เซ็นต์ การเตรียมน้ำในบ่อเลี้ยง เกษตรกรจะสูบน้ำเข้าบ่อเลี้ยง เติมน้ำในบ่อเลี้ยง และเติมอากาศก่อนลงลูกกุ้ง คิดเป็น 82 เปอร์เซ็นต์ การจัดการอาหารภายในฟาร์ม แต่ละฟาร์มจะใช้วิธีการจัดการอาหารภายในฟาร์มที่แตกต่างกัน เช่น มีทั้งเครื่องผสมอาหาร มีเครื่องให้อาหารอัตโนมัติ มีการใช้แรงงานคนให้อาหาร และใช้จุลินทรีย์ผสมในอาหารถึง 96 เปอร์เซ็นต์ และมีฟาร์มที่มีเครื่องผสมอาหาร มีการใช้แรงงานคนให้อาหาร มีการใช้จุลินทรีย์ผสมในอาหาร 2 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น การให้อาหารในระหว่างการเลี้ยง จะมีการเติมอากาศทั้งกลางวันและกลางคืน 100 เปอร์เซ็นต์

4.5 การจัดการน้ำระหว่างการเลี้ยง

เกษตรกรจะมีการดูดตะกอน และมีการเติมน้ำในระหว่างการเลี้ยง มีการใช้จุลินทรีย์เพื่อปรับปรุงคุณภาพน้ำ 98 เปอร์เซ็นต์ และมีเพียง 2 เปอร์เซ็นต์เท่านั้นที่ดูดตะกอน ถ่ายน้ำออก และเติมน้ำเข้าในระหว่างการเลี้ยง รวมถึงมีการใช้จุลินทรีย์เพื่อปรับปรุงคุณภาพน้ำ การจับผลผลิต 100 เปอร์เซ็นต์ ใช้วิธีสูบน้ำออก และจับผลผลิต (ตารางที่ 16)

4.6 รูปแบบการใช้จุลินทรีย์สายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากพื้นที่ความเค็มต่ำจังหวัดฉะเชิงเทรา

เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งทั้ง 51 ราย มีการใช้ผลิตภัณฑ์ทั้งชนิดน้ำ และ ชนิดผง เพื่อการปรับปรุงคุณภาพน้ำระหว่างการเลี้ยง และผสมอาหารให้กุ้งกินตั้งแต่อายุกุ้ง 1 วันจนถึงจับขายเฉลี่ย 100 วัน คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 17)

4.7 การกระจายผลผลิตและการตลาดกุ้งขาวแวนนาไม

ลักษณะการจำหน่าย เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้ง 100 เปอร์เซ็นต์ ขายปากบ่อภายในฟาร์ม โดยมีแพ หรือ ผู้รวบรวม หรือโบรกเกอร์ในพื้นที่เป็นผู้จับทั้งหมด ลักษณะการจับ จับครั้งเดียวหมดบ่อ รูปแบบการจำหน่าย ขายราคาเดียวทุกขนาด ขนาดของกุ้งที่จับจำหน่าย ส่วนใหญ่เกษตรกรผลิตกุ้งขนาด 40-49 ตัว/กิโลกรัม คิดเป็น 33 เปอร์เซ็นต์ ขนาดกุ้ง 50-59 ตัว/กิโลกรัม 25 เปอร์เซ็นต์ สาเหตุของการจับจำหน่าย กุ้งได้ขนาดตามที่ตลาดต้องการ 90 เปอร์เซ็นต์ จับจำหน่ายเนื่องจากสาเหตุของการเกิดโรค 10 เปอร์เซ็นต์ การจำหน่ายผลผลิตกุ้งมีการจำหน่ายโดยไม่มีสัญญาผูกพัน (ตารางที่ 18) ผลผลิตกุ้งขาวแวนนาไมของเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งทั้ง 51 ราย ต่อบ่อการผลิตรวมปริมาณ 288.65 ตัน/รอบการผลิต และใน 1 ปีจะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม 3 รอบการผลิต มีผลผลิตรวมทั้งปีปริมาณ 1,277 ตัน/ปี (ตารางที่ 19)

4.8 ความพึงพอใจของเกษตรกรต่อการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากพื้นที่ความเค็มต่ำจังหวัดฉะเชิงเทรา

เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม 67 เปอร์เซ็นต์มีความพึงพอใจต่อประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในการจัดการคุณภาพน้ำ 61 เปอร์เซ็นต์ มีความพึงพอใจต่อประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในการป้องกันการเกิดโรค 41 เปอร์เซ็นต์ มีความพึงพอใจต่อการเสริมสร้างความแข็งแรงให้กุ้งขาวแวนนาไม 59 เปอร์เซ็นต์ มีความพึงพอใจต่อการใช้จุลินทรีย์แล้วช่วยลดต้นทุนการผลิต และเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้ง 47 เปอร์เซ็นต์ มีความพึงพอใจต่อการใช้จุลินทรีย์แล้วช่วยให้ได้ผลผลิตเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 20)

ตารางที่ 14 ข้อมูลทั่วไปของเกษตรกรผู้ใช้จุลินทรีย์สายพันธุ์ชนิดที่แยกได้จากพื้นที่ความเค็มต่ำจังหวัดฉะเชิงเทรา

ข้อมูลทั่วไป		ราย	เปอร์เซ็นต์
เพศ	ชาย	42	82
	หญิง	9	18
การศึกษา	ประถมศึกษา	6	12
	มัธยมศึกษาตอนต้น	4	8
	มัธยมศึกษาตอนปลาย	8	16
	อาชีวศึกษา/ปวช.	4	8
	อนุปริญญา/ปวส.	4	8
	ปริญญาตรี	24	47
	สูงกว่าปริญญาตรี	1	2
อาชีพหลัก	การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	42	82
	การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและการเกษตรอื่นๆ (ทำสวน/ปศุสัตว์)	7	14
	การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและธุรกิจส่วนตัว/ค้าขาย	2	4
อาชีพรอง	การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	39	76
	การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและการเกษตรอื่นๆ (ทำสวน/ปศุสัตว์)	7	14
	การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและธุรกิจส่วนตัว/ค้าขาย	3	6
	การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและข้าราชการ/พนักงานรัฐวิสาหกิจ/ลูกจ้างรัฐ	2	4
สมาชิกใน	1 - 3	10	20
ครัวเรือน (คน)	4 - 6	35	69
	7 - 9	5	10
	10 ขึ้นไป	1	2
สมาชิกที่	1 - 3	47	92
ช่วยเหลือ (คน)	4 - 6	4	8

ตารางที่ 15 ข้อมูลฟาร์มเลี้ยงของเกษตรกรผู้เลี้ยงสุกรที่คัดเลือกได้จากพื้นที่ความเข้มต่ำจังหวัด
ฉะเชิงเทรา

	ข้อมูลฟาร์มเลี้ยงกึ่งทะเล	ราย	เปอร์เซ็นต์
โครงสร้างบ่อเลี้ยง	บ่อดิน	9	17
	บ่อดินปูทับด้วยแผ่น PE เฉพาะบริเวณขอบบ่อ	8	16
	บ่อดินปูทับด้วยแผ่น PE ทั้งบ่อ	23	45
	บ่อดินปูทับด้วยแผ่น PE ทั้งบ่อเว้นเฉพาะกลางบ่อ	3	6
	บ่อดิน, บ่อดินปูทับด้วยแผ่น PE เฉพาะบริเวณขอบบ่อ	1	2
	บ่อดิน, บ่อดินปูทับด้วยแผ่น PE ทั้งบ่อ	2	4
	บ่อดินปูทับด้วยแผ่น PE เฉพาะบริเวณขอบบ่อ, บ่อดินปูทับด้วยแผ่น PE ทั้งบ่อ	3	6
	บ่อดินปูทับด้วยแผ่น PE เฉพาะบริเวณขอบบ่อ, บ่อดินปูทับด้วยแผ่น PE ทั้งบ่อเว้นเฉพาะกลางบ่อ	1	2
	บ่อดินปูทับด้วยแผ่น PE ทั้งบ่อ, บ่อดินปูทับด้วยแผ่น PE ทั้งบ่อเว้นเฉพาะกลางบ่อ	1	2
รูปแบบการเลี้ยง	แบบเดี่ยว	49	96
	แบบผสมผสาน	2	4
ระบบการเลี้ยง	ระบบเปิด หรือกึ่งปิด	0	0
	ระบบปิด	50	98
	ระบบน้ำหมุนเวียน	1	2
แหล่งน้ำที่ใช้การเลี้ยงกึ่ง	คลองชลประทาน/เขื่อน/อ่างเก็บน้ำ/คลองขอย	25	49
	แม่น้ำ/คลอง	25	49
	แหล่งน้ำอื่น ๆ	1	2
เทคโนโลยี/นวัตกรรม	การใช้มอเตอร์ไฟฟ้ากระแสตรง (DC motor) กับเครื่องตีน้ำ	42	82
	การใช้มอเตอร์ไฟฟ้ากระแสตรง (DC motor) กับเครื่องตีน้ำ, การใช้ Solar cell ในฟาร์มเลี้ยงกึ่ง	5	10
	การใช้มอเตอร์ไฟฟ้ากระแสตรง (DC motor) กับเครื่องตีน้ำ, การใช้ Solar cell ในฟาร์มเลี้ยงกึ่ง, การใช้เครื่องควบคุมระบบเติมอากาศอัจฉริยะในการเลี้ยงกึ่ง, การใช้ Solar cell ร่วมกับการใช้เครื่องควบคุมระบบเติมอากาศอัจฉริยะในการเลี้ยงกึ่ง	3	6
	การใช้มอเตอร์ไฟฟ้ากระแสตรง (DC motor) กับเครื่องตีน้ำ, การใช้ Solar cell ในฟาร์มเลี้ยงกึ่ง, อื่น ๆ	1	2

ตารางที่ 16 การจัดการการเลี้ยงของเกษตรกรผู้ใช้จุลินทรีย์ชนิดที่คัดแยกได้จากพื้นที่ความเค็มต่ำจังหวัด
ฉะเชิงเทรา

การจัดการการเลี้ยง	ขั้นตอน	ราย	เปอร์เซ็นต์
การเตรียมบ่อ	ฉีดเลน	3	6
	ฉีดเลน, ดูดเลน	2	4
	ฉีดเลน, ดูดเลน, ลอกเลน, ตากบ่อ	1	2
	ฉีดเลน, ดูดเลน, ตากบ่อ	1	2
	ฉีดเลน, ตากบ่อ	42	82
	ดูดเลน, ตากบ่อ	1	2
	ลอกเลน, ตากบ่อ	1	2
การเตรียมน้ำในบ่อพัก	สูบน้ำเข้าบ่อพัก	4	8
	สูบน้ำเข้าบ่อพัก, เติมจุลินทรีย์ในบ่อ	16	31
	สูบน้ำเข้าบ่อพัก, เติมจุลินทรีย์ในบ่อ, เติมอากาศ	6	12
	สูบน้ำเข้าบ่อพัก, เติมอากาศ	25	49
การเตรียมน้ำในบ่อเลี้ยง	สูบน้ำเข้าบ่อเลี้ยง, เติมจุลินทรีย์ในบ่อเลี้ยง, เติมอากาศก่อนลงลูกกุ้ง	42	82
	สูบน้ำเข้าบ่อเลี้ยง, เติมอากาศก่อนลงลูกกุ้ง	9	18
การจัดการอาหาร	เครื่องผสมอาหาร, เครื่องให้อาหารอัตโนมัติ, ใช้แรงงานคนให้อาหาร, ใช้จุลินทรีย์ผสมในอาหาร	49	96
	เครื่องผสมอาหาร, ใช้แรงงานคนให้อาหาร, ใช้จุลินทรีย์ผสมในอาหาร	1	2
	ใช้แรงงานคนให้อาหาร, ใช้จุลินทรีย์ผสมในอาหาร	1	2
การเพิ่มอากาศระหว่าง การเลี้ยง	เติมอากาศเวลากลางวัน, เติมอากาศเวลากลางคืน	51	100
การจัดการน้ำระหว่าง การเลี้ยง	ดูดตะกอน, เติมน้ำเข้า, ใช้จุลินทรีย์ปรับสภาพน้ำ	50	98
	ดูดตะกอน, ถ่ายน้ำออก, เติมน้ำเข้า, ใช้จุลินทรีย์ปรับสภาพน้ำ	1	2
การจับผลผลิต	สูบน้ำออก, จับผลผลิต	51	100

ตารางที่ 17 การใช้จุลินทรีย์ในการเลี้ยงกุ้งของเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งที่คัดแยกได้จากพื้นที่
ความเค็มต่ำจังหวัดฉะเชิงเทรา

หัวเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้	การใช้งาน	ราย	เปอร์เซ็นต์
BS, BM, BL (ชนิดน้ำ)	ปรับปรุงคุณภาพน้ำระหว่างเลี้ยง และผสมในอาหาร	36	71
B.amylo (ชนิดน้ำ)	ปรับปรุงคุณภาพน้ำระหว่างเลี้ยง	12	23
BS (ชนิดผง)	ปรับปรุงคุณภาพน้ำระหว่างเลี้ยง	3	6
เตรียมบ่อ	ปูนขาว	8	16
	ปูนร้อน	37	72
	จุลินทรีย์	4	8
	ปูนขาว, ปูนร้อน	2	4
เตรียมน้ำ	ปูนขาว	6	12
	ปูนร้อน	28	55
	จุลินทรีย์	17	33
การใช้จุลินทรีย์ระหว่างเลี้ยง	1-40 วัน	51	100
	40-60 วัน	51	100
	60-100 วัน	51	100
การใช้จุลินทรีย์ผสมในอาหาร	1-40 วัน	51	100
	40-60 วัน	51	100
	60-100 วัน	51	100

ตารางที่ 18 การกระจายผลผลิตและการตลาดกุ้งขาวแวนนาไมของเกษตรกรผู้ใช้จุลินทรีย์ชนิดที่คัดแยกได้จากพื้นที่ความเค็มต่ำจังหวัดฉะเชิงเทรา

การจำหน่าย	รายการ	ราย	เปอร์เซ็นต์
ลักษณะการจำหน่าย	ขายปากบ่อ/ที่ฟาร์ม	51	100
สัดส่วนช่องทางการจำหน่ายผลผลิต	แพ/ผู้รวบรวม/โบรกเกอร์ในพื้นที่	51	100
ลักษณะการจับ	จับครั้งเดียว	51	100
รูปแบบการจำหน่าย	ขายราคาเดียวทุกขนาด (คละขนาด)	51	100
ขนาดของกุ้งที่จำหน่าย	ขนาดกุ้ง 20 - 29 ตัว/กิโลกรัม	1	2
	ขนาดกุ้ง 30 - 39 ตัว/กิโลกรัม	4	8
	ขนาดกุ้ง 40 - 49 ตัว/กิโลกรัม	17	33
	ขนาดกุ้ง 50 - 59 ตัว/กิโลกรัม	13	25
	ขนาดกุ้ง 60 - 69 ตัว/กิโลกรัม	8	16
	ขนาดกุ้ง 70 - 79 ตัว/กิโลกรัม	3	6
	ขนาดกุ้งมากกว่า 80 ตัว/กิโลกรัม	5	10
เหตุที่จับขาย	กุ้งได้ขนาดที่ต้องการ	46	90
	กุ้งเป็นโรค	5	10
ลักษณะการจำหน่ายกุ้ง	จำหน่ายโดยไม่มีสัญญาผูกพัน	51	100

ตารางที่ 19 ผลผลิตกุ้งขาวแวนนาไมของเกษตรกรผู้ใช้จุลินทรีย์ชนิดที่คัดแยกได้จากพื้นที่ความเค็มต่ำจังหวัดฉะเชิงเทรา

ขนาดกุ้ง (ตัว/กิโลกรัม)	ปริมาณการจับเฉลี่ย ต่อครั้ง (กิโลกรัม)	จำนวน (ราย)	เปอร์เซ็นต์	ผลผลิตรวม (3 รอบ/ปี) (กิโลกรัม)
20 - 29	4,000	1	2	16,000
30 - 39	101,100	4	8	404,000
40 - 49	87,770	17	33	351,080
50 - 59	56,780	13	25	239,120
60 - 69	21,900	8	16	87,600
70 - 79	5,700	3	6	22,800
มากกว่า 80 ตัว	11,400	5	10	156,400
รวม	288,650	51	100	1,277,000

ตารางที่ 20 ความพึงพอใจของเกษตรกรต่อการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในบ่อดิน

ประสิทธิภาพการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์	ระดับความพึงพอใจ	ราย	เปอร์เซ็นต์
ประสิทธิภาพในการจัดการคุณภาพน้ำ	มากที่สุด	34	67
	มาก	17	33
	ปานกลาง	0	0
	น้อย	0	0
ประสิทธิภาพในการป้องกันการเกิดโรค	มากที่สุด	31	61
	มาก	20	39
	ปานกลาง	0	0
	น้อย	0	0
ประสิทธิภาพในการรักษาโรค	มากที่สุด	25	49
	มาก	26	51
	ปานกลาง	0	0
	น้อย	0	0
ประสิทธิภาพต่อความแข็งแรงของกุ้ง	มากที่สุด	21	41
	มาก	30	59
	ปานกลาง	0	0
	น้อย	0	0
ช่วยในการลดต้นทุนการผลิต	มากที่สุด	24	47
	มาก	27	53
	ปานกลาง	0	0
	น้อย	0	0
ช่วยให้ได้ผลผลิตเพิ่ม	มากที่สุด	22	43
	มาก	29	57
	ปานกลาง	0	0
	น้อย	0	0

สรุปและวิจารณ์ผล

การศึกษาชนิดของจุลินทรีย์กลุ่มบาซิลลัสในฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei* Boon, 1931) พื้นที่ความเค็มต่ำจังหวัดฉะเชิงเทราในครั้งนี้ สามารถแยกเชื้อจุลินทรีย์บาซิลลัสจากตัวอย่างดินพื้นบ่อเลี้ยงกุ้ง มาวิเคราะห์จำแนกชนิดจุลินทรีย์โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rRNA พบว่า มีจุลินทรีย์กลุ่มบาซิลลัส ทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ *Bacillus megaterium*, *B. subtilis*, *B. paralicheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. siamensis* และ *B. velezensis* มีคุณสมบัติในการเจริญได้ดีที่อุณหภูมิในช่วง 30–40°C การปรับตัวดังกล่าวสะท้อนถึงความเหมาะสมต่อสภาพแวดล้อมในบ่อเลี้ยงกุ้ง ซึ่งอุณหภูมิในช่วงดังกล่าวส่งเสริมการทำงานที่มีประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ตามที่รายงานโดย Hansen และ Olafsen (1999) นอกจากนี้ จุลินทรีย์กลุ่มดังกล่าวยังสามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่มีค่า pH อยู่ในช่วง 4–7 โดยปริมาณจุลินทรีย์จะเริ่มลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อค่า pH สูงถึง 10 ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะทั่วไปของค่า pH ของดินในบ่อเลี้ยงกุ้งทะเล และค่า pH ในกระเพาะอาหารของกุ้งที่มีค่าอยู่ระหว่าง 5–7 (Amita, 2005)

การศึกษาประสิทธิภาพของจุลินทรีย์กลุ่ม *Bacillus* ทั้ง 6 ชนิดที่แยกได้จากดินพื้นบ่อเลี้ยงกุ้ง ความเค็มต่ำในจังหวัดฉะเชิงเทรา พบว่าจุลินทรีย์กลุ่มดังกล่าวมีความสามารถในการครอบครองเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* (*Vp_{AHPND}*) ได้อย่างมีประสิทธิภาพในระยะเวลา 12–48 ชั่วโมง จากการทดลองด้วยวิธี Co-culture ผลลัพธ์ชี้ให้เห็นว่าแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัส มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Vp_{AHPND}* ซึ่งอาจเกิดจากการสร้างสาร Antimicrobial Compounds ที่สามารถทำลายหรือยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นๆ ได้ (Moriarty, 1998) ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการทดลองของ Vaseeharan และ Ramasamy (2003) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า *B. subtilis* BT23 มีความสามารถในการลดจำนวน *V. harveyi* อย่างมีนัยสำคัญเมื่อจำนวนเซลล์ของ *B. subtilis* BT23 เพิ่มขึ้นในระบบ Co-culture นอกจากนี้ การทดลองของ Purivirojkul และ Areechon (2007) ยังพบว่าแบคทีเรีย *Bacillus* w1106 ที่แยกได้จากลำไส้ของกุ้งกุลาดำสามารถสร้างสาร Antibacterial ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้ง *V. harveyi* หลังจากผ่านไป 48 ชั่วโมง โดยผลการยับยั้งดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับการสร้างสารต้านจุลชีพ การเปลี่ยนแปลงค่า pH การแข่งขันในการยึดพื้นที่ และการแย่งชิงสารอาหาร ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นเกณฑ์ในการคัดเลือกแบคทีเรียโปรไบโอติกเพื่อควบคุมการเจริญเติบโตของแบคทีเรียก่อโรค (Irianto และ Austin, 2002; Vaseeharan และ Ramasamy, 2003) และการศึกษาของวีรสันต์ (2562) ด้วยวิธี Agar Spot Test ที่ระดับความเค็ม 25 ส่วนในพันส่วน พบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ AQAHBS001 มีความสามารถในการเข้าครองพื้นที่และผลิตสารยับยั้งเชื้อ *Vp_{AHPND}* ส่งผลให้ลดจำนวนของเชื้อ *Vp_{AHPND}* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

การศึกษาประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ CH2 ซึ่งมีจุลินทรีย์ *B. subtilis* เป็นองค์ประกอบหลักในการลดปริมาณสารอินทรีย์ที่เกิดขึ้นจากการเลี้ยงกุ้งในสภาวะห้องปฏิบัติการ พบว่ากลุ่มที่เติมผลิตภัณฑ์ที่ขยายเพิ่มปริมาณแล้วในอัตรา 300, 500 และ 700 ลิตร/ไร่ มีการลดลงของปริมาณสารอินทรีย์ได้มากกว่ากลุ่มควบคุม ตั้งแต่ช่วงแรกของการทดลอง (7 วัน) ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีการลดลงของสารอินทรีย์เพียงเล็กน้อย ซึ่งอาจเกิดจากการทำงานของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในสารอินทรีย์ที่นำมาทดสอบในสภาพที่มีปริมาณออกซิเจน

เพียงพอ (> 4 มิลลิกรัมต่อลิตร) สำหรับระบบเลี้ยงในบ่อดิน สารอินทรีย์สะสมในดินตะกอนจะเกิดการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ ซึ่งในชั้นดินตะกอนที่มีออกซิเจนเพียงพอก็จะเกิดปฏิกิริยาการย่อยสลายแบบใช้ออกซิเจน (aerobic decomposition) อย่างไรก็ตาม เมื่อระดับออกซิเจนลดลงในชั้นดินที่ลึกขึ้น การย่อยสลายจะใช้สารอื่น เช่น แมงกานีสออกไซด์ (MnO_2), ไนเตรต (NO_3^-), เหล็กออกไซด์ (Fe_2O_3), และซัลเฟต (SO_4^{2-}) แทน ซึ่งในสภาวะดังกล่าวอาจมีการสะสมของแอมโมเนียและซัลไฟด์ที่เป็นพิษได้ (จารุมาศ, 2548) จากผลการทดลองชี้ให้เห็นถึงความสำคัญของการใช้จุลินทรีย์ *Bacillus* spp. ร่วมกับปริมาณออกซิเจนที่เพียงพอในระบบการเลี้ยงกุ้ง ซึ่งช่วยเร่งการย่อยสลายสารอินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะ *B. subtilis* (CH2) จากรายงานของ สุบัณฑิต และวีรพงศ์ (2552) *Bacillus* spp. สามารถย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต กรดอินทรีย์ โปรตีน ไขมัน และสารประกอบโมเลกุลใหญ่ต่าง ๆ ผ่านเอนไซม์นอกเซลล์ (extracellular enzymes) และสามารถทนต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมพื้นบ่อ รวมถึง การใช้จุลินทรีย์กลุ่ม *Bacillus* ยังมีประสิทธิภาพในการปรับปรุงคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้ง โดยพบว่า *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. firmus*, *B. lentus* และ *B. marinus* มีความสามารถในการย่อยสลายเศษอาหาร ของเสียจากกุ้ง และสารอินทรีย์ในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ทำให้คุณภาพน้ำดีขึ้น และกุ้งมีอัตราการรอดตายสูงกว่าในบ่อที่ไม่ได้เติมจุลินทรีย์ และยังสอดคล้องกับผลการศึกษาการใช้จุลินทรีย์กลุ่ม *Bacillus* ในการลดปริมาณสารอินทรีย์ในระบบการเลี้ยงกุ้ง โดยเฉพาะในระบบที่มีการสะสมของสารอินทรีย์ในปริมาณมาก ซึ่งสามารถช่วยปรับปรุงคุณภาพน้ำ และลดการสะสมของสารประกอบที่เป็นพิษต่อสัตว์น้ำ เช่น ไนโตรเจน และซัลไฟด์ อีกทั้งยังส่งเสริมการดำรงชีวิตของสัตว์น้ำในบ่อเลี้ยง (ชลอ, 2535; วิรัช, 2544; อนันต์, 2536; Avnimelech, 1992; Boyd, 1990)

การศึกษาคูสมบัติของผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ *B. subtilis* CH2 พบว่าผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ *B. subtilis* CH2 มีคุณสมบัติตามหลักเกณฑ์การขึ้นทะเบียนผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ปรับสภาพน้ำที่ใช้ทางการประมง ซึ่งชี้ให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ *B. subtilis* CH2 มีความปลอดภัย และมีประสิทธิภาพในการลดปริมาณสารอินทรีย์และของเสียในระบบการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม

และเมื่อนำผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ *B. subtilis* (CH2) แจกจ่ายให้แก่เกษตรกรในพื้นที่จังหวัดฉะเชิงเทรา ซึ่งเป็นสมาชิกกลุ่มวิสาหกิจชุมชนชมรมผู้เลี้ยงกุ้งฉะเชิงเทรา จำนวน 51 ราย ทดลองใช้ในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม พบว่าเกษตรกรมีความพึงพอใจมากที่สุดต่อการใช้ผลิตภัณฑ์ โดยเฉพาะในด้านการปรับปรุงคุณภาพน้ำ (67 เปอร์เซ็นต์) การป้องกันโรค (49 เปอร์เซ็นต์) และการเสริมสร้างความแข็งแรงของกุ้ง (41 เปอร์เซ็นต์) สอดคล้องกับ งานวิจัยของ ไตรมาศ และ คณะ (2550) ที่พบว่า จุลินทรีย์โพรไบโอติกกลุ่ม *Bacillus* สามารถลดปริมาณแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอในทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำได้ Crus-Lacierda et al. (2008) ได้ศึกษาการใช้ประโยชน์ของโพรไบโอติกในประเทศฟิลิปปินส์ พบว่าเป็นการใช้เพื่อลดการสะสมของเสียในบ่อเพาะเลี้ยง และเพิ่มปริมาณผลผลิตของสัตว์น้ำที่นิยมเลี้ยงแบบพัฒนา ซึ่งจะใช้ตั้งแต่ช่วงระยะเวลาก่อนเตรียมบ่อและในระหว่างการเลี้ยงสัตว์น้ำ และการใช้โพรไบโอติกมีทั้งแบบใช้ผสมกับอาหารสัตว์น้ำ และเติมลงในน้ำเพื่อปรับปรุงคุณภาพน้ำ

จากผลการวิจัยนี้ สามารถคัดแยกจุลินทรีย์ *B. subtilis* (CH2) ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอินทรีย์ และครอบครองเชื้อ *Vp_{AHPND}* และนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ CH2 ที่มีประสิทธิภาพในการลดสารอินทรีย์และปริมาณแอมโมเนียรวมในน้ำ ซึ่งได้รับการยอมรับในประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ชนิดนี้

จากเกษตรกรในพื้นที่เลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมความเค็มต่ำ จังหวัดฉะเชิงเทรา เป็นอย่างมาก จากผลการศึกษาข้างต้นสามารถใช้เป็นแนวทางในการส่งเสริมและพัฒนาต่อยอดเป็นองค์ความรู้ในการคัดเลือกจุลินทรีย์ชนิดที่เหมาะสมกับพื้นที่ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของประเทศไทยต่อไป

ข้อเสนอแนะ

1. ควรนำผลการศึกษาในครั้งนี้ไปขยายผลศึกษาในสภาพบ่อเลี้ยงจริง เพื่อยืนยันประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ CH2
2. ควรทดสอบประสิทธิภาพสารสำคัญ และกลไกการทำงานของจุลินทรีย์ให้ครบทุกด้าน เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในหลาย ๆ ด้าน
3. องค์ความรู้ด้านการคัดแยกจุลินทรีย์พื้นถิ่นนี้ สามารถนำไปเป็นต้นแบบ ถ่ายทอดให้แก่ศูนย์ผลิตจุลินทรีย์อื่นที่กรมประมงส่งเสริมได้

คำขอบคุณ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ นายชาลี จิตรประสงค์ ประธานชมรมผู้เลี้ยงกุ้งฉะเชิงเทรา นายกิตติพัฒน์ ศรีสมวงศ์ รองประธานชมรมผู้เลี้ยงกุ้งฉะเชิงเทรา ที่ให้การสนับสนุนข้อมูลทางการศึกษา อำนวยความสะดวกในการส่งตัวอย่างตรวจวิเคราะห์ทดสอบประสิทธิภาพ และสารสำคัญของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในพื้นที่ฉะเชิงเทรา ผลิตและแจกจ่ายจุลินทรีย์ให้กับเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งจังหวัดฉะเชิงเทรา ขอขอบพระคุณ ดร. ชัยวุฒิ สุตทองคง หัวหน้ากลุ่มหัวหน้ากลุ่มวิจัยและพัฒนาการเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งและพัฒนาธุรกิจ นายบรรจง นิสวานิชย์ ประธานสมาพันธ์การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำไทย เป็นผู้ให้ข้อเสนอแนะในการพัฒนาจุลินทรีย์พื้นถิ่นให้เกิดประโยชน์กับเกษตรกรในพื้นที่จังหวัดฉะเชิงเทรา ขอขอบคุณ นางสาวสุรียรัตน์ เผือกจิน นักวิชาการประมงชำนาญการ และพนักงานเจ้าหน้าที่ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งฉะเชิงเทราทุกท่าน ที่ช่วยวิเคราะห์งานทางด้านจุลินทรีย์จนงานวิจัยสำเร็จ นอกจากนี้ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณคณะกรรมการตรวจเอกสารวิชาการทุกท่านที่ให้คำแนะนำ ให้ข้อเสนอแนะในการเขียนงานวิจัยฉบับนี้ให้สมบูรณ์และสำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- จารุมาศ เมฆสัมพันธ์. 2548. ดินตะกอน SEDIMENTS. ภาควิชาชีววิทยาประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร. 146 หน้า.
- ชลอ ลีสมรรณ. 2535. คัมภีร์การเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. โรงพิมพ์ฐานเศรษฐกิจ จำกัด, กรุงเทพมหานคร. 202 หน้า.
- ชัยวุฒิ สุดทองคง ชมพูนุท หลักดี ปาณิสรา เอกจัน ปารณีย์ กิ่งชา ชรินทร์ เพ็ญไทสง วัชพล จำรัสชูเกียรติ และไกรวุฒิ ปิ่นแก้ว. 2558. ผลของ *Bacillus subtilis* *Bacillus megaterium* และ *Bacillus licheniformis* ในผลิตภัณฑ์หัวเชื้อจุลินทรีย์ ปม.1 ต่อเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค EMS/AHPND. ใน: การประชุมวิชาการประมง ประจำปี 2558. วันที่ 9-10 มิถุนายน 2558. ณ กรมประมง, กรุงเทพมหานคร. หน้า 84-95.
- ไตรมาศ บุญไทย, วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย และสุบัณฑิต นิมรรัตน์. 2550. ผลของโพรไบโอติกต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณของ *Vibrio* และปริมาณแบคทีเรียโพรไบโอติกระหว่างการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45 ระหว่างวันที่ 30 มกราคม – 2 กุมภาพันธ์ 2550.
- นฤมล มาแทน. 2560. FTH-212 ปฏิบัติการจุลชีววิทยาอาหาร. เทคโนโลยีอาหาร สาขาอุตสาหกรรมเกษตร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร, มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์. 86 หน้า.
- นิคม ละอองศิริวงศ์ และยงยุทธ ปรีดาลัมพะบุตร. 2546. วิธีวิเคราะห์น้ำเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง กรมประมง. 211 หน้า.
- พิมพ์พร ทองเมือง. 2558. เอกสารประกอบการสอนรายวิชาความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับจุลชีววิทยาทางการแพทย์. มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา, กรุงเทพมหานคร. 145 หน้า.
- สุบัณฑิต นิมรรัตน์. 2551. การพัฒนาผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกสำหรับการเลี้ยงกุ้งทะเล. ใน: การนำเสนอผลงานวิจัยแห่งชาติ 2551. วันที่ 12-16 กันยายน 2551. ณ ศูนย์ประชุมบางกอกคอนเวนชัน เซ็นเตอร์ เซ็นทรัลเวิลด์, กรุงเทพมหานคร. 58 หน้า.
- สุบัณฑิต นิมรรัตน์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. 2552. การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอย่างยั่งยืน : บทบาทของจุลินทรีย์และการประยุกต์ใช้. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพมหานคร. 308 หน้า.
- สุบัณฑิต นิมรรัตน์ ไตรมาศ บุญไทย และวีรพงษ์ วุฒิพันธุ์ชัย. 2552. โพรไบโอติก : อดีต ปัจจุบันและอนาคตของการใช้โพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยง. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา. หน้า 67-79.
- สำนักงานประมงจังหวัดฉะเชิงเทรา. 2541. ความเข้าใจทางด้านสิ่งแวดล้อมของผู้เลี้ยงกุ้งกุลาดำ. แหล่งที่มา <https://kb.psu.ac.th/psukb/bitstream/2016/10883/1/221903.pdf>
- วิชญ์ บุญญาวิวัฒน์. 2541. โรคและความผิดปกติทางพันธุกรรมของกุ้งก้ามกราม. ใน: งานวันเกษตรแห่งชาติ ประจำปี 2541. ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม. หน้า 20-24.
- วิรัช จิวแหยม. 2544. ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับคุณภาพน้ำและการวิเคราะห์คุณภาพน้ำในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพมหานคร. 120 หน้า.
- วีรสันต์ คิวเจริญ. 2562. ผลการใช้แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ AQAHBS001 ต่อการเจริญ การตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน คุณภาพน้ำ และความสามารถในการต้านทานเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*, Boone, 1931). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร. 169 หน้า.

- อรรวรรณ์ บุตรดี, พรพรรณ อยู่สุวรรณ และ กัญญา สอนสนิท. 2566. การคัดเลือกเชื้อบาซิลลัสโพรไบโอติกส์จากทางเดินอาหารของกุ้งก้ามกรามจากคลองธรรมชาติในจังหวัดนครปฐม. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 2: 11-19.
- อนันต์ ต้นสะพานิช. 2536. แนวทางปฏิบัติการเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบปิด และระบบน้ำหมุนเวียนมาใช้ใหม่. กองเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง, กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 45 หน้า.
- อนันต์ชัย เชื้ออนธรรม. 2542. หลักการวางแผนการทดลอง. ภาควิชาสถิติ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร. 350 หน้า.
- APHA, AWWA. and WEF. 1995. Standard Method for the Examination of Water and Wastewater. 20th edition. United Book Press, Maryland. 1220 pp.
- Amita, S. 2005. Text Book of Crustacea. Discovery Publishing House, Indian. 135 pp
- Avnimelech, Y., N. Mozes and B. Weber. 1992. Effect of aerator and mixing on nitrogen and organic matter transformations in simulate fish pond. *Aqua. Eng.* 11: 157-169.
- Boyd, C.E. 1990. Water quality in ponds for aquaculture. Agriculture Experiment Station, Auburn University, Alabama, The United States of America. 482 pp.
- Colwell, R.R. and R.Y. Morita. 1974. Effect of Ocean Environment on Microbial Activities. University Park Press, Baltimore, Maryland, The United States of America. 325 pp
- Cruz-Lacierda, E.R., Corre, Jr., V.L., Yamamoto, A., Koyama, J., & Matsuoka, T. 2008. Current status on the use of chemicals and biological products and health management practices in aquaculture farms in the Philippines. *Memoirs of Faculty of Fisheries. Kagoshima University.* 57: 37-45.
- Cunniff, P.A. 1995. Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th ed. Method 2.7.08. Chapter 2. 37 pp.
- El-Hassan, S. A., and S. R. Gowen. 2006. Formulation and Delivery of the Bacterial Antagonist *Bacillus subtilis* for Management of Lentil Vascular Wilt Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. lentis. *J. Phytopathol.* 154: 148-155.
- FDA. Original Source: Bacteriological Analytical Manual, 8thed. Revision Available source: <https://www.fda.gov/media/178943/download?attachment>. March 27 , 2023.
- Hansen, G.H. and J.A. Olafsen. 1999. Bacterial interactions in early life stages of marine cold water fish. *Microb. Ecol.* 38: 1-26.
- Hyronimus, B., C.L. Marrec, A.H. Sassis. and A. Deschamps. 2000. Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria. *Int. J. Food MicroBiol.* 61: 193-197.
- Irianto A. and B. Austin. 2002. Probiotic in aquaculture. *J. Fish Dis.* 25: 633-642.
- Joshi, J., J. Srisala, V.H. Truong, I.T. chen, B. Nuangsaeng, O. Suthienkul, C.F. LO, T.W. Flegal, K. Sritungalucksana and S. thitamadee. 2014. Variation in *Vibrio parahaemolyticus*. Isolates. Form a single Thai Shrimp experiencing an Outbreak of acute hepatopancreatic necrosis. Disease (AHPND). *Aquaculture.* 428-429: 297-302

- Moriarty, D.J. 1998. Control of luminous *Vibrio* Species in Penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture*. 164: 351-358.
- 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
- U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 2001. Chapter 18. Yeasts, Molds and Mycotoxins. Available source: http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm_071435.htm. March 27 ,2023.
- 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 (2): 83.

ภาคผนวกที่ 1

แบบสอบถามเลขที่.....
 ผู้สัมภาษณ์.....
 วันที่.....

แบบสอบถามการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ในการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล

แบบสอบถามนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพหัวเชื้อจุลินทรีย์ในการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล สำหรับการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ที่ช่วยในการปรับคุณภาพน้ำ ป้องกันและรักษาโรค ช่วยลดต้นทุน และช่วยเพิ่มผลผลิตในฟาร์มเลี้ยงกุ้งของเกษตรกร โปรดกรุณาตอบคำถามทุกข้อตามความเป็นจริง และขอขอบคุณที่กรุณาตอบแบบสอบถาม

ตอนที่ 1 ข้อมูลเกษตรกรและฟาร์มเลี้ยงกุ้งทะเล

ก. ลักษณะทางเศรษฐกิจและสังคม

- ชื่อ - สกุล เจ้าของฟาร์ม.....อายุ.....ปี
- เพศ ☐ ชาย ☐ หญิง เบอร์ติดต่อ/โทร.....
- ระดับวุฒิการศึกษา

☐ 1) ประถมศึกษา	☐ 2) มัธยมศึกษาตอนต้น	☐ 3) มัธยมศึกษาตอนปลาย
☐ 4) อาชีวศึกษา/ปวช.	☐ 5) อนุปริญญา/ปวส.	☐ 6) ปริญญาตรี
☐ 7) สูงกว่าปริญญาตรี	☐ 8) อื่น ๆ ระบุ	
- จำนวนสมาชิกในครัวเรือนทั้งหมด จำนวน.....คน ประกอบอาชีพการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ จำนวน.....คน
- อาชีพหลักของท่าน (อาชีพหลัก คือ อาชีพที่ใช้เวลาในการทำงานมากที่สุด และตอบได้เพียง 1 รายการ)

☐ 1) การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	☐ 2) การประมง	☐ 3) การเกษตรอื่นๆ
☐ 4) ธุรกิจส่วนตัว/ค้าขาย	☐ 5) รับจ้าง	☐ 6) ลูกจ้างหรือพนักงานประจำบริษัท
☐ 7) ข้าราชการ/พนักงานรัฐวิสาหกิจ/ลูกจ้างรัฐ	☐ 8) อื่น ๆ ระบุ	
- อาชีพรอง/อาชีพเสริมของท่าน (ตอบได้มากกว่า 1 รายการ)

☐ 1) การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	☐ 2) การประมง	☐ 3) การเกษตรอื่น ๆ (ทำสวน ปศุสัตว์)
☐ 4) ธุรกิจส่วนตัว/ค้าขาย	☐ 5) รับจ้าง	☐ 6) ลูกจ้างหรือพนักงานประจำบริษัท
☐ 7) ข้าราชการ/พนักงานรัฐวิสาหกิจ/ลูกจ้างรัฐ	☐ 8) อื่น ๆ ระบุ	

ข. ข้อมูลฟาร์มเลี้ยงกุ้งทะเล

- ชื่อฟาร์ม.....ปี
 ประสบการณ์ในการเลี้ยงกุ้งทะเล.....ปี
- ที่ตั้งฟาร์ม หมู่ที่.....ตำบล.....อำเภอ.....จังหวัด.....
- ท่านเป็นสมาชิกของกลุ่มต่าง ๆ ในธุรกิจเกี่ยวกับกุ้ง

☐ 3.1 เป็นสมาชิกของกลุ่มเกษตรกร ชื่อ.....ระยะเวลาที่เป็นสมาชิก.....ปี
☐ 3.2 ไม่เป็นสมาชิกของกลุ่ม
- ประเภทของการจดทะเบียนฟาร์ม ☐ 4.1 บุคคลธรรมดา ☐ 4.2 นิติบุคคล
- พื้นที่ฟาร์มทั้งหมด.....ไร่

- จำนวนบ่อเลี้ยง.....บ่อ เนื้อที่บ่อเลี้ยงรวมทุกบ่อ.....ไร่
 จำนวนบ่อพักน้ำ.....บ่อ เนื้อที่บ่อพักน้ำรวมทุกบ่อ.....ไร่
 จำนวนบ่อบำบัดน้ำ.....บ่อ เนื้อที่บ่อบำบัดน้ำรวมทุกบ่อ.....ไร่
6. โครงสร้างบ่อเลี้ยง (สามารถตอบได้มากกว่า 1 คำตอบ กรณีที่มีหลายบ่อและมากกว่า 1 รูปแบบ)
- ☐ 6.1 บ่อดิน ระบุจำนวนบ่อ
☐ 6.2 บ่อดินปูทับด้วยแผ่น PE เฉพาะบริเวณขอบบ่อ ระบุจำนวนบ่อ
☐ 6.3 บ่อดินปูทับด้วยแผ่น PE ทั้งบ่อ ระบุจำนวนบ่อ
☐ 6.3 บ่อดินปูทับด้วยแผ่น PE ทั้งบ่อเว้นเฉพาะกลางบ่อ ระบุจำนวนบ่อ
☐ 6.4 บ่อดินปูทับด้วยคอนกรีต ระบุจำนวนบ่อ
☐ 6.5 บ่อลอย ระบุจำนวนบ่อ
☐ 6.5 บ่ออื่น ๆ..... ระบุจำนวนบ่อ
7. ลักษณะการเลี้ยง
- ☐ 7.1 การเลี้ยงเดี่ยว (เลี้ยงเฉพาะกุ้งทะเล) จำนวนทั้งหมด.....บ่อ
 ○ กุ้งขาวแวนนาไม จำนวน.....บ่อ หรือคิดเป็นสัดส่วน.....เปอร์เซ็นต์
 ○ กุ้งกุลาดำ จำนวน.....บ่อ หรือคิดเป็นสัดส่วน.....เปอร์เซ็นต์
☐ 7.2 การเลี้ยงแบบผสมผสาน (เลี้ยงกุ้งทะเลร่วมกับสัตว์น้ำชนิดอื่น เช่น กุ้งก้ามกราม ปลานิล)
 จำนวน.....บ่อ สัตว์น้ำที่เลี้ยงร่วม (ระบุ).....
8. มาตรฐานฟาร์มในการเลี้ยงกุ้งทะเล
- ☐ มีมาตรฐานฟาร์ม โปรตระบุมาตรฐานฟาร์ม.....
☐ ไม่มีมาตรฐานฟาร์ม
9. ระบบการเลี้ยง จำแนกตามการใช้ น้ำ
- ☐ 9.1 ระบบเปิด หรือกึ่งปิด
☐ 9.2 ระบบปิด
☐ 9.3 ระบบน้ำหมุนเวียน
10. แหล่งน้ำที่ใช้การเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล
- ☐ 10.1 คลองชลประทาน /เขื่อน /อ่างเก็บน้ำ /คลองข่อย (โปรดระบุชื่อ).....
☐ 10.2 แม่น้ำ/คลอง (โปรดระบุชื่อ).....
☐ 10.3 น้ำชายฝั่ง (โปรดระบุชื่อ).....
☐ 10.4 แหล่งน้ำอื่น ๆ (โปรดระบุชื่อ).....
11. รูปแบบของเทคโนโลยี/นวัตกรรม (Demonstration Models) ที่ใช้ในการเลี้ยงกุ้ง
- ☐ 11.1 การใช้มอเตอร์ไฟฟ้ากระแสตรง (DC motor) กับเครื่องตีน้ำ
☐ 11.2 การใช้ Nanobubble ในการเลี้ยงกุ้ง
☐ 11.3 การใช้ Solar cell ในฟาร์มเลี้ยงกุ้ง
☐ 11.4 การใช้เครื่องควบคุมระบบเติมอากาศอัจฉริยะในการเลี้ยงกุ้ง
☐ 11.5 การใช้ Solar cell ร่วมกับการใช้เครื่องควบคุมระบบเติมอากาศอัจฉริยะในการเลี้ยงกุ้ง
☐ 11.6 อื่น ๆ (โปรดระบุ).....

ตารางภาคผนวกที่ 1 รายละเอียดกิจกรรมและขั้นตอนกิจกรรมการเลี้ยงกุ้งทะเลในภาพรวม โปรตรระบุ ☒ ด้านหน้าข้อความตามกิจกรรม

การเตรียมบ่อ	การเตรียมน้ำ ในบ่อพัก	การเตรียมน้ำ ในบ่อชำ (อนุบาลกุ้ง PL)	การเตรียมน้ำ ในบ่อเลี้ยง	การจัดการอาหาร	การเพิ่มอากาศ ระหว่างการเลี้ยง	การจัดการน้ำ ระหว่างการเลี้ยง	การจับผลผลิต
☐ ฉีดเลน	☐ สูบน้ำเข้า บ่อพัก	☐ สูบน้ำเข้า บ่อชำ	☐ สูบน้ำ เข้าบ่อเลี้ยง	☐ เครื่องผสม อาหาร	☐ เติमอากาศ เวลากลางวัน	☐ ดูดตะกอน	☐ สูบน้ำออก
☐ ดูดเลน	☐ เติมจุลินทรีย์ ในบ่อพัก	☐ เติมจุลินทรีย์ ในบ่อชำ	☐ เติมจุลินทรีย์ ในบ่อเลี้ยง	☐ เครื่องให้ อาหารอัตโนมัติ	☐ เติมอากาศ เวลากลางคืน	☐ ถ่ายน้ำออก	☐ จับผลผลิต
☐ ลอกเลน	☐ เติมอากาศ	☐ เติมอากาศ ก่อนลงลูกกุ้ง	☐ เติมอากาศ ก่อนลงลูกพันธุ์	☐ ใช้แรงงานคน ให้อาหาร		☐ เติมน้ำเข้า	
☐ ตากบ่อ				☐ ใช้จุลินทรีย์ ผสมในอาหาร		☐ ใช้จุลินทรีย์ ปรับคุณภาพน้ำ	
☐ ใช้จุลินทรีย์ ปรับสภาพดิน							

2. การใช้จุลินทรีย์ในการเพาะเลี้ยงกุ้ง

1) หัวเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้

- ☐ ปม.2 กรัมประมง ชนิดน้ำ ปริมาณการใช้รวม.....ขวด/ครอบ
- ☐ เตรียมบ่อ ☐ เตรียมน้ำ ☐ ปรับคุณภาพน้ำระหว่างเลี้ยง ☐ ผสมอาหาร
- ☐ ปม.2 กรัมประมง ชนิดผง ปริมาณการใช้รวม.....ซอง/ครอบ
- ☐ เตรียมบ่อ ☐ เตรียมน้ำ ☐ ปรับคุณภาพน้ำระหว่างเลี้ยง ☐ ผสมอาหาร
- ☐ (BS. (CH2) ชนิดน้ำ ปริมาณการใช้รวม.....ขวด/ครอบ
- ☐ เตรียมบ่อ ☐ เตรียมน้ำ ☐ ปรับคุณภาพน้ำระหว่างเลี้ยง ☐ ผสมอาหาร
- ☐ (BS. (CH2) BL.BM) ชนิดน้ำ ปริมาณการใช้รวม.....ขวด/ครอบ
- ☐ เตรียมบ่อ ☐ เตรียมน้ำ ☐ ปรับคุณภาพน้ำระหว่างเลี้ยง ☐ ผสมอาหาร
- ☐ (BS. (CH2) BL.BM) ชนิดผง ปริมาณการใช้รวม.....ซอง/ครอบ
- ☐ เตรียมบ่อ ☐ เตรียมน้ำ ☐ ปรับคุณภาพน้ำระหว่างเลี้ยง ☐ ผสมอาหาร
- ☐ (B.amylo) ปริมาณการใช้รวม.....ขวด/ครอบ
- ☐ เตรียมบ่อ ☐ เตรียมน้ำ ☐ ปรับคุณภาพน้ำระหว่างเลี้ยง ☐ ผสมอาหาร
- ☐ (BS(CH2) ชนิดผง) ปริมาณการใช้รวม.....ซอง/ครอบ
- ☐ เตรียมบ่อ ☐ เตรียมน้ำ ☐ ปรับคุณภาพน้ำระหว่างเลี้ยง ☐ ผสมอาหาร

2) กิจกรรมและปริมาณการใช้

- ☐ เตรียมบ่อ ปูนขาว/ปูนร้อน.....กก./ไร่ จุลินทรีย์.....ลิตร/ไร่ ความถี่.....วัน
- ☐ เตรียมน้ำ ปูนขาว/ปูนร้อนกก./ไร่ จุลินทรีย์.....ลิตร/ไร่ ความถี่.....ครั้ง ระยะเวลา.....วัน
- ☐ ระหว่างการเลี้ยงอายุกุ้ง.....วัน จุลินทรีย์.....ลิตร/ไร่ ความถี่.....วัน/ครั้ง
- อายุกุ้ง.....วัน จุลินทรีย์.....ลิตร/ไร่ ความถี่.....วัน/ครั้ง
- อายุกุ้ง.....วัน จุลินทรีย์.....ลิตร/ไร่ ความถี่.....วัน/ครั้ง
- ☐ ผสมอาหารอายุกุ้ง.....วัน จุลินทรีย์.....มล./กก. ความถี่.....มื้อ/วัน
- อายุกุ้ง.....วัน จุลินทรีย์.....มล./กก. ความถี่.....มื้อ/วัน
- อายุกุ้ง.....วัน จุลินทรีย์.....มล./กก. ความถี่.....มื้อ/วัน
- ☐ กรณีอื่น ๆ (โปรดระบุ)
- ☐ กุ้งเป็นโรค.....อาการ.....ชนิดจุลินทรีย์ที่ใช้.....
- ปรับคุณภาพน้ำ จุลินทรีย์.....ลิตร/ไร่ ความถี่.....วัน/ครั้ง ระยะเวลา.....วัน
- ผสมอาหาร จุลินทรีย์.....มล./กก. ความถี่.....มื้อ/วัน ระยะเวลา.....วัน
- ☐ ปรับคุณภาพน้ำ
- จุลินทรีย์.....ลิตร/ไร่ ความถี่.....วัน/ครั้ง ระยะเวลา.....วัน
- ☐ อื่น ๆ (ระบุ).....

ตารางภาคผนวกที่ 2 ความพึงพอใจต่อการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม

ประสิทธิภาพการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์	ระดับความพึงพอใจ				หมายเหตุ
	มากที่สุด	มาก	ปานกลาง	น้อย	
ประสิทธิภาพในการจัดการคุณภาพน้ำ					
ประสิทธิภาพในการป้องกันการเกิดโรค					
ประสิทธิภาพในการรักษาโรค					
ประสิทธิภาพต่อความแข็งแรงของกุ้ง					
ช่วยในการลดต้นทุนการผลิต					
ช่วยให้ได้ผลผลิตเพิ่มขึ้น					

ข้อคิดเห็นเพิ่มเติม.....

ตอนที่ 3 การกระจายผลผลิตและการตลาดกุ้งทะเล

3.1 ลักษณะการจำหน่าย

- ☐ 1) ขายปากบ่อ/ที่ฟาร์ม
- ☐ 2) ขายเองที่ตลาดกลางกุ้ง
- ☐ 3) ส่งให้ผู้ซื้อที่ (ระบุ).....

3.2 สัดส่วนช่องทางการจำหน่ายผลผลิต

- ☐ 1) แพ/ผู้รวบรวม/โบรกเกอร์ ในพื้นที่ ร้อยละ (เปอร์เซ็นต์).....
- ☐ 2) แพ/ผู้รวบรวม/โบรกเกอร์ นอกพื้นที่ ร้อยละ (เปอร์เซ็นต์).....
- ☐ 3) ห้องเย็น/โรงงานแปรรูป ร้อยละ (เปอร์เซ็นต์).....
- ☐ 4) ห้างสรรพสินค้า/ซูเปอร์มาร์เก็ต ร้อยละ (เปอร์เซ็นต์).....
- ☐ 5) ช่องทางการจำหน่ายออนไลน์ ร้อยละ (เปอร์เซ็นต์).....
- ☐ 6) อื่น ๆ ร้อยละ (เปอร์เซ็นต์).....

3.3 ลักษณะการจับกุ้ง

- ☐ 1) จับครั้งเดียวหมดบ่อ
- ☐ 2) ทอยจับ.....ครั้ง/รุ่น

3.4 รูปแบบการจำหน่ายกุ้ง

- ☐ 1) ขายแบบคัดขนาดแต่ละขนาด
- ☐ 2) ขายราคาเดียวทุกขนาด (คละขนาด)

3.5 ราคากุ้งที่จับขายแต่ละขนาด

- ☐ 1) ขนาดกุ้ง 20 - 29 ตัว/กิโลกรัม ปริมาณกุ้งที่จับขายได้.....กก.
ราคา.....บาท/กก.
- ☐ 2) ขนาดกุ้ง 30 - 39 ตัว/กิโลกรัม ปริมาณกุ้งที่จับขายได้.....กก.
ราคา.....บาท/กก.
- ☐ 3) ขนาดกุ้ง 40 - 49 ตัว/กิโลกรัม ปริมาณกุ้งที่จับขายได้.....กก.
ราคา.....บาท/กก.
- ☐ 4) ขนาดกุ้ง 50 - 59 ตัว/กิโลกรัม ปริมาณกุ้งที่จับขายได้.....กก.
ราคา.....บาท/กก.
- ☐ 5) ขนาดกุ้ง 60 - 69 ตัว/กิโลกรัม ปริมาณกุ้งที่จับขายได้.....กก.
ราคา.....บาท/กก.
- ☐ 6) ขนาดกุ้ง 70 - 79 ตัว/กิโลกรัม ปริมาณกุ้งที่จับขายได้.....กก.
ราคา.....บาท/กก.
- ☐ 7) มากกว่า 80 ตัว/กิโลกรัม ปริมาณกุ้งที่จับขายได้.....กก.
ราคา.....บาท/กก.

3.6 เหตุผลที่จับขาย

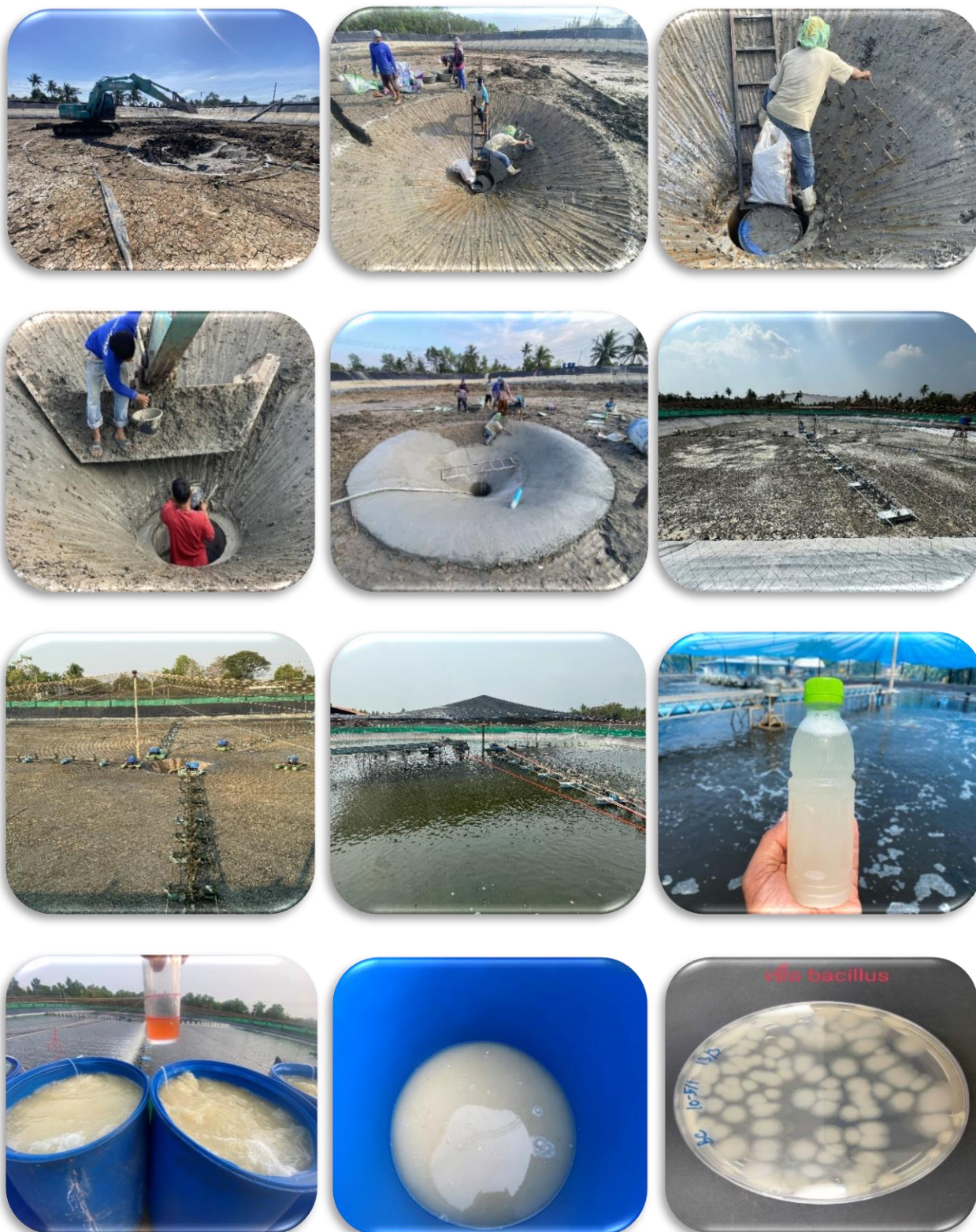
- ☐ 1) กุ้งได้ขนาดที่ต้องการ
- ☐ 2) กุ้งเป็นโรค (ระบุ โรค/อาการ).....

3.7 ลักษณะการจำหน่ายกุ้ง

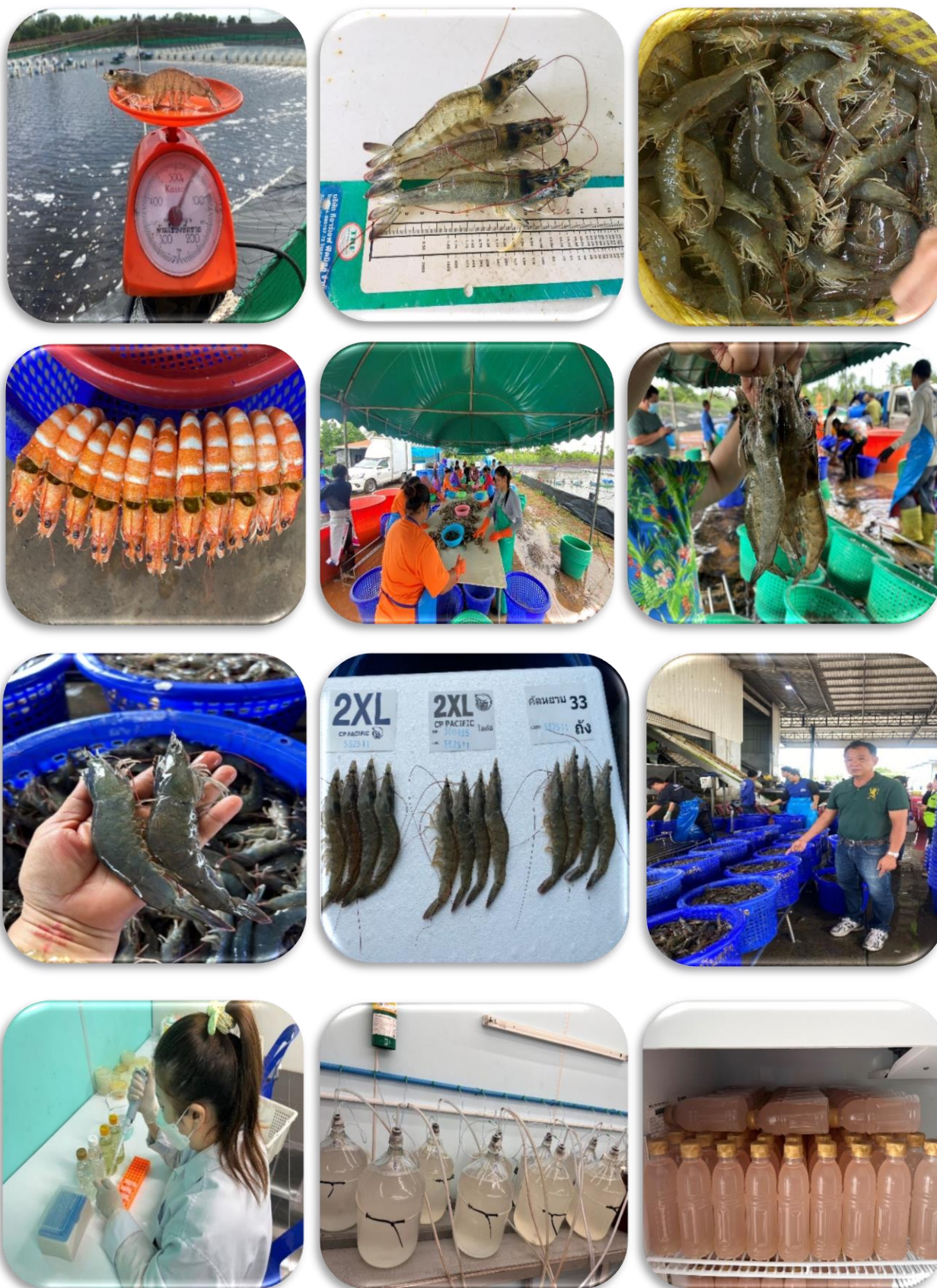
- ☐ 1) จำหน่ายโดยเสรี
- ☐ 2) จำหน่ายให้เจ้าประจำโดยมีข้อผูกพัน
- ☐ ซื้อปัจจัยการผลิตราคาถูก/ให้เครดิต (อาหารกุ้ง, ลูกพันธุ์, ยา)
 - ☐ มีการประกันราคาผลผลิต

3.8 จำนวนผลผลิตทั้งหมด

เฉลี่ย.....กก./ปี



ภาพภาคผนวกที่ 1 รูปแบบของการจัดการบ่อเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในพื้นที่ความเค็มต่ำ และการนำจุลินทรีย์ที่แยกได้จากในพื้นที่ไปใช้ประโยชน์ในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม จังหวัดฉะเชิงเทรา (ที่มาของภาพ: นายชาลี จิตรประสงค์ เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งจังหวัดฉะเชิงเทรา)



ภาพภาคผนวกที่ 2 ผลผลิตกุ้งของฟาร์มเกษตรกรในจังหวัดฉะเชิงเทราที่มีเลี้ยงกุ้งโดยใช้จุลินทรีย์กลุ่มวิสาหกิจชุมชน
ชมรมผู้เลี้ยงกุ้งจังหวัดฉะเชิงเทราที่แยกได้จากพื้นที่ฉะเชิงเทราในระบบการเลี้ยงทั้งระบบ

ภาคผนวกที่ 2

หลักเกณฑ์การขึ้นทะเบียนผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ปรับสภาพน้ำที่ใช้ทางการประมง

ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์จัดเป็นวัตถุอันตรายชนิดที่ 2 ตามบัญชีแนบท้ายประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม เรื่องบัญชีรายชื่อวัตถุอันตราย พ.ศ. 2556 บัญชี 2.3 รายชื่อกลุ่มผลิตภัณฑ์ควบคุม ลำดับที่ 1 ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ สำหรับปรับสภาพน้ำ หรือที่สร้างขึ้นเพื่อป้องกัน กำจัด ทำลาย หรือควบคุมจุลินทรีย์ ประสิต พืช หรือสัตว์อื่นในบ่อเลี้ยง สัตว์น้ำ ผู้นำเข้าหรือผู้ผลิตจะต้องดำเนินการขอขึ้นทะเบียนวัตถุอันตรายกับกรมประมงก่อนดำเนินการ ซึ่งกรม ประมง ได้จัดทำคู่มือประชาชนเรื่องการขึ้นทะเบียนวัตถุอันตรายทางการประมงเพื่อเผยแพร่ประชาสัมพันธ์ช่องทางการยื่นคำขอ ขั้นตอนวิธีการ และระยะเวลาดำเนินการของการรับขึ้นทะเบียนวัตถุอันตรายและการออกไปสำคัญ การขึ้นทะเบียนซึ่งต้องปฏิบัติตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง การขึ้นทะเบียนวัตถุอันตราย การออกไปสำคัญและการต่ออายุใบสำคัญการขึ้นทะเบียนวัตถุอันตรายที่กรมประมงเป็นผู้รับผิดชอบ พ.ศ. 2551

การขอขึ้นทะเบียนผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์กับกรมประมงให้ใช้แบบคำขอขึ้นทะเบียน วอ.กษ./กปม.1 สำหรับ รายละเอียดข้อมูล หรือเอกสารที่ใช้ประกอบการขอขึ้นทะเบียนให้ปฏิบัติตามหลักเกณฑ์ ดังนี้

1. รายงานผลการวิเคราะห์ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ ประกอบด้วย

1.1) หนังสือรับรองชนิด (species) ของจุลินทรีย์ที่เป็นสารสำคัญในผลิตภัณฑ์ โดยชนิดของจุลินทรีย์ต้อง ตรงตาม ที่ระบุในผลิตภัณฑ์ที่ขอขึ้นทะเบียน

1.2) หนังสือรับรองปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (total plate count) หน่วยเป็น cfu/g หรือ cfu/ml โดยผลการวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดต้องได้ไม่น้อยกว่าที่ขอขึ้นทะเบียน

1.3) หนังสือรับรองการปนเปื้อนของยีสต์และราในผลิตภัณฑ์ โดยผลิตภัณฑ์ต้องมียีสต์ปนเปื้อน ไม่เกิน 10 cfu/g หรือ cfu/ml และราปนเปื้อนไม่เกิน 10 cfu/g หรือ cfu/ml ยกเว้นผลิตภัณฑ์ที่มียีสต์ชนิด *Saccharomyces cerevisiae* เป็นส่วนประกอบ ให้แนบหนังสือรับรองการปนเปื้อนราในผลิตภัณฑ์ไม่เกิน 10 cfu/g หรือ cfu/ml

2. รายงานผลการทดลองประสิทธิภาพ

- เอกสารวิชาการที่ตีพิมพ์ในวารสารที่น่าเชื่อถือหรือผลการทดลองจากห้องปฏิบัติการหรือ ภาคสนามโดยหน่วยงานราชการ

- รายงานต้องแสดงถึงประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ในการลดปริมาณสารอินทรีย์รวม แอมโมเนีย และ ไนไตรท์ หรือการทดสอบหาประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อไวรัส (ถ้ามี)

- การออกแบบการทดลองต้องอยู่บนพื้นฐานทางหลักวิทยาศาสตร์ มีมาตรฐาน เชื่อถือได้ หาก รายงานฯ ไม่เป็นเช่นนั้น ทางคณะทำงานสามารถพิจารณาให้ทำการทดลองเพิ่ม หรือเสนอให้ทดลองใหม่ได้

3. ตัวอย่างฉลาก

- การแสดงข้อมูลในฉลาก ให้ระบุข้อมูลตามรายละเอียดตัวอย่างการเขียนฉลากจุลินทรีย์ที่กอง ตรวจสอบเรือประมง สินค้าสัตว์น้ำ และปัจจัยการผลิตแนะนำ

- วิธีการใช้และอัตราการใช้ต้องสอดคล้องกับรายงานผลการทดลองประสิทธิภาพ

4. หลักเกณฑ์การระบุวันล่วงอายุในฉลาก

- วันล่วงอายุให้ระบุเป็น“จำนวนเดือน”นับจากวันที่ผลิตเช่นวันล่วงอายุ 12 เดือนนับจากวันที่ผลิต
- แบบผง หรือเม็ด : เบื้องต้นอนุญาตให้ระบุวันล่วงอายุได้ไม่เกิน 6 เดือน
- แบบน้ำ : เบื้องต้นอนุญาตให้ระบุวันล่วงอายุได้ไม่เกิน 1 เดือน

5. หน่วยงานที่รับวิเคราะห์และออกหนังสือรับรอง

ให้ผู้ขอขึ้นทะเบียนวัตถุอันตราย ส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์หรือทดลองประสิทธิภาพ ตามประกาศกรมประมง เรื่อง ห้องปฏิบัติการที่ทำการตรวจวิเคราะห์วัตถุอันตรายหรือผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายเพื่อการขึ้นทะเบียน พ.ศ. 2562 ดังนี้

1) ห้องปฏิบัติการของหน่วยงานรัฐที่เป็นส่วนราชการ รัฐวิสาหกิจ องค์การมหาชน และมหาวิทยาลัย ในกำกับของรัฐ ทั้งในประเทศและต่างประเทศ

2) ห้องปฏิบัติการของหน่วยงานเอกชนผู้ให้บริการตรวจวิเคราะห์ที่ได้รับการรับรองความสามารถ ห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC: 17025 ในขอบข่ายที่เกี่ยวข้องกับการตรวจวิเคราะห์วัตถุอันตรายหรือผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายที่ขอขึ้นทะเบียนกับกรมประมง ทั้งในประเทศและต่างประเทศ

6.2 การพิจารณาขึ้นทะเบียนวัตถุอันตราย

การยื่นคำขอขึ้นทะเบียนวัตถุอันตรายและเอกสารประกอบให้ยื่น ที่กลุ่มควบคุมวัตถุอันตรายและการค้าปัจจัยการผลิต กองตรวจสอบเรือประมงสินค้าสัตว์น้ำ และปัจจัยการผลิต กรมประมง เมื่อเจ้าหน้าที่ได้รับคำขอและเอกสารหลักฐานประกอบครบถ้วนถูกต้องแล้วจึงเสนอต่อคณะทำงานเพื่อพิจารณาการขึ้นทะเบียนวัตถุอันตรายทางการประมงเพื่อให้ความเห็นประกอบการพิจารณาขึ้นทะเบียนวัตถุอันตรายต่อไป ซึ่งกระบวนการดังกล่าวใช้ระยะเวลาดำเนินการทั้งหมด 29 วันทำการ ใบสำคัญการขึ้นทะเบียนวัตถุอันตรายมีอายุ 6 ปี และคิดค่าธรรมเนียม 2,000 บาท