การคัดเลือกจุลินทรีย์คุ้นถิ่น (*Bacillus* spp.) จากฟาร์มเลี้ยงกุ้งทะเล เพื่อส่งเสริมและพัฒนาอาชีพของกลุ่มผลิตจุลินทรีย์สู่เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้ง

กัญญารัตน์ สุนทรา

ศูนย์ศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบน อันเนื่องมาจากพระราชดำริ

ตำบลคลองขุด อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี

การคัดเลือกจุลินทรีย์คุ้นถิ่น (*Bacillus* spp.) จากฟาร์มเลี้ยงกุ้งทะเล เพื่อส่งเสริมและพัฒนาอาชีพของกลุ่มผลิตจุลินทรีย์ สู่เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งอย่างยั่งยืน

กัญญารัตน์ สุนทรา

ศูนย์ศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบน อันเนื่องมาจากพระราชดำริ

ตำบลคลองขุด อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี

กิตติกรรมประกาศ

ในธรรมชาติจุลินทรีย์มีบทบาทในการลดสารอินทรีย์ ลดของเสียในดินและน้ำของบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เมื่อบ่อเพาะเลี้ยงมีปริมาณของเสียมากเกินจนจุลินทรีย์ในธรรมชาติมีปริมาณไม่เพียงพอต่อการจัดการตามแนวทางธรรมชาติบำบัด การใช้จุลินทรียที่มีประโยชน์เข้ามาช่วยในเรื่องของการปรับปรุงคุณภาพน้ำ คุณภาพดินพื้นบ่อ โดยการเพิ่มกระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์ และสารอนินทรีย์อย่างสมบูรณ์ จึงเป็นวิธีการที่จำเป็นต่อจัดการแก้ไขปัญหาสิ่งแวดล้อมในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำ เช่น การเติมจุลินทรีย์เพื่อช่วยในการย่อยสลายสิ่งขับถ่าย เศษอาหารที่หลงเหลือในบ่อ รวมถึงแอมโมเนีย ไนไตรท์ และไฮโดรเจนซัลไฟด์ ที่เป็นสารประกอบที่เป็นพิษต่อสัตว์น้ำ ให้กลายเป็นน้ำและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ส่งผลให้การสะสมสารอินทรีย์และของเสียอื่นๆ ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำลดลง นอกจากนั้นการใช้จุลินทรีย์หรือโพรไบโอติก ยังนิยมใช้เพื่อยับยั้งเชื้อก่อโรค กระตุ้นภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำ ทำให้เกิดสมดุลในระบบทางเดินอาหารและช่วยย่อยสารอาหารขนาดใหญ่ให้เป็นสารอาหารขนาดเล็ก รวมทั้งลดการใช้ยาปฏิชีวนะในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ จึงทำให้การใช้จุลินทรีย์ในการบำบัดของเสียในบ่อเลี้ยงกุ้งได้รับความนิยมจากเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้ง เนื่องจากเป็นวิธีที่ไม่ก่อให้เกิดสารเคมีตกค้าง และไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม

เอกสารฉบับนี้จัดทำขึ้นโดยรวบรวมข้อมูล องค์ความรู้จากการศึกษาวิจัย คันคว้า และพัฒนาเทคนิคต่าง ๆ มาประมวลเป็นองค์ความรู้ครบวงจรในด้านการพัฒนาจุลินทรีย์โพรไบโอติคในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ การพัฒนาจุลินทรีย์คุ้นถิ่น การจัดตั้งห้องปฏิบัติการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ และ หลักเกณฑ์การขึ้นทะเบียนผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ปรับสภาพน้ำที่ใช้ทางการประมง เพื่อส่งเสริมและพัฒนาอาชีพของกลุ่มผลิตจุลินทรีย์สู่เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งอย่างยั่งยืน เพื่อให้หน่วยงานภาครัฐ ชาวประมง เกษตรกร สมาคม ชมรมผู้เลี้ยงกุ้งทะเล ผู้ประกอบการ สถาบันการศึกษา ตลอดจนผู้สนใจ สามารถนำไปประยุกษ์ใช้ในขอบเขตงานที่กว้างขวางมากขึ้น ทำให้เอกสารเผยแพร่นี้มีการนำไปใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลาย อันเป็นอีกหนึ่งทางเลือกในการใช้จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ชนิดใหม่ๆต่อการเลี้ยงสัตว์น้ำ ลดการนำเข้าจุลินทรีย์จากต่างประเทศ และยังเป็นการสร้างอาชีพใหม่ที่จะช่วยส่งเสริมกลุ่มเกษตรกรในการรวมกลุ่มการผลิตจุลินทรีย์ให้เพียงพอต่อความต้องการใช้ในพื้นที่ เกษตรกรมีความมั่นคง ยั่งยืน และมีศักยภาพในการแข่งขัน โดยน้อมนำพระราชดำริฯ ในด้านการศึกษาทดลอง และวิจัย ของศูนย์ศึกษาการพัฒนาฯความว่า **“...ด้านหนึ่งก็เป็นจุดประสงค์ของศูนย์ศึกษา ก็เป็นสถานที่สำหรับค้นคว้า วิจัยในท้องที่ เพราะว่าแต่ละท้องที่ สภาพฝน ฟ้า อากาศ และประชาชนในท้องที่ต่าง ๆ กัน ก็มีลักษณะแตกต่างกันมากเหมือนกัน....**

(นางกัญญารัตน์ สุนทรา)
ผู้อำนวยการศูนย์ศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบน
อันเนื่องมาจากพระราชดำริ
พฤศจิกายน 2567

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	I
สารบัญ	II
สารบัญตาราง	IV
สารบัญภาพ	V
บทสรุปเนื้อหา	VI
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 จุลชีววิทยาของแบคทีเรียกลุ่มบาซิลัส (*Bacillus* spp.)	3
2.1 การจำแนกทางอนุกรมวิธาน	3
2.2 นิเวศวิทยาของ *Bacillus* spp.	3
2.3 สารที่แบคทีเรีย *Bacillus* spp. สามารถผลิตได้	4
2.4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย *Bacillus* spp.	4
2.5 คุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *Bacillus* spp.	6
2.6 การตรวจสอบลักษณะของเซลล์ และการย้อมแกรมจุลินทรีย์	7
2.7 ความสำคัญของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	9
บทที่ 3 การพัฒนาจุลินทรีย์โพรไบโอติคในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	11
3.1 ประวัติการใช้โพรไบโอติคในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	11
3.2 การประยุกต์ใช้โพรไบโอติกเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในปัจจุบัน	12
3.3 ประโยชน์ของโพรไบโอติกเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในปัจจุบัน	13
3.4 การใช้โพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลในภาคตะวันออกของประเทศไทย	16
3.5 การใช้โพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในต่างประเทศ	17
3.6 อนาคตของโพรไบโอติกสำหรับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในประเทศไทย	18
บทที่ 4 การพัฒนาจุลินทรีย์คุ้นถิ่น	19
4.1 การเก็บตัวอย่างดินและการเตรียมเชื้อจุลินทรีย์	19
4.2 ศึกษาสัณฐานวิทยาภายนอกของจุลินทรีย์	20
4.3 การเตรียมสไลด์จุลินทรีย์	20
4.4 วิธีการย้อมแกรมเซลล์จุลินทรีย์	20

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.5 การระบุสายพันธุ์เชื้อด้วยวิธี 16S rRNA gene 20

4.6 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* (Vp_{AHPND}) 20

4.7 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์บาซิลลัสชนิดที่แยกได้จากดินพื้นบ่อเลี้ยงกุ้ง 21

4.8 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์บาซิลลัส 21

4.9 ศึกษาประสิทธิภาพในการครอบครองเชื้อ VpAHPND ของจุลินทรีย์ด้วยวิธี Co – culture System 21

4.10 คัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยสลายสารอินทรีย์ผลิตเป็นจุลินทรีย์ผง 22

4.11 การเตรียมวัสดุรองรับขั้นตอนการผลิตจุลินทรีย์ผง 22

4.12 การตรวจนับสปอร์ของจุลินทรีย์ชนิดผง 24

4.13 การทดสอบระยะเวลาความคงตัวของเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ 24

4.14 การตรวจวิเคราะห์และทดสอบสารสำคัญในผลิตภัณฑ์ 24

4.15 การทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์บาซิลลัสในการควบคุมสารอินทรีย์ที่เป็นของเสียจากสิ่งขับถ่ายของกุ้งที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการ 26

บทที่ 5 การจัดตั้งห้องปฏิบัติการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ 29

5.1 คุณลักษณะของเครื่องมือ และวัสดุอุปกรณ์ในการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ 29

5.2 การผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ สูตรน้ำ 33

5.3 การตรวจสอบปริมาณหัวเชื้อจุลินทรีย์ 39

5.4 การตรวจสอบปริมาณสปอร์ของหัวเชื้อจุลินทรีย์ ปม.2 40

5.5 การนำจุลินทร์ที่ขยายแล้วไปใช้ประโยชน์ 41

5.6 การนำน้ำขยายหัวเชื้อจุลินทรีย์ (BS,BM,BL) มาใช้งาน 42

5.7 การใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อบำบัดคุณภาพน้ำและดิน สูตรของกรมประมง 43

5.8 การใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์เพื่อบำบัดคุณภาพน้ำและดิน สูตรของชมรมผู้เลี้ยงกุ้ง 44

บทที่ 6 การขึ้นทะเบียนวัตถุอันตรายประเภทที่ 2 48

6.1 หลักเกณฑ์การขึ้นทะเบียนผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ปรับสภาพน้ำที่ใช้ทางการประมง 48

6.2 การพิจารณารับขึ้นทะเบียนวัตถุอันตราย 49

เอกสารอ้างอิง 55

ภาคผนวก 59

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	สัณฐานวิทยาภายนอกของจุลินทรีย์ทั้ง 6 ชนิด	9
2	โพรไบโอติกและการใช้โพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชนิดต่างๆ	12
3	ชนิดของโพรไบโอติกเพื่อควบคุมคุณภาพน้ำในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชนิดต่างๆ	16
4	รายชื่อห้องปฏิบัติการที่ทำการตรวจวิเคราะห์วัตถุอันตรายเพื่อการขึ้นทะเบียนในการกำกับของรัฐ	52

ตารางผนวกที่		หน้า
1	รายชื่อวัตถุอันตรายประเภทที่ 2 ที่ขึ้นทะเบียนกับกรมประมง	59

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะของโคโลนีของจุลินทรีย์ที่ตรวจพบจากตัวอย่างดิน	6
2	ลักษณะรูปร่างของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่ย้อมแกรมจุลินทรีย์กำลังขยาย 1,000 เท่า	8
3	ลักษณะบ่อเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมของเกษตรกรที่สุ่มเก็บตัวอย่างดิน	19
4	ขั้นตอนการผลิตจุลินทรีย์ผง	22
5	ขั้นตอนการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ชนิดผง	23
6	ผลผลิตกุ้งของฟาร์มเกษตรกรในจังหวัดฉะเชิงเทราที่มีการเลี้ยงกุ้งโดยใช้จุลินทรีย์จากชมรมผู้เลี้ยงกุ้งจังหวัดฉะเชิงเทราที่แยกได้จากพื้นที่ฉะเชิงเทราในระบบการเลี้ยง	47
7	กระบวนการออกหนังสือการขึ้นทะเบียนวัตถุอันตรายที่กรมประมงรับผิดชอบผ่านระบบ HAZDOF	50
8	การขึ้นทะเบียนวัตถุอันตรายของกรมประมง	50

บทสรุปเนื้อหา

เอกสารฉบับนี้จัดทำขึ้นโดยรวบรวมข้อมูลความรู้จากการศึกษาค้นคว้า วิจัย และพัฒนาเทคนิคต่าง ๆ ในการคัดเลือกจุลินทรีย์คุ้นถิ่น (*Bacillus* spp.) จากฟาร์มเลี้ยงกุ้งทะเลเพื่อส่งเสริมและพัฒนาอาชีพของกลุ่มผลิตจุลินทรีย์สู่เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งอย่างยั่งยืน ในเอกสารฉบับนี้มีเนื้อหาทั้งหมด 6 บท มีรายละเอียดในเนื้อหาดังนี้

บทที่ 1 บทนำ เป็นการกล่าวถึงแหล่งเลี้ยงกุ้งทะเลในพื้นที่แนวชายฝั่งทะเล ปัญหาความเสื่อมโทรมของสิ่งแวดล้อมที่เกิดขึ้นจากการเลี้ยงกุ้ง ทำความรู้จักกับจุลินทรีย์และโพรไบโอติกที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ การใช้จุลินทรียที่มีประโยชน์ รวมถึงวิธีการคัดเลือกจุลินทรีย์คุ้นถิ่นกลุ่ม *Bacillus* spp. จากฟาร์มเลี้ยงกุ้งทะเล

บทที่2 มีเนื้อหาในด้านจุลชีววิทยาของแบคทีเรียกลุ่มบาซิลัส (*Bacillus* spp.) การจำแนกทางอนุกรมวิธาน และนิเวศวิทยาของ *Bacillus* spp. สารที่แบคทีเรีย *Bacillus* spp. สามารถผลิตได้เป็นเอนไซม์ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ลักษณะของโคโลนีของจุลินทรีย์ที่ตรวจพบจากตัวอย่างดิน คุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *Bacillus* spp. การตรวจสอบลักษณะของเซลล์ การย้อมแกรมจุลินทรีย์ หลักเกณฑ์ในการย้อมแกรม ลักษณะรูปร่างของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่ย้อมแกรมจุลินทรีย์ และความสำคัญของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

บทที่ 3 เป็นการพัฒนาจุลินทรีย์โพรไบโอติคในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยเริ่มจากประวัติการใช้โพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชนิดต่างๆ การประยุกต์ใช้โพรไบโอติกเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในปัจจุบัน การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในน้ำ และการผสมในอาหารสัตว์น้ำ ชนิดของโพรไบโอติกที่ใช้เพื่อควบคุมคุณภาพน้ำในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชนิดต่างๆ การใช้โพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลในภาคตะวันออกของประเทศไทย การใช้โพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในต่างประเทศ และอนาคตของโพรไบโอติกสำหรับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในประเทศไทย

บทที่ 4 การพัฒนาจุลินทรีย์คุ้นถิ่น จะต้องศึกษาขั้นตอนในการดำเนินการที่ถูกต้องตามหลักวิชาการตั้งแต่วิธีการเก็บตัวอย่างดิน และการเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ การศึกษาสัณฐานวิทยาภายนอกของจุลินทรีย์ วิธีการย้อมแกรมเซลล์จุลินทรีย์ การระบุสายพันธุ์เชื้อด้วยวิธี 16S rRNA gene การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* (*Vp*$_{AHPND}$) การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์บาซิลลัสชนิดที่แยกได้จากดินพื้นบ่อเลี้ยงกุ้ง การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์บาซิลลัส ศึกษาประสิทธิภาพในการครอบครองเชื้อ Vp$_{AHPND}$ ของจุลินทรีย์ด้วยวิธี Co – culture system การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยสลายสารอินทรีย์ ผลิตเป็นผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ชนิดผง ขั้นตอนการผลิตจุลินทรีย์ผง การตรวจนับสปอร์ของจุลินทรีย์ชนิดผง การทดสอบระยะเวลาความคงตัวของเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ การตรวจวิเคราะห์และทดสอบสารสำคัญของหัวเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ โดยเริ่มจากการเตรียมตัวอย่างหัวเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ การตรวจนับปริมาณแบคทีเรีย การตรวจนับปริมาณเชื้อ *Bacillus* spp. การตรวจสอบการปนเปื้อนของยีสต์และรา การระบุสาย

พันธุ์เชื้อด้วยวิธี 16S rRNA gen การเตรียมตัวอย่างเชื้อบาซิลลัสที่ทดสอบ การทดสอบการยับยั้งเชื้อด้วยวิธี Agar well diffusion assay และการทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์บาซิลลัสในการควบคุมสารอินทรีย์ที่เป็นของเสียจากสิ่งขับถ่ายของกุ้งที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

บทที่ 5 การจัดตั้งห้องปฏิบัติการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ ในการจัดตั้งห้องปฏิบัติการต้องมีเครื่องมือ อุปกรณ์ และวิธีการที่เหมาะสมตามหลักวิชาการจึงจะสามารถจัดตั้งห้องปฏิบัติการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเริ่มจากการกำหนดคุณลักษณะของเครื่องมือ และวัสดุอุปกรณ์ในการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ ขั้นตอนการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์สูตรน้ำ การตรวจสอบปริมาณหัวเชื้อจุลินทรีย์ การตรวจสอบปริมาณสปอร์ของหัวเชื้อจุลินทรีย์ การนำจุลินทร์ที่ขยายแล้วไปใช้ประโยชน์ การนำน้ำขยายหัวเชื้อจุลินทรีย์มาใช้งาน การใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์เพื่อบำบัดคุณภาพน้ำและดินในสูตรของกรมประมง การใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์เพื่อบำบัดคุณภาพน้ำและดิน สูตรของชมรม สมาคมต่างๆรวมถึงสูตรจากเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้ง เพื่อนำหัวเชื้อจุลินทรีย์มาใช้ประโยชน์ต่อการเลี้ยงสัตว์น้ำให้มีประสิทธิภาพสูงสุด

บทที่ 6 การขึ้นทะเบียนวัตถุอันตรายประเภทที่ 2 เมื่อมีการผลิตจุลินทรีย์มาใช้ประโยชน์แล้ว สมาคม ชมรม หรือกลุ่มเกษตรกรจะนำจุลินทรีย์ที่ผลิตมาได้ออกจำหน่ายเพื่อประโยขน์ทางการค้า ต้องขึ้นทะเบียนวัตถุอันตรายประเภทที่2 กับกรมประมงซึ่งต้องเข้าใจในหลักเกณฑ์การขึ้นทะเบียนผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ปรับสภาพน้ำที่ใช้ทางการประมง หน่วยงานที่รับวิเคราะห์และออกหนังสือรับรอง การพิจารณารับขึ้นทะเบียนวัตถุอันตราย กระบวนการออกหนังสือการขึ้นทะเบียนวัตถุอันตรายที่กรมประมงรับผิดชอบผ่านระบบ HAZDOF การรายงานผลการวิเคราะห์ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ รายงานประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ในการลดปริมาณสารอินทรีย์ หรือการทดสอบหาประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อวิบริโอ (ถ้ามี) การแสดงข้อมูลในฉลาก หลักเกณฑ์การระบุวันล่วงอายุในฉลาก และในเอกสารฉบับนี้รวบรวมรายชื่อห้องปฏิบัติการที่ทำการตรวจวิเคราะห์วัตถุอันตรายเพื่อการขึ้นทะเบียนในการกำกับของรัฐ ให้แก่ผู้ต้องการขึ้นทะเบียนวัตถุอันตรายประเภทที่ 2 ไปขอรับบริการตรวจวิเคราะห์ตามข้อกำหนดของกรมประมง นอกจากนี้ในตารางผนวกที่ 1 จะแสดงรายชื่อวัตถุ บริษัทที่ขออนุญาต และรายละเอียดที่เกี่ยวข้องกับการขออนุญาตและผ่านการขึ้นทะเบียนวัตถุอันตรายประเภทที่ 2 ที่ขึ้นทะเบียนกับกรมประมง

การคัดเลือกจุลินทรีย์คุ้นถิ่น (*Bacillus* spp.) จากฟาร์มเลี้ยงกุ้งทะเล เพื่อส่งเสริมและพัฒนาอาชีพของกลุ่มผลิตจุลินทรีย์ สู่เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งอย่างยั่งยืน

บทที่ 1 บทนำ

เมื่อย้อนไปในปี 2548 จังหวัดแนวชายฝั่งทะเล เช่น ระยอง ฉะเชิงเทรา เพชรบุรี สมุทรสงคราม สมุทรสาคร นครศรีธรรมราช ชุมพร กระบี่ และพังงา เป็นแหล่งเลี้ยงกุ้งทะเลที่ทำรายได้เข้าประเทศไม่ต่ำกว่า 60,000 ล้านบาท คิดเป็นปริมาณ 360,000 เมตริกตัน/ปี เกิดการกระจายรายได้สู่เกษตรกรกว่า 33,000 ครัวเรือน (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2548) จากสถิติการออกหนังสือกำกับการซื้อขายสัตว์น้ำของกรมประมงในปี 2565 ไทยได้มีการผลิตกุ้งขาวแวนาไมประมาณ 2.4 แสนตัน มีพื้นที่เพาะเลี้ยงทั่วประทศกว่า 2.7 แสนไร่ และมีจำนวนฟาร์ม 22,336 แห่ง ผลผลิตส่วนใหญ่มาจากภาคใต้ (ร้อยละ 62.34 ของผลผลิตทั้งประเทศ รองลงมา คือ ภาคตะวันออก (ร้อยละ 25.06) และภาคกลาง (ร้อยละ 12.60) เห็นได้ว่าการผลิตกุ้งของประเทศไทยถดถอยลงไปตามลำดับ ในปี 2566 ภาครัฐไทยกำหนดเป้าหมายเพิ่มผลผลิตกุ้งทะเลให้ได้ถึง 4 แสนตัน และให้ความสำคัญกับการแก้ไขปัญหาโรคระบาด การปรับเปลี่ยนรูปแบบการเลี้ยงที่มีการตรวจพบยาปฏิชีวนะตกค้างเป็นส่งเสริมให้มีการเลี้ยงในแนวทางชีวภาพ การใช้จุลินทรีย์เพื่อบำบัดสารอินทรีย์ และใช้เป็นโพรไบโอติกเพิ่มมากขึ้น

นอกจากนี้เกษตรกรยังให้ความสำคัญกับปัญหาความเสื่อมโทรมของสิ่งแวดล้อมที่เกิดขึ้นจากการเลี้ยงกุ้ง และนับเป็นปัญหาใหญ่ที่ควรได้รับการแก้ไข โดยเฉพาะการใช้ยาและสารเคมีในการเลี้ยงกุ้งทะเล การสะสมของเสียภายในบ่อเลี้ยงกุ้งที่ส่งผลให้คุณภาพน้ำเปลี่ยนแปลงไปสู่ระดับไม่เหมาะสม ทำให้อัตราการเจริญเติบโตและอัตรารอดของกุ้งลดลง นอกจากนี้การปล่อยน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งที่มีของเสียลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมในแหล่งเลี้ยงเพราะของเสียในบ่อกุ้งมีปริมาณบีโอดี (Biochemical Oxygen Demand : BOD) ปริมาณของแข็งแขวนลอยทั้งหมด (Total Suspended Solid : TSS) และมีปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนสูง มีผลต่อความเป็นพิษของสัตว์น้ำในธรรมชาติ (ประจวบ, 2527) ผลจากการเพาะเลี้ยงแบบพัฒนา การปล่อยสัตว์น้ำในอัตราความหนาแน่นสูง รวมถึงการเร่งรอบการผลิตและการจัดการระหว่างเลี้ยงไม่เหมาะสม ทำให้แหล่งน้ำที่รองรับน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงเสื่อมโทรมลง มีการสะสมของเชื้อก่อโรค รวมทั้งสารพิษชนิดต่างๆ การสะสมของเลนที่มาจากการเพาะเลี้ยง ซึ่งส่งผลกระทบย้อนกลับมาสู่การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในครั้งต่อไปที่ต้องใช้น้ำจากแหล่งน้ำที่อยู่รอบฟาร์มเลี้ยงนั้นอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้

ในธรรมชาติจุลินทรีย์มีบทบาทในการลดสารอินทรีย์ ลดของเสียในดินและน้ำของบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เมื่อบ่อเพาะเลี้ยงมีปริมาณของเสียมากเกินไปจนจุลินทรีย์ธรรมชาติมีปริมาณไม่เพียงพอต่อการจัดการตามแนวทางธรรมชาติบำบัด การใช้จุลินทรียที่มีประโยชน์เข้ามาช่วยในเรื่องของการปรับปรุงคุณภาพน้ำ คุณภาพดินพื้นบ่อ โดยการเพิ่มกระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์ และสารอนินทรีย์อย่างสมบูรณ์จึงเป็นวิธีการที่จำเป็นต่อจัดการแก้ไขปัญหาสิ่งแวดล้อมในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำ เช่น การเติมจุลินทรีย์ช่วยย่อยสลายสิ่งขับถ่ายเศษอาหารที่หลงเหลือในบ่อรวมถึงแอมโมเนีย ไนไตรท์ และไฮโดรเจนซัลไฟด์ ที่เป็นสารประกอบที่เป็นพิษต่อ

สัตว์น้ำให้กลายเป็นน้ำและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ส่งผลให้การสะสมสารอินทรีย์และของเสียอื่นๆ ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำลดลง (Gatessoupe, 1999; Shariff *et al*., 2001) นอกจากนั้นการใช้จุลินทรีย์หรือโพรไบโอติก ยังนิยมใช้เพื่อยับยั้งเชื้อก่อโรค กระตุ้นภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำ ทำให้เกิดสมดุลในระบบทางเดินอาหารและช่วยย่อยสารอาหารขนาดใหญ่ให้เป็นสารอาหารขนาดเล็ก รวมทั้งลดการใช้ยาปฏิชีวนะในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ จึงทำให้การใช้จุลินทรีย์ในการบำบัดของเสียในบ่อเลี้ยงกุ้งได้รับความนิยมจากเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งทะเล เนื่องจากเป็นวิธีที่ไม่ก่อให้เกิดสารเคมีตกค้างและไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์ที่มีการขายอยู่ในท้องตลาดส่วนใหญ่เป็นจุลินทรีย์ที่นำเข้าจากต่างประเทศ ส่งผลให้ประเทศไทยสูญเสียเงินตราจากการนำเข้าแบคทีเรียหรือจุลินทรีย์เป็นจำนวนมาก และมีความพยายามหลากหลายวิธีในการจัดการที่จะช่วยให้การเพาะเลี้ยงเป็นไปอย่างยั่งยืนและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ดังนั้นถ้ามีการคัดเลือกจุลินทรีย์ในประเทศ เช่น คัดเลือกในพื้นที่ที่มีการเลี้ยงกุ้งทะเลจำนวนมาก และทดสอบประสิทธิภาพในการเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติก จุลินทรีย์ที่เหมาะสมเหล่านี้สามารถนำมาใช้เป็นจุลินทรีย์คุ้นถิ่นที่มีประสิทธิภาพในการจัดการของเสียในสภาพแวดล้อมบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลของประเทศไทย และมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอินทรีย์หรือช่วยเป็นโพรไบโอติกได้ดีกว่าจุลินทรีย์ที่นำเข้ามาจากต่างประเทศที่อาจปรับตัวเข้ากับบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของไทยได้ช้ากว่า สามารถช่วยลดการนำเข้าสินค้าจุลินทรีย์ที่ผลิตจากต่างประเทศได้มากขึ้น ดังนั้นเพื่อให้เกษตรกรเกิดความเข้าใจเกี่ยวกับจุลินทรีย์หรือโพรไบโอติกเพิ่มมากขึ้นจึงได้จัดทำคู่มือการคัดเลือกจุลินทรีย์คุ้นถิ่น (*Bacillus* spp.) จากฟาร์มเลี้ยงกุ้งทะเล

คู่มือเล่มนี้มีวัตถุประสงค์ในการรวบรวมองค์ความรู้ที่มีอยู่ในกรมประมง เผยแพร่ให้เกษตรกรหรือผู้ที่สนใจ ทำความรู้จักกับจุลินทรีย์และโพรไบโอติกที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ รวมถึงแนะนำวิธีการคัดเลือกจุลินทรีย์คุ้นถิ่นกลุ่มบาซิลลัส (*Bacillus* spp.) จากฟาร์มเลี้ยงกุ้งทะเล เพื่อส่งเสริมและพัฒนาอาชีพของกลุ่มผลิตจุลินทรีย์สู่เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งอย่างยั่งยืน ต่อไป

บทที่ 2 จุลชีววิทยาของแบคทีเรียกลุ่มบาซิลัส (*Bacillus* spp.)

แบคทีเรียBacillus เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีรูปร่างเป็นแท่ง สร้างเอนโดสปอร์ได้ทั้งแบบใช้ออกซิเจนและแบบไม่ใช้ออกซิเจน ในบางสายพันธุ์อาจกลายเป็นแบคทีเรียแกรมลบได้เมื่ออายุมากขึ้น แบคทีเรียหลายชนิดในสกุลนี้มีความสามารถทางสรีรวิทยาที่หลากหลาย ซึ่งทำให้พวกมันสามารถดำรงชีวิตอยู่ในสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติได้ทุกชนิด โดยเซลล์หนึ่งเซลล์จะสร้างเอนโดสปอร์ได้เพียงชนิดเดียว สปอร์ของแบคทีเรียเหล่านี้ทนทานต่อความร้อน ความเย็น รังสี การทำให้แห้ง และสารฆ่าเชื้อ แบคทีเรีย *Bacillus บางชนิด เช่น B.anthracis* ต้องการออกซิเจนเพื่อสร้างสปอร์ ข้อจำกัดนี้ส่งผลสำคัญต่อระบาดวิทยาและการควบคุม ในร่างกาย แบคทีเรีย *B. anthracis* สร้างแคปซูลโพลีเปปไทด์ (กรดโพลีกลูตามิก) ที่ปกป้องไม่ให้ถูกฟาโกไซโทซิส แบคทีเรียสกุล Bacillus และ Clostridium ประกอบกันเป็นวงศ์ Bacillaceae สายพันธุ์ต่างๆ จะถูกระบุโดยใช้เกณฑ์ทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี

2.1 การจำแนกทางอนุกรมวิธาน

แบคทีเรีย *Bacillus* spp. จัดอยู่ใน Domain : Bacteria

Division : Firmicutes

Class : Bacilli

Order : Bacillales

Family : Bacillaceae

Genus : Bacillus

2.2 นิเวศวิทยาของ *Bacillus* spp.

Bacillus spp. พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ดิน น้ำ อากาศ ฝุ่น พืช เศษซากพืชหรือแม้แต่ในอาหาร นม และธัญญาหาร (Claus and Berkeley, 1986) พบได้ทุกสภาพแวดล้อม เพราะสปอร์ที่แบคทีเรียสร้างทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ สภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันทำให้ชนิดของ *Bacillus* spp. มีความหลากหลาย เช่น พวกที่ต้องการออกซิเจน (Aerobes) ไม่ต้องการออกซิเจนเป็นบางช่วง (Facultative anaerobes) เจริญได้ในสภาพกรด (Acidophiles) สภาพด่าง (Alkalophiles) เจริญได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ (Psychrophiles) อุณหภูมิสูง (Thermophiles) สภาพที่มีความเค็ม (Halophiles) และพวกที่ใช้สารเคมีอนินทรีย์ในการเจริญ (Chemolithotrophs) ส่วนใหญ่เป็นพวกที่เจริญอยู่ในดินแต่บางครั้งพบ *B. subtilis* และ *B. licheniformis* อยู่ในน้ำทะเลและน้ำกร่อย (Rosovitz *et al*., 1998) *Bacillus* spp. ที่พบจะแตกต่างกันตามชนิดของดิน เช่น *B. subtilis B. licheniformis* และ *B. cereus* ไม่ต้องการสารประกอบในอาหารมากนัก สามารถพบได้ในดินที่มีธาตุอาหารต่ำ *B. polymyxa* และ *B. azotofixans* พบในดินรอบๆรากพืชที่มีธาตุอาหาร ส่วน *B.macerans* และ *B. circulans* ต้องการสารประกอบอาหารที่ซับซ้อนและพบในเศษซากพืชที่ย่อยสลาย (Rosovitz *et al*., 1998) แบคทีเรีย *B. licheniformis B. subtilis* และ *B. pumilus* พบในน้ำทะเลที่สะอาด

Bacillus spp. หลายชนิดสามารถเจริญได้แม้ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น *B. pasteurii* พบในสภาพแวดล้อมที่มียูเรียสูง

2.3 สารที่แบคทีเรีย *Bacillus* spp. สามารถผลิตได้

สารที่แบคทีเรีย *Bacillus* spp. สามารถผลิตได้เป็นเอนไซม์มีหลายชนิด ได้แก่ เอนไซม์ไคติเนส (Chitinase) เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม Hydrolase ซึ่งจะย่อยสลายไคตินให้ได้เป็น N-acetyglucosamine อิสระโดยเอมไซม์ chitinase มีชื่อทางเคมีว่า poly-β1,4-(2-acetamido-2-deoxy)-D-glucoside glycanohydrolase : E.C. 3.2.1.14) ซึ่งจะตัดสายยาวของ N-acetyglucosamine ตรงตำแหน่ง β ภายในสายยาว โดยตัดแบบสุ่ม ซึ่งจะได้เส้นสายสั้นๆของ N-acetyglucosamine ไคโตไบเอส (Chitobiase) มีชื่อทางเคมี Chitobiose และ Chitotriose ให้ได้เป็น N-acetyglucosamine อิสระ ประเภทของเอนไซม์ย่อยไคตินมี 2 ประเภท คือ Endo-chitinase ซึ่งเป็นสายโซ่ของ N-acetyglucosaminidase และ Exo-chitinase

1) Endo-chitinase เป็นเอนไซม์ที่ย่อยแบบสุ่มในสายโซ่ของน้ำตาล N-cacetylglucosamine ซึ่งจะได้ Diacetylchitobiose เป็นผลิตผลหลักและได้ Triacetylchitotriose เป็นส่วนน้อย

2) N-acetyglucosaminidase เป็นเอนไซม์ที่ย่อย Diacetylchitobiose โดยที่บางเอนไซม์จะย่อยหน่วยของ N-acetyglucosaminidase จากปลายด้าน Non-reducing ของสายโซ่ไคติน

3) Exo-chitinase เป็นเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการแตกตัว ของ Diacetylchitobiose จากปลาย Non-reducing ของสายโซ่ไคติน Flach *et al*., (1992) ได้แบ่งประเภทของเอนไซม์ย่อยไคตินไว้ 4 ชนิด คือ

- Endochitinase เป็นเอนไซม์ที่ทำให้สายโพลิเมอร์แยกออกจากกัน
- Exochitinase เป็นเอนไซม์ที่ย่อยไคตินแล้วได้Chitobiose
- β-N-acetylglucosaminidase เป็นเอนไซม์ที่ย่อยภายในสายไคตินได้ N-acetyicosamine
- Chitiobiase เป็นเอนไซม์ที่ย่อย Chitobiose ได้ N-acetylglucosamine

Jeuniaux (1996) ได้รายงานว่า การย่อยไคตินโดยเอนไซม์ 2 ชนิด เพื่อให้ได้ N-acetylglucosamine ได้เกิดขึ้นจากการย่อยภายใน 2 กระบวนการต่อเนื่องกัน โดยเอนไซม์ 2 ชนิด ชนิดแรก คือ เอนไซม์chitinase (poly-β-1,4-(2-acetamido-2-deoxy)-d-glucoside glycanohydolase) จะย่อยไคตินหรือโพลิเมอร์ของ N-acetylglucosamine และรวมทั้งจะย่อยTetramer ให้ได้เป็นผลิตผลที่มีขนาดเล็กกว่า Trimer และ ชนิดที่ 2 คือเอนไซม์ Chitobiase (Chitobiase acetabidodeoxy-glycohydolase) ซึ่งจะย่อย Chitobiose และ Chitotriose แล้วได้ N-acetylglucosamine

2.4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย *Bacillus* spp.

แบคทีเรียกลุ่มบาซิลัส (*Bacillus* spp.) มีความหลากหลายทางลักษณะสัณฐานวิทยา และสรีรวิทยา ลักษณะโคโลนีมีความแปรปรวนมากขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม คุณภาพและปริมาณของอาหารเลี้ยง

เชื้ออายุโคโลนี และจำนวนโคโลนีต่อจานอาหารที่เลี้ยงมีผลต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี ดังนั้นจึงเป็นการยากในการแยกชนิดด้วยลักษณะโคโลนี อย่างไรก็ตามในสภาพแวดล้อมเดียวกันลักษณะโคโลนีสามารถใช้ในการจำแนกชนิดได้ เช่น เมื่อเลี้ยงในอาหาร Casein agar แบคทีเรีย *B. megaterium* ให้โคโลนีมีสีเหลือง แบคทีเรีย *B. firmus* ให้โคโลนีสีชมพู แบคทีเรีย *B. licheniformis* ให้โคโลนีสีแดงถึงน้ำตาล แบคทีเรีย *B. pumilus* ให้โคโลนีสีเหลืองอ่อน แบคทีเรีย *B. sphaericus* ให้โคโลนีสีชมพูและแบคทีเรีย *B. subtilis* ให้โคโลนีสีชมพูเหลืองส้ม หรือน้ำตาล ในอาหารที่มีคาร์โบไฮเดรต แบคทีเรีย *B.subtilis var. aterrimus* ให้โคโลนีสีน้ำเงินถึงดำ เมื่อเลี้ยงบนอาหาร Tyrosine agar แบคทีเรีย *B. megaterium* และ *B. subtilis* var.niger ให้โคโลนีมีสีดำ เป็นต้น เซลล์ของแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ประกอบด้วย Cytoplasmic membrane และ Cell wall ในบางสายพันธุ์เซลล์ของ *Bacillus* spp. ไม่มีชั้น Outer membranes ซึ่งต่างจากแบคทีเรียแกรมลบ ส่วน Cell wall ประกอบด้วย Peptidoglycan หลายชั้น Anionic polymers ทำให้ผนังเซลล์มีความเหนียว บริเวณผิวหน้าของ Cell wall เป็นชั้นของ Paracrystalline cell wall surface layers (S layers) ประกอบด้วยโปรตีนหรือ Glycoprotein แบคทีเรีย *Bacillus* spp. หลายชนิดสร้าง Carbohydrate capsules เช่น Poly-D-glutamic acid capsule สร้างโดย *B. anthracis* ทั้งในห้องปฏิบัติการและในสภาพธรรมชาติซึ่งเป็นการแสดงออกของ Virulence factor (Rosovitz *et al*., 1998) *Bacillus* spp. ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลา แบบ Peritrichous flagella และการใช้แฟลกเจลลาเป็น Antigens มีประโยชน์ในการตรวจจำแนก *B. cereus, B. thuringiensis* และ *B. sphaericus* (Turnbull *et al*., 1990)

แบคทีเรียสกุล Bacillus สร้างสปอร์ภายในเซลล์เมื่ออาหารมีจำกัดเซลล์จะเข้าสู่ระยะ Stationary phase และอยู่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ทำให้สามารถทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ เช่น ความร้อน แสงยูวี และสารเคมีต่างๆ บางเซลล์อาจมีแวคิวโอล บางชนิดอาจพบผลึกโปรตีน เช่น *B. thuringiensis* (Rosovitz *et al*., 1998) รูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสปอร์และตำแหน่งการสร้างสปอร์ภายในเซลล์สามารถจำแนกแบคทีเรียสกุล Bacillus ได้เป็น 3 กลุ่ม (สุรางค์ สุธิราวุธ, 2538) คือ

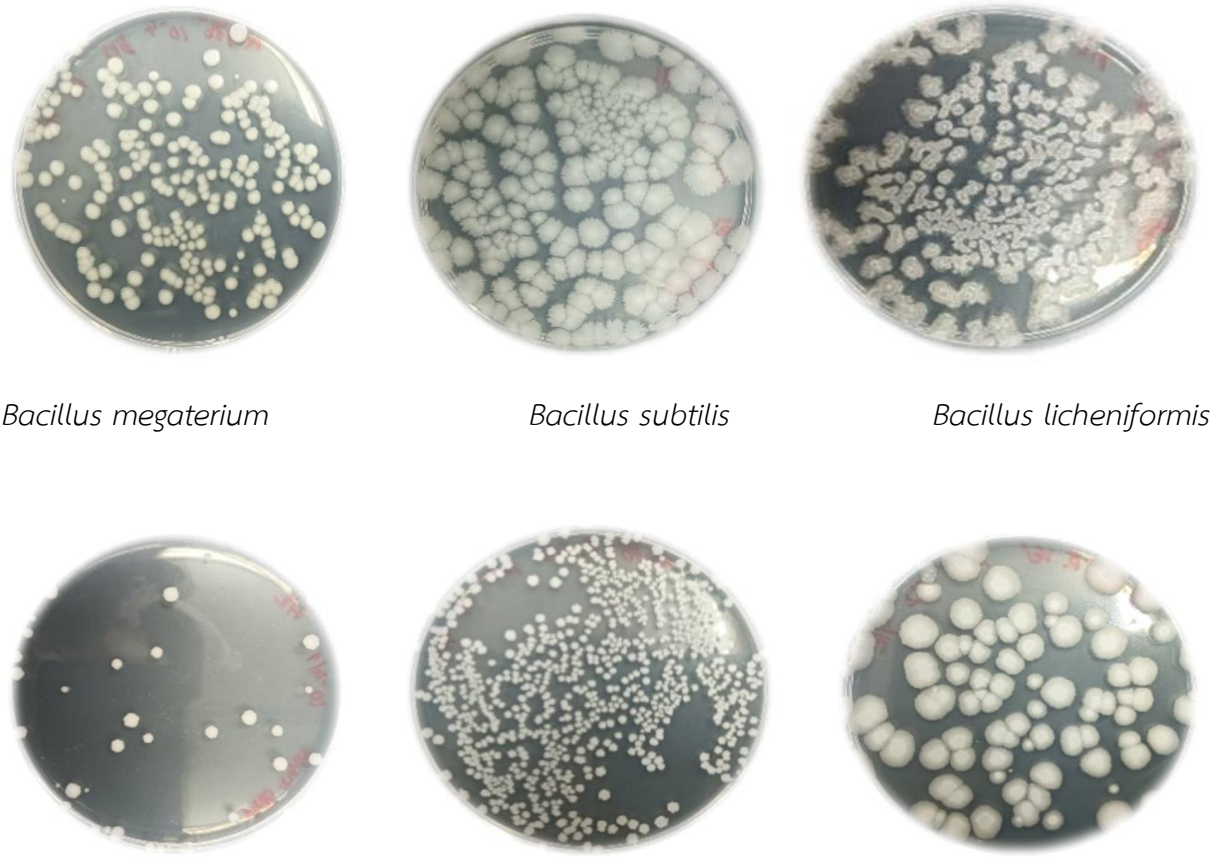
กลุ่มที่ 1 เซลล์ไม่โป่งพอง สปอร์เป็นรูปวงรีหรือรูปทรงกระบอก ตำแหน่งสปอร์อยู่ตรงกลางหรือค่อนไปทางปลายเซลล์กลุ่มนี้แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ

กลุ่มที่ 1A : เซลล์ขนาดใหญ่กว้างมากกว่า 1 ไมโครเมตร ภายใน protoplasm จะมีแกรนูลที่ไม่ติดสีแกรมทำให้เห็นเซลล์ไม่ติดสีเป็นช่วงๆได้แก่ *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. cereus var.mycoides*, *B. thuringiensis และ B. anthracis*

กลุ่มที่ 1B : เซลล์จะมีขนาดกว้างน้อยกว่า1 ไมโครเมตร เช่น *B. coagulans*, *B.licheniformis*, *B. subtilis*, *B. firmus* และ *B. pumilis* เป็นต้น

กลุ่มที่ 2 เซลล์โป่งพอง สปอร์มีลักษณะเป็นรูปไข่ มีตำแหน่งอยู่กลางหรือปลายของเซลล์ ได้แก่ *B. circulans, B. macerans, B. polymyxa, B. alvei, B. laterosporus, B. brevis, B. popilliae, B. larvae, B. stearothermophilus* และ *B. lentimorbus*

กลุ่มที่ 3 สปอร์ทำให้เซลล์โป่งออก หรือบางครั้งไม่โป่ง สปอร์รูปร่างกลม ตำแหน่งอยู่ปลายหรือค่อนไปทางปลายเซลล์ เช่น *B. sphaericus*



Bacillus megaterium *Bacillus subtilis* *Bacillus licheniformis*

Bacillus amyloliquefaciens *Bacillus siamensis* *Bacillus velezensis*

ภาพที่ 1 ลักษณะของโคโลนีของจุลินทรีย์ที่ตรวจพบจากตัวอย่างดิน

2.5 คุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *Bacillus* spp.

แบคทีเรียสกุล Bacillus สามารถสร้างเอนไซม์ Catalase จึงทำให้สามารถแยกความแตกต่างจากแบคทีเรียสกุล Clostridium และ Sporolactobacillus ได้ มีบางชนิดที่สร้างเอนไซม์ Catalase ได้น้อยหรือไม่สร้างเลย เช่น *B. larvae*, *B. lentimorbus*, *B. popilliae* และ *B. stearothermophilus* (Turnball *et al*., 1990) แบคทีเรียสกุล Bacillus ต้องการสารอาหารและสภาพแวดล้อมในการเจริญเติบโตแบ่งเป็น 3 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1 ต้องการอาหารธรรมดาทั่วไปที่มีส่วนประกอบไม่ซับซ้อน

กลุ่มที่ 2 ต้องการอาหารที่มีส่วนประกอบซับซ้อน

กลุ่มที่ 3 ต้องการอาหารเฉพาะสำหรับการเจริญเติบโต

ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆที่มีส่วนประกอบของคาร์โบไฮเดรต แบคทีเรีย *Bacillus* spp. จะสร้างกรดแต่ไม่สร้างแก๊ส ยกเว้น *B. polymyxa* และ *B. macerans* ที่สร้างแก๊สด้วยคาร์โบไฮเดรต แบคทีเรียชนิดเดียวกันอาจจะให้แก๊สที่แตกต่างกัน เช่น *B. subtilis*, *B. cereus* และ *B. licheniformis* เจริญบนอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสแล้วได้ 2,3-Butanediol และ Glycerol ในขณะที่ *B. polymyxa* เปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสแล้วได้ 2,3-Butanediol Ethanol และ Hydrogen ส่วน *B. macerans* เปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสแล้วได้ Ethanal, Acetone, Acetic และ Formic acid บางชนิดให้กรดแลคติก *Bacillus* spp. ส่วนใหญ่สร้าง Proteolytic enzyme และสามารถย่อย Casein และ Gelatin ได้

แบคทีเรีย *Bacillus* spp. ทุกชนิดเจริญได้ดีในที่ที่มีออกซิเจน บางชนิดจำเป็นต้องมีออกซิเจนจึงจะสามารถเจริญได้ เช่นแบคทีเรีย *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 (Turnball *et al*., 1990)

แบคทีเรีย *Bacillus* spp. สามารถเจริญได้ดีที่ pH เป็นกลางหรือกรดเล็กน้อย แต่ *B. alcalophilus* สามารถเจริญได้ที่ pH 9-10 ขณะที่ *B. acidocaldarius* สามารถเจริญได้ที่ pH 2-6 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. อยู่ในช่วง 25-37 องศาเซลเซียส ในขณะที่ *B. subtilis, B. licheniformis, B. acidocaldarius, B. brevis, B. stearothermophilus* และ *B. coagulans* ที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

2.6 การตรวจสอบลักษณะของเซลล์ และการย้อมแกรมจุลินทรีย์

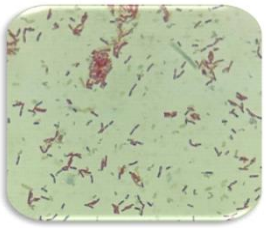
แบคทีเรียสกุล Bacillus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gram-positive) ที่มีรูปร่างเป็นท่อน ทรงกระบอก (Rod shape) อาจเป็นท่อนเดียวหรือต่อกันเป็นสายมีขนาด 0.5-2.5 x 1.2-10 ไมโครเมตร หรือ 0.3-2.2 x 0.7-1.2 ไมโครเมตร ต้องการออกซิเจนในการหายใจบางครั้งสามารถเจริญได้ในที่ไม่มีออกซิเจน (Facultative anaerobe) สร้างสปอร์ภายในเซลล์ (Endospore forming) 1 เซลล์ต่อ 1 สปอร์ ทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมเจริญได้ในอาหารหลายชนิดเติบโตดีในอุณหภูมิปกติและ pH เป็นกลาง สามารถผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิด ได้แก่ ไคติเนส (chitinase) ไคโตซาเนส (chitosanase) ไลเปส (lipase) ลามินาลิเนส (laminalinase) และโปรติเอส (protinase) เคลื่อนที่ได้ด้วย Peritrichous flagella และ *Bacillus* spp. สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้หลายชนิด เช่น Bacitracin ผลิตจาก *B. licheniformis* สาร Polymyxin ผลิต

จาก *B. polymyxa* สาร Gramicidin และสาร Tyrocidine ผลิตจาก *B. brevis* และสาร Subtilin และ Bacilycin ผลิตจาก *B. subtilis* การศึกษาลำดับ DNA base (DNA sequence) ในแบคทีเรียสกุล Bacillus มีความแตกต่างกันอย่างมากมีเปอร์เซ็นต์ G+C content มีความแปรปรวนตั้งแต่ 33 เปอร์เซ็นต์ใน *B. anthracis* จนถึง 69 เปอร์เซ็นต์ในแบคทีเรีย *B. thermocatenulatus* ซึ่งสูงกว่าความแปรปรวนของลักษณะภายในสกุล ปกติความแปรปรวนของลักษณะในสกุลไม่ควรเกิน 15 เปอร์เซ็นต์ (Rosovitz *et al.*, 1998)

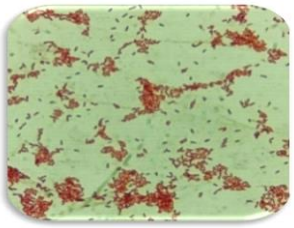
การย้อมแกรมเป็นการทดสอบในห้องปฏิบัติการที่ตรวจหาแบคทีเรีย แต่ละชนิดจะเปลี่ยนสีหนึ่งในสองชุด (สีชมพูเป็นสีแดง หรือสีม่วงเป็นสีน้ำเงิน) ภายใต้การย้อมแบบพิเศษ และจะถูกจัดประเภทเป็น "แบคทีเรียแกรมลบ" หรือ "แบคทีเรียแกรมบวก" ตามลำดับ การย้อมแบบแกรมทำงานโดยแยกแยะแบคทีเรียออกจากกันด้วยคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของผนังเซลล์ การย้อมแกรมเป็นเทคนิคการย้อมที่สำคัญในสาขาจุลชีววิทยาที่นักวิทยาศาสตร์ใช้กันมาหลายร้อยปี หลักเกณฑ์ในการย้อมแกรมมีดังนี้

1. เซลล์ปกติ (vegetative cell) เท่านั้น ที่ติดสีแกรมบวกหรือแกรมลบ แต่ถ้าเซลล์เกิดแตกขึ้นมาจะติดสีเฉพาะแกรมลบเท่านั้น
2. การย้อมแกรมต้องใช้ crystal violet และสารละลายไอโอดีนเสมอ
3. แบคทีเรียเท่านั้นที่ให้ผลต่างกันในการย้อมแกรม แต่จุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ จะติดสีย้อมแกรมอย่างใดอย่างหนึ่งเท่านั้น เช่น เซลล์ยีสต์จะติดสีแกรมบวก
4. การย้อมสีแกรมสามารถเปลี่ยนแบคทีเรียแกรมบวกเป็นแกรมลบได้
5. ไซโตพลาสซึมติดสีแกรมลบเท่านั้น
6. แบคทีเรียแกรมบวกถูกล้างสียากกว่าแกรมลบ
7. สปอร์ที่ยังไม่เจริญเต็มที่ (immature endospore) จะติดสีแกรมบวก ส่วนสปอร์ที่เจริญเต็มที่ (mature endospore) ไม่ติดสีแกรม

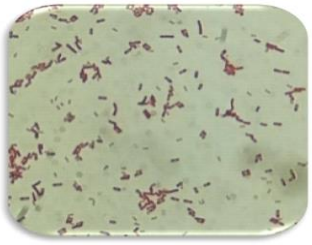
Bacillus megaterium



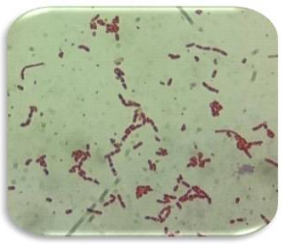
Bacillus subtilis



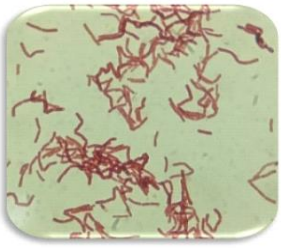
Bacillus licheniformis



Bacillus amyloliquefaciens



Bacillus siamensis



Bacillus velezensis

ภาพที่ 2 ลักษณะรูปร่างของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่ย้อมแกรมจุลินทรีย์ กำลังขยาย 1,000 เท่า

ตารางที่ 1 สัณฐานวิทยาภายนอกของจุลินทรีย์ทั้ง 6 ชนิด

ลำดับที่	ชนิด	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะของเซลล์	แกรม บวก/ลบ
1	*Bacillus megaterium*	กลม สีขาวครีมขอบเรียบ ผิวเยิ้ม	รูปแท่ง ติดสีน้ำเงินม่วง	บวก
2	*Bacillus subtilis*	สีขาวครีม ขอบหยัก แบน ติดผิวอาหาร	รูปแท่ง ติดสีน้ำเงินม่วง	บวก
3	*Bacillus licheniformis*	สีขาวครีม ขอบคล้ายกลีบดอกไม้ นูนสูงจากผิวอาหาร	รูปแท่ง ติดสีน้ำเงินม่วง	บวก
4	Bacillus amyloliquefaciens	สีขาวครีม ขอบหยัก	รูปแท่ง ติดสีน้ำเงินม่วง	บวก
5	*Bacillus siamensis*	สีขาวครีม ขอบหยัก แบน ติดผิวอาหาร	รูปแท่ง ติดสีน้ำเงินม่วง	บวก
6	*Bacillus velezensis*	สีขาวครีม ขอบเรียบ ผิวเยิ้ม	รูปแท่ง ติดสีน้ำเงินม่วง	บวก

2.7 ความสำคัญของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

ทางด้านการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำพบว่า *Bacillus* sp. สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย ก่อโรคในสัตว์น้ำได้หลากหลาย ได้แก่ *Aeromonas*, *Pseudomonas* และ *Vibrio* sp. (Hamza *et al*., 2015) การสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียก่อโรคเป็นปัจจัยสำคัญสำหรับการเพิ่มจำนวน และการอยู่รอดของแบคทีเรีย โดยส่งเสริมให้แบคทีเรียมีโอกาสเกิดการดื้อต่อยาปฏิชีวนะเพิ่มมากขึ้น (Flemming *et al*., 2016)

การเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) ในอัตราความหนาแน่นสูง มีการให้อาหารสำเร็จรูปที่มีโปรตีนสูงในปริมาณมากทำให้มีของเสียสะสมในบ่อเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเลี้ยง ส่งผลทำให้คุณภาพน้ำเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งอาจจะส่งผลกระทบต่อกุ้งบางส่วนที่ร่างกายอ่อนแอและป่วยเป็นโรค ทำให้ผลผลิตกุ้งลดลง ซึ่งโรคที่สำคัญที่มักเกิดขึ้นจากสภาพแวดล้อมในบ่อไม่เหมาะสม เช่น โรคติดเชื้อจากแบคทีเรียในบ่อเลี้ยงกุ้ง อาทิเช่น โรคกุ้งตายด่วน (Early Mortality Syndrome, EMS) ที่เกิดจากมีอาการของโรคตับและตับอ่อนเสื่อมสภาพฉับพลัน (Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease, AHPND) โดยกุ้งที่ป่วยจะมีอาการเซื่องซึม ว่ายน้ำแบบไร้ทิศทาง ตับและตับอ่อนฝ่อมีสีซีด ส่งผลให้มีกุ้งอ่อนแอและตายภายใน 20-30 วัน แบคทีเรียที่ก่อโรค คือ แบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio parahaemolyticus* การแก้ปัญหาการติดเชื้อแบคทีเรียสามารถรักษาได้โดยใช้ยาปฏิชีวนะ ซึ่งจะส่งผลทำให้เกิดปัญหายาตกค้างในเนื้อกุ้ง แนวทางหนึ่งในการป้องกันโรค คือ การควบคุมคุณภาพของน้ำให้อยู่ในระดับที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกุ้ง เพื่อเป็นการควบคุม

การเพิ่มจำนวนของเชื้อ *Vibrio* spp. ที่เป็นสาเหตุของโรคในกุ้งชนิดต่างๆ โดยทางการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำนั้นมีการนำจุลินทรีย์กลุ่มโพรไบโอติกมาทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ ให้ผลเหมือนสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน คือ ช่วยเสริมสร้างภูมิคุ้มกัน เพิ่มการเจริญเติบโต ทำให้เกิดสมดุลของจุลินทรีย์ในทางเดินอาหาร ช่วยยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคโดยมีกลไกการหลั่งสารหลายชนิดออกมาต่อต้านจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันเพื่อต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคไม่ให้เจริญเติบโตภายในลำไส้ (สุบัณฑิต และวีรพงษ์, 2552) โดยมีการใช้จุลินทรีย์ *Bacillus* spp. ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ภายในบ่อเลี้ยง ช่วยในการบำบัดพื้นบ่อและควบคุมคุณภาพน้ำให้เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (มนฑกานต์ และคณะ, 2552) ซึ่งมีการศึกษาการใช้จุลินทรีย์ *Bacillus* spp. ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำหลายชนิด เช่น ผสมในอาหารในการเลี้ยงปลานิล กุ้งขาว ปลาหมอ รวมถึงศึกษาการป้องกันการเกิดโรคในสัตว์น้ำ เป็นต้น (นัยนา, 2558)

บทที่ 3 การพัฒนาจุลินทรีย์โพรไบโอติคในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

ปัจจุบันมีความพยายามในการจัดการและดำเนินการหลากหลายประการที่จะช่วยให้การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเป็นไปอย่างยั่งยืนและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม เนื่องจากการเพาะเลี้ยงแบบพัฒนาและการจัดการที่ไม่เหมาะสมจะทำให้แหล่งน้ำที่รองรับน้ำเสียจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีคุณภาพเสื่อมโทรมและมีการสะสมของเชื้อก่อโรค รวมทั้งสารพิษชนิดต่างๆ และขี้เลนที่สะสมจากการเพาะเลี้ยงแบบพัฒนา ซึ่งส่งผลกระทบอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ดังนั้นการใช้โพรไบโอติคจะช่วยให้คุณภาพน้ำและคุณภาพของพื้นบ่อในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำดีขึ้นด้วยการเพิ่มกระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์อย่างสมบูรณ์ (Mineralization) ยกตัวอย่างเช่น โพรไบโอติคจะช่วยย่อยสลายสิ่งขับถ่าย เศษอาหารที่หลงเหลือในบ่อเพาะเลี้ยง รวมถึงแอมโมเนีย ไนไตรท์ และไฮโดรเจนซัลไฟด์ซึ่งเป็นสารประกอบที่เป็นพิษต่อสัตว์น้ำให้กลายเป็นน้ำและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ส่งผลให้การสะสมของสารอินทรีย์และของเสียอื่นๆในบ่อเพาะ เลี้ยงสัตว์น้ำลดลง

3.1 ประวัติการใช้โพรไบโอติคในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

Metchnikof (1908) เป็นบุคคลที่สนใจและศึกษาวิจัยเกี่ยวกับโพรไบโอติค โดยมีจุดมุ่งหมายเพื่อเพิ่มปริมาณแบคทีเรียแลกติกในลำไส้ และยับยั้งกิจกรรมของแบคทีเรียก่อโรคในลำไส้ของมนุษย์ รวมทั้งได้คำจำกัดความของโพรไบโอติกว่า จุลินทรีย์ที่กินเข้าสู่ร่างกายโดยมีจุดประสงค์เพื่อส่งเสริมสุขภาพ ต่อมา Parker (1974) ได้ให้คำจำกัดความว่า สิ่งมีชีวิตและสารเคมีที่มีผลต่อสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ ส่วนความหมายของโพรไบโอติกในเชิงการเลี้ยงสัตว์น้ำ หมายถึง จุลินทรีย์โดยเฉพาะแบคทีเรียหรือผลผลิตจากแบคทีเรียที่เติมเข้าไปในระบบการเลี้ยงสัตว์น้ำไปมีผลช่วยให้สัตว์ดังกล่าวมีสุขภาพดีขึ้น (Lilley and Stillwell, 1965; FAO/WHO, 2001) รวมถึงการใช้จุลินทรีย์ในการฟื้นฟูสภาพด้วยวิธีทางชีวภาพ (Bioreme-diation) หรือการเติมสารอาหารเพื่อการฟื้นฟูสภาพ (Bioaug-mentation) ซึ่งเป็นวิธีที่ช่วยลดการสะสมของเสียและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม (Thomas *et al.*,1992) จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก ยกตัวอย่าง เช่น *Lactobacillus, Bacillus, Bifidobactrium, E.coli, Clostridium botyricum, Enterococcos, Streptococcus* และ ยีสต์

ชนิดของโพรไบโอติกที่นำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีหลากหลายชนิดและมีคุณสมบัติแตกต่างกัน โดยมีการเลือกใช้ให้เหมาะสมกับระบบเพาะเลี้ยงและชนิดสัตว์น้ำ ดังนั้นในตารางที่ 2 จะแสดงถึงชนิดของโพรไบโอติกและการใช้โพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชนิดต่างๆ

ตารางที่ 2 โพรไบโอติกและการใช้โพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชนิดต่างๆ

ชนิดโพรไบโอติก	ชนิดสัตว์น้ำ	วิธีการใช้โพรไบโอติก	เอกสารอ้างอิง
Streptococcus lactis และ *Lactobacillus bulgaricus*	ตัวอ่อนปลา Turbot	เติมลงในโรติเฟอร์และไดอะตอม	Garcia de la Banda *et al.* (1992)
Lactobacillus spp. และ *Carnobacterium* spp.	ตัวอ่อนปลา Turbot	เติมในโรติเฟอร์	Gatesoupe (1994)
Vibrio alginolyticus	ปลาแอตแลนติกแซลมอน (*Salmo salar* L.)	แช่ใน cell suspension	Austin *et al.* (1995)
Carnobacterium divergens	ปลาคอดแอตแลนติก	เติมในอาหาร	Gildberg and Mikkelsen (1998)
G-probiotic	ปลานิลลูกผสม	เติมในอาหาร	Naik *et al.,* (1999)
Carnobacterium spp.	ปลาแอตแลนติกแซลมอน	เติมในอาหาร	Robertson *et al.,* (2000)
Lactobacillus rhamnosus ATCC 53103	ปลาเทราต์สายรุ้ง	เติมในอาหาร	Nikoskelainen *et al.,* (2001)
Aeromonas hydrophila, V. fluvialis, Carnobacterium spp. และ *Micrococcus luteus*	ปลาเทราต์สายรุ้ง	เติมในอาหาร	Irianto and Austin (2002)
Enterococcus faecium SF68	ปลาไหล	เติมในอาหาร	Chang and Liu (2002)
L. rhamnosus JCM 1136	ปลาเทราต์สายรุ้ง	เติมในอาหาร	Panigrahi *et al.,* (2004)
Bacillus circulans	ปลายี่สกเทศ	เติมในอาหาร	Ghosh *et al.,* (2004)
Bacillus spp. S11	กุ้งกุลาดำ	เติมในอาหาร	Rengpipat *et al.,* (1998)
Lactobacillus spp.	กุ้งกุลาดำ	เติมในอาหาร	Phianphak *et al*., (1999)
Saccharomyces cerevisiae, *Phaffia rhodozyma* และ *S. exiguus*	กุ้งขาว	เติมในอาหาร	Scholz *et al.,* (1999)
V. hepatarius, Vibrio spp.และ *Bacillus* spp.	กุ้งขาว	เติมในอาหาร	Balcazar (2003)
Bacillus spp.	กุ้งกุลาดำและกุ้งขาว	บำบัดขี้เลน	Nimrat *et al.,* (2008)
Bacillus spp.	กุ้งกุลาดำ	เติมในอาหาร	ไตรมาศ บุญไทย และคณะ (2550)

(Balcazar *et al.,* 2006)

3.2 การประยุกต์ใช้โพรไบโอติกเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในปัจจุบัน

ปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อความสำเร็จหรือล้มเหลวในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของเกษตรกร คือ โรคสัตว์น้ำที่เกิดจากจุลินทรีย์ การรักษาโรคสัตว์น้ำของเกษตรกรจะใช้ยาปฏิชีวนะเป็นหลัก ซึ่งจะได้ผลดีในระยะแรกเท่านั้น เมื่อใช้ยาปฏิชีวนะไปได้ระยะหนึ่งจะประสบปัญหาการใช้ยาที่ไม่สามารถรักษาการติดเชื้อของสัตว์น้ำได้ ซึ่งมีสาเหตุมาจากการดื้อยาของจุลินทรีย์ที่มีผลมาจากการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างไม่ถูกต้องแต่อย่างไรก็ตามการใช้ยาปฏิชีวนะยังมีความจำเป็นในการรักษาโรคของสัตว์น้ำ แต่ต้องมีการใช้อย่างถูกต้องโดยใช้รักษาเมื่อสัตว์น้ำป่วยแล้วเท่านั้น จากปัญหาดังกล่าวจึงทำให้เกษตรกรหันมาใช้โพรไบโอติกในการป้องกันการเกิดโรคในสัตว์น้ำเพิ่มมากขึ้น ทั้งนี้การใช้โพรไบโอติกในปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์ให้เลือกสรรหลากหลายชนิด ซึ่งมีประสิทธิภาพแตกต่างกันดังจะกล่าวต่อไปนี้

การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในน้ำเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเป็นวิธีการปรับปรุงคุณภาพน้ำและส่งเสริมสุขภาพสัตว์น้ำ โพรไบโอติกคือจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ เช่น แบคทีเรียและยีสต์ ที่ถูกเติมลงไปในน้ำเพื่อควบคุมจุลินทรีย์ที่ก่อโรค โพรไบโอติกช่วยในการย่อยสลายของเสียและสารอินทรีย์ในน้ำ ซึ่งจะลดปริมาณแอมโมเนีย ไนไตรท์ และไนเตรทที่เป็นอันตรายต่อสัตว์น้ำ ช่วยให้สภาพแวดล้อมของบ่อหรือระบบเพาะเลี้ยงมีความเสถียรและเหมาะสมต่อการเติบโตของสัตว์น้ำ

การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกผสมในอาหารสัตว์น้ำเป็นอีกวิธีหนึ่งที่มีประโยชน์ในการส่งเสริมสุขภาพและการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำ โพรไบโอติกที่ผสมในอาหารจะช่วยกระตุ้นระบบย่อยอาหารของสัตว์น้ำ ทำให้การย่อยและดูดซึมสารอาหารมีประสิทธิภาพมากขึ้น นอกจากนี้ จุลินทรีย์โพรไบโอติกยังช่วยปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ โดยเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์และลดจำนวนแบคทีเรียก่อโรค ส่งผลให้สัตว์น้ำมีภูมิคุ้มกันที่ดีขึ้น และลดความเสี่ยงของโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียในลำไส โพรไบโอติกในอาหารยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำโดยช่วยลดอัตราอาหารต่อการเพิ่มน้ำหนัก (Feed Conversion Ratio, FCR) ส่งผลให้สัตว์น้ำใช้ประโยชน์จากอาหารได้มากขึ้น การใช้โพรไบโอติกในอาหารยังช่วยลดความจำเป็นในการใช้ยาปฏิชีวนะ ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญในการป้องกันการดื้อยาของเชื้อโรคในอนาคต นอกจากนี้ โพรไบโอติกในอาหารยังมีบทบาทในการควบคุมการย่อยสลายโปรตีนและการสร้างพลังงาน ซึ่งช่วยในการปรับปรุงคุณภาพของเนื้อสัตว์น้ำที่ได้

การใช้โพรไบโอติกต้องพิจารณาถึงชนิดของจุลินทรีย์ที่เหมาะสม เช่น การเลือกใช้แบคทีเรียที่ย่อยสลายของเสียได้ดี หรือการใช้จุลินทรีย์ที่สามารถสร้างแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ในทางเดินอาหารของสัตว์น้ำ นอกจากนี้ ควรเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถดำรงชีวิตได้ดีในสภาพแวดล้อมที่เฉพาะเจาะจงของบ่อเพาะเลี้ยง การใช้โพรไบโอติกต้องทำอย่างสม่ำเสมอและควบคุมปริมาณให้เหมาะสม เพื่อให้ได้ผลลัพธ์ที่ดีที่สุดในการลดมลพิษในน้ำและการส่งเสริมสุขภาพของสัตว์น้ำ การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกผสมในอาหารสัตว์น้ำเป็นอีกวิธีหนึ่งที่มีประโยชน์ในการส่งเสริมสุขภาพและการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำ โพรไบโอติกที่ผสมในอาหารจะช่วย กระตุ้นระบบย่อยอาหารของสัตว์น้ำ ทำให้การย่อยและดูดซึมสารอาหารมีประสิทธิภาพมากขึ้น นอกจากนี้จุลินทรีย์โพรไบโอติกยังช่วยปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ โดยเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์และ ลดจำนวนแบคทีเรียก่อโรค ส่งผลให้สัตว์น้ำมีภูมิคุ้มกันที่ดีขึ้น และลดความเสี่ยงของโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียในลำไส้ โพรไบโอติกในอาหารยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำโดยช่วยลดอัตราอาหารต่อการเพิ่มน้ำหนัก (Feed Conversion Ratio, FCR) ส่งผลให้สัตว์น้ำใช้ประโยชน์จากอาหารได้มากขึ้น การใช้โพรไบโอติกในอาหารยังช่วยลดความจำเป็นในการใช้ยาปฏิชีวนะ ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญในการป้องกันการดื้อยาของเชื้อโรคในอนาคต นอกจากนี้ โพรไบโอติกในอาหารยังมีบทบาทในการควบคุมการย่อยสลายโปรตีนและการสร้างพลังงาน ซึ่งช่วยในการปรับปรุงคุณภาพของเนื้อสัตว์น้ำที่ได้

การเลือกใช้โพรไบโอติกในอาหารต้องคำนึงถึงชนิดและปริมาณที่เหมาะสม เพื่อให้จุลินทรีย์เหล่านี้สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพในระบบย่อยอาหารของสัตว์น้ำ การเตรียมและการเก็บรักษาอาหารที่ผสมโพรไบโอติกก็มีความสำคัญ ต้องมีการควบคุมอุณหภูมิและสภาพแวดล้อมให้เหมาะสม เพื่อรักษาความมีชีวิตของจุลินทรีย์ในอาหารและให้สามารถทำงานได้เต็มที่

3.3 ประโยชน์ของโพรไบโอติกเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในปัจจุบัน

1) เพื่อให้เกิดสมดุลในระบบทางเดินอาหาร โพรไบโอติกกลุ่มที่นำมาเติมในอาหารสัตว์น้ำนั้นจะมีหน้าที่ในการช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตและช่วยสร้างภูมิคุ้มกันให้แก่สัตว์น้ำด้วยกระบวนการดังนี้ คือ โดยปกติแล้วจุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้ของสัตว์น้ำประกอบด้วยจุลินทรีย์กลุ่มที่มีประโยชน์และ กลุ่มที่ก่อให้เกิดโทษ เมื่อมีการเสียสมดุลและมีปริมาณจุลินทรีย์ที่ไม่ดีจำนวนมากกว่าจะทำให้สัตว์น้ำติดโรค (Gatesoupe, 1999) จึงมีการนำโพรไบโอติกซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่มที่มีประโยชน์มาใช้ในการเลี้ยงสัตว์น้ำ เพื่อให้มีปริมาณของ

จุลินทรีย์กลุ่มที่มีประโยชน์อยู่ในระดับที่เหมาะสมซึ่งจะส่งผลให้สัตว์น้ำมีอัตราการเจริญเติบโตสูงขึ้น (สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, 2551; สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และคณะ, 2551; Balcazar *et al.,* 2006) ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของโพรไบโอติกในท่อทางเดินอาหาร ได้แก่ อุณหภูมิ ค่า Redox potential เอนไซม์ และระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำ รวมทั้งสารพิษหรือสารเคมีที่จุลินทรีย์ในท่อทางเดินอาหารสร้างขึ้น เช่น เอนไซม์โปรติเอส แบคเทอริโอซิน ไลโซไซม์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แอมโมเนีย ไดอะซิติล กรดอินทรีย์ (สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2552; Gullian *et al.,* 2004)

2) เพื่อยับยั้งเชื้อก่อโรคและกระตุ้นภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำ โพรไบโอติกกลุ่มที่นำมาเติมในอาหารสัตว์น้ำนั้นจะมีหน้าที่ในการช่วยยับยั้งเชื้อก่อโรคและกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้แก่สัตว์น้ำด้วยกระบวนการดังต่อไปนี้ คือ โพรไบโอติกมีกลไกในการยับยั้งเชื้อก่อโรคและลดระยะเวลาการเกิดโรคด้วยกลไกต่างๆ ขึ้นอยู่กับชนิดของโพรไบโอติก (Balcazar *et al.,* 2006) ยกตัวอย่างเช่น แบคทีเรียโพรไบโอติกกลุ่ม Bacillus สามารถลดปริมาณแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอในทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำได้ (ไตรมาศ บุญไทย และคณะ, 2550) และโพรไบโอติกกลุ่ม *Lactobacillus* ที่ผสมในอาหารกุ้งก้ามกรามสามารถลดปริมาณแบคทีเรียแกรมลบในทางเดินอาหารกุ้งก้ามกรามได้เช่นเดียวกัน (Venkat *et al.,* 2004) นอกจากนี้ Chythanya และคณะ (2002) พบว่าแบคทีเรียทางทะเลสายพันธุ์ *Pseudomonas* I-2 สามารถผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคกลุ่มวิบริโอในกุ้งได้ การยับยั้ง แบคทีเรียก่อโรคของโพรไบโอติกเป็นผลมาจากกลไกการทำลายแบคทีเรียก่อโรค โดยการแข่งขันแย่งสารอาหารและหลั่งเอนไซม์ที่สามารถย่อยเมือกที่ล้อมรอบเซลล์แบคทีเรียแกรมลบก่อโรค ทำให้สารปฏิชีวนะที่โพรไบโอติกสร้างขึ้นเข้าทำลายองค์ประกอบ ของเซลล์ ส่งผลให้แบคทีเรียก่อโรคหยุดการเจริญและถูกทำลาย ในที่สุด (Moriarty, 1998) จากการศึกษาพบว่าแบคทีเรียโพรไบโอติกบางชนิดยังมีคุณสมบัติในการต่อต้านไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคในสัตว์น้ำ เช่น hematopoietic necrosis virus (IHNV), Infectious และ Oncorhynchus masou virus (OMV) เป็นต้น (Kamei *et al.,* 1988; Direkbusarakom *et al.,* 1998)

3) เพื่อช่วยย่อยสารอาหารขนาดใหญ่ให้เป็นสารอาหารขนาดเล็ก โพรไบโอติกกลุ่มที่นำมาเติมในอาหารสัตว์น้ำนั้นจะมีหน้าที่ในการช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตให้แก่สัตว์น้ำด้วยกระบวนการดังนี้ คือ โพรไบโอติกช่วยให้สัตว์น้ำดูดซึมอาหารได้ดียิ่งขึ้น โดยโพรไบโอติกจะหลั่งเอนไซม์ออกมาจากเซลล์ เช่น อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส ที่ช่วยย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต โปรตีนและไขมันตามลำดับ ซึ่งมีโครงสร้างที่ซับซ้อนให้ได้หน่วยที่เล็กลง เช่น กรดอินทรีย์ กรดไขมัน แอลกอฮอล์ เอสเทอร์ คาร์บอนไดออกไซด์ มีเทนและไฮโดรเจนซัลไฟด์ (Gatesoupe, 1999; Balcazar *et al.,* 2006)

4) เพื่อการปรับปรุงคุณภาพน้ำ การใช้โพรไบโอติกในการปรับปรุงคุณภาพน้ำจะช่วยให้การย่อยสลายสารอินทรีย์ สารอนินทรีย์ เศษอาหารและขี้กุ้งมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น (Balcazar *et al.,* 2006) อีกทั้งยังช่วย ย่อยสลายแอมโมเนีย และไนไตรท์ ซึ่งเป็นสารประกอบไนโตรเจนที่เป็นพิษต่อสัตว์น้ำ (Boyd, 1979) ส่งผลให้คุณภาพน้ำมีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำ สัตว์น้ำมีสุขภาพแข็งแรงและมีอัตราการรอดชีวิตสูงขึ้น (สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และ วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2552) โพรไบโอติกที่ใช้ควบคุมคุณภาพน้ำ เพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้แสดงดังตารางที่ 3

5. เพื่อการบำบัดขี้เลนในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โพรไบโอติกนอกจากจะใช้เพื่อบำบัดคุณภาพน้ำแล้วยัง สามารถนำมาใช้ในการบำบัดขี้เลนในบ่อเพาะเลี้ยงได้ จากการศึกษาเปรียบเทียบการบำบัดขี้เลนจากบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำด้วยการเติมแบคทีเรียโพรไบโอติกกับวิธีการตากแดด โรยปูนขาวและพลิกเลน พบว่าการเติมแบคทีเรียโพรไบโอติกร่วมกับการตากแดดและพลิกเลนสามารถกำจัด *V. parahaemolyticus* และ *P. aeruginosa* ได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับการบำบัดด้วยวิธีการอื่น รวมทั้งยังสามารถปรับค่าพีเอชและปริมาณสารอินทรีย์ให้เหมาะสมกับการเพาะเลี้ยงกุ้งได้อีกด้วย (สุนิสา สุขสวัสดิ์ และ คณะ, 2549, 2550, 2551: สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และคณะ, 2551; Nimrat *et al.,* 2008; Nimrat *et al.,* 2009)

ในปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกหลากหลายชนิดที่จำหน่ายในประเทศไทย แต่พบว่ามีข้อจำกัดของผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกเหล่านั้น เนื่องจากพบว่ามีประสิทธิภาพที่ไม่คงที่เหมือนกับสารเคมีหรือยาปฏิชีวนะ ซึ่งข้อจำกัดดังกล่าวเป็นผลมาจากปัจจัยหลายประการ ยกตัวอย่างเช่น ปริมาณจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ไม่คงที่ตลอดอายุการใช้งาน จากการศึกษาของ Nimrat and Vuthiphandchai (2007a.b,c,d,e) ที่ศึกษาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในตัวอย่างผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกสำหรับการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลที่จำหน่ายในประเทศไทยและต่างประเทศจำนวน 12 ตัวอย่าง พบว่าผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกเพียงชนิดเดียวเท่านั้น (ร้อยละ 8.33) ที่มีปริมาณจุลินทรีย์เท่ากับปริมาณที่ระบุบนฉลากข้างผลิตภัณฑ์ ขณะที่ผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกส่วนใหญ่ (ร้อยละ 58.34) มีปริมาณจุลินทรีย์น้อยกว่าปริมาณที่ระบุบนฉลากข้างผลิตภัณฑ์ และผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกร้อยละ 33.33 ไม่ระบุปริมาณจุลินทรีย์บนฉลากข้างผลิตภัณฑ์ดังแสดงในตารางที่ 3 เมื่อศึกษาชนิดของแบคทีเรียของผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกพบว่าผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกประกอบด้วย *Bacillus, Micrococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium* และ *Staphylococcus* โดย *Bacillus* เป็นแบคทีเรียที่พบได้ในทุกผลิตภัณฑ์

ดังนั้นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกลดลง คือ ธรรมชาติของจุลินทรีย์จะมีอายุขัยสั้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในรูปของน้ำ แต่อย่างไรก็ตามโพรไบโอติกที่อยู่ในรูปแบบแห้งก็ยังคงมีอายุขัยที่ค่อนข้างสั้นเช่นเดียวกัน เมื่อผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกวางจำหน่ายนานขึ้น ปริมาณจุลินทรีย์ก็จะลดลงตามระยะเวลาที่รอการจำหน่าย ดังนั้นเมื่อลูกค้าซื้อผลิตภัณฑ์ที่เพิ่งวางจำหน่ายเพียงไม่กี่เดือนก็จะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีปริมาณและชนิดของจุลินทรีย์ รวมทั้งประสิทธิภาพของโพรไบโอติกลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ใหม่นั่นเอง

ตารางที่ 3 ชนิดของโพรไบโอติกเพื่อควบคุมคุณภาพน้ำในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชนิดต่างๆ

ชนิดโพรไบโอติก	ชนิดสัตว์น้ำ	เอกสารอ้างอิง
B. megaterium, B. subtilis, *B. polymyxa* และ *B. licheniformis*	ปลาดุกอเมริกัน	Queiroz and Boyd (1998)
Vibrio pelagius	ปลา Turbot	Ring and Vadstein (1998)
Pseudomonas fluorescens	ปลาเทราต์สายรุ้ง	Gram *et al.,* (1999)
Roseobacter spp. สายพันธุ์ 27-4	ตัวอ่อนปลา Turbot	Hjelm *et al.,* (2004)
Bacillus sp.	กุ้งกุลาดำ	Moriarty (1998)
Vibrio P62, *Vibrio* P63 และ *Bacillus* P64	กุ้งขาว	Gullian *et al.,* (2004)
Pseudomonas sp. และ *V. fluvialis*	กุ้งกุลาดำ	Alavandi *et al.,* (2004)
Aeromonas media สายพันธุ์ A199	หอยนางรม (*Crassostrea gigas*)	Gibson *et al*., (1998)
Roseobacter BS107	หอยเชลล์ (*Pecten maximus*)	Ruiz-Ponte *et al*., (1999)
Alteromonas haloplanktis	หอยเชลล์ชิลี (*Argopecten purpuratus*)	Riquelme *et al.,* (2000)

(Balcazar *et al.,* 2006)

3.4 การใช้โพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลในภาคตะวันออกของประเทศไทย

เกษตรกรผู้เพาะพันธุ์กุ้งกุลาดำในโรงเพาะฟักส่วนใหญ่ไม่มีการใช้โพรไบโอติกในฟาร์มเพาะพันธุ์กุ้งกุลาดำ มีเพียงเกษตรกรผู้เพาะพันธุ์บางรายได้ทดลองนำโพรไบโอติกมาใช้เองภายในฟาร์ม เพื่อหวังว่าจะช่วยลดปัญหาการเกิดโรคภายในบ่ออนุบาลลูกกุ้ง ยี่ห้อผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกที่เกษตรกรผู้เพาะพันธุ์นิยมใช้เป็นส่วนใหญ่ ได้แก่ สตาร์แบคซิน ซึ่งมีคุณสมบัติช่วยย่อยสลายของเสียบนพื้นบ่อและควบคุมการระบาดของโรค ประกอบด้วย จุลินทรีย์ 9 ชนิด มีแบคทีเรียปริมาณ 10^9 CFU/g สามารถใช้ได้ทั้งน้ำจืดและน้ำเค็ม โดยเกษตรกรจะใช้โพรไบโอติกเพื่อการปรับสภาพน้ำภายในบ่อในปริมาณ 10 กรัมต่อบ่อขนาด 3 ตัน

นอกจากนั้นพบว่าเกษตรกรส่วนใหญ่มีการใช้โพรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งในบ่อดิน ยี่ห้อที่เกษตรกรส่วนใหญ่นิยมใช้ ได้แก่ แลกโตแบค ซึ่งประกอบด้วยจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ ที่มีความสามารถในการย่อยสลายของเสีย ควบคุมค่าพีเอชไม่ให้เปลี่ยนแปลงมากในรอบวันควบคุมแบคทีเรียก่อโรคในบ่อเลี้ยงโดยเกษตรกรที่ใช้โพรไบโอติกส่วนใหญ่ได้รับการแนะนำจากตัวแทนจำหน่ายซึ่งเกษตรกรเกือบครึ่งหนึ่งมีการใช้โพรไบโอติกมาประมาณ 3 - 4 ปี โดยให้เหตุผลว่าโพรไบโอติกมีความสำคัญต่อการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ นอกจากนี้เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งกุลาดำยังนำโพรไบโอติกมาผสมกับอาหารสำเร็จรูปให้กุ้งกินเพื่อให้ลูกกุ้งมีสุขภาพดีและป้องกันการเกิดโรคจากแบคทีเรีย โดยจะให้กุ้งกินอาหารที่ผสมโพรไบโอติกในขณะที่กุ้งยังคงมีสุขภาพแข็งแรง โดยนำโพรไบโอติกผสมลงในอาหารประมาณร้อยละ 5 ทุกๆ 7 วัน ตลอดระยะเวลาการเลี้ยง เกษตรกรจะหยุดให้โพรไบโอติกเมื่อกุ้งติดเชื้อก่อโรคและจะใช้ยาปฏิชีวนะรักษาโรคแทนการใช้โพรไบโอติก นอกจากนี้เกษตรกรส่วนน้อยจะหมักโพรไบโอติกใช้เอง โดยนำกากน้ำตาลทรายแดง เปลือกสับปะรด น้ำมะพร้าวและหัวเชื้อนำมาหมักลงในถังแล้วเติมน้ำในอัตราส่วนที่เหมาะสม ประมาณ 1 สัปดาห์สามารถนำมาใช้ได้ โดยเกษตรกรนำโพรไบโอติกที่หมักได้นำมาผสมกับอาหารสำเร็จรูปในอัตราส่วนโพรไบโอติกที่หมักได้ 100 กรัมต่ออาหารสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม ทุก ๆ 1 สัปดาห์ โดยให้เหตุผลว่าขั้นตอนการผลิตไม่ซับซ้อนและวัตถุสามารถหาได้ง่าย จึงได้มีการผลิตโพรไบโอติกไว้ใช้เอง อีกทั้งเกษตรกรบางรายได้นำโพรไบโอติกมาผสมน้ำสาดรอบบ่อเพื่อปรับสภาพน้ำส่งผลให้กุ้งกุลาดำมี

การเจริญเติบโตและอัตราการรอดชีวิตสูงขึ้น (สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และคณะ, 2550; สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และคณะ, 2552)

การสำรวจการใช้โพรไบโอติกในการอนุบาลและเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำในบริเวณภาคตะวันออก สามารถสรุปได้ดังนี้

1. ผู้เพาะพันธุ์กุ้งกุลาดำส่วนน้อยที่ใช้โพรไบโอติก โดยใช้กับลูกกุ้งในระยะซูเอีย รวมทั้งใช้เพื่อปรับสภาพน้ำ ผลที่ได้จากการใช้โพรไบโอติกคือ ลูกกุ้งจะมีการเจริญเติบโตที่ดี แข็งแรง และมีอัตรารอดตายที่สูงขึ้น สามารถช่วยลดปัญหาการเกิดโรคได้มาก

2. เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งกุลาดำส่วนใหญ่มีการใช้โพรไบโอติก ซึ่งให้เหตุผลว่ามีความสำคัญต่อการเลี้ยงกุ้งและตัวแทนจำหน่ายเป็นผู้แนะนำให้ใช้ โดยมีการใช้ผสมกับอาหารสำเร็จรูปตลอดการเลี้ยง ซึ่งพบว่าไม่ส่งผลกระทบต่อตัวกุ้งและสิ่งแวดล้อม

3. เกษตรกรส่วนใหญ่มีการใช้โพรไบโอติก กุ้งที่เลี้ยงมีการเจริญเติบโตที่ดี อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อดีขึ้นและมี อัตรารอดตายที่สูงขึ้น

4. ความต้องการของเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งจากการใช้โพรไบโอติกคือ ต้องการให้มีโพรไบโอติกที่มีคุณภาพดี เพื่อนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

3.5 การใช้โพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในต่างประเทศ

การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเป็นอุตสาหกรรมที่เติบโตอย่างรวดเร็ว โดยในช่วงทศวรรษที่ 1950 การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทั่วโลกมีปริมาณน้อยกว่า 1 ล้านตันต่อปี และเพิ่มขึ้นเป็น 59.4 ล้านตัน ต่อมาในปี ค.ศ. 2004 คิดเป็นมูลค่ากว่า 70.3 พันล้านดอลลาร์สหรัฐ (FAO, 2006) ซึ่งประเทศจีนสามารถผลิตสัตว์น้ำได้สูงถึง 41.3 ล้านตัน (ร้อยละ 69.6) ในขณะที่ประเทศในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิคมีประมาณการผลิตสัตว์น้ำเพียงร้อยละ 21.9 ของปริมาณทั้งหมด แสดงให้เห็นว่าปริมาณการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในประเทศจีนมีปริมาณมหาศาล แต่เนื่องด้วยการใช้ยาปฏิชีวนะในการเพาะเลี้ยงทำให้เชื้อก่อโรคระบาดเพิ่มมากขึ้นและผลผลิตสัตว์น้ำมีปริมาณลดลง ดังนั้นการใช้โพรไบโอติกจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่ได้รับความสนใจจากเกษตรกรชาวจีน ซึ่งปัจจุบันบริษัทที่ผลิตผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกสำหรับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในประเทศจีนมีมากกว่า 10 บริษัท ซึ่งมีกำลังการผลิตสูงกว่า 50,000 ตันต่อปี คิดเป็นมูลค่าทางการตลาดกว่า 50 ล้านยูโร (สองพันสี่ร้อยห้าสิบล้านบาท) ซึ่งโพรไบโอติกที่ใช้ในอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในประเทศจีน ได้แก่ แบคทีเรียกลุ่มสังเคราะห์แสง แบคทีเรียแลคติก แบคทีเรียกลุ่มในทริไฟเออร์ แบคทีเรียกลุ่มดีในทริไฟเออร์ แบคทีเรียสกุล *Pseudoalteromonas, Bacillus, Flavobacterium, Alteromonas, Phaeobacter, Bdellovibrio* และ ยีสต์ โดยในช่วงทศวรรษที่ 1990 ที่ผ่านมาผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกที่ใช้ในประเทศจีนเป็นผลิตภัณฑ์ที่นำเข้ามาจากประเทศสหรัฐอเมริกาสหราชอาณาจักรและญี่ปุ่น ซึ่งผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกเหล่านี้ถูกนำมาใช้ครั้งแรกกับการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลของบริษัท Dahua Aquaculture เมือง Laizhou มณฑล Shandong แต่ในปัจจุบันโพรไบโอติกที่ได้รับความนิยมสูงสุดเป็นโพรไบโอติก ที่เรียกว่า Effective Microorganisms (EM) ซึ่งเป็นโพรไบโอติก ที่รวมเอาจุลินทรีย์หลากหลายชนิดเข้าไว้ด้วยกัน เช่น ยีสต์ แบคทีเรียแลคติก แบคทีเรียกลุ่มสังเคราะห์แสง และแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซีส เป็นต้น โดยปริมาณการผลิตโพรไบโอติกชนิดนี้มีปริมาณสูงถึง 10,000 ตันต่อปี ทั้งนี้เพื่อตอบสนองความต้องการที่นำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้งน้ำจืด กุ้งทะเล เต่า ปลาไหล ปลาไน และหอยเป๋าฮื้อที่เพิ่มมากขึ้น (Qi *et al*., 2009)

สำหรับการใช้โพรไบโอติกในประเทศฟิลิปปินส์นั้น เป็นการใช้เพื่อลดการสะสมของเสียในบ่อเพาะเลี้ยงและเพิ่มปริมาณผลผลิตของสัตว์น้ำที่นิยมเลี้ยงแบบพัฒนา ซึ่งผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำนั้นเป็นผลิตภัณฑ์ที่นำเข้ามาจากประเทศกลุ่มสหภาพยุโรป สหรัฐอเมริกา และประเทศไทย การใช้ โพรไบโอติกของเกษตรกรชาวฟิลิปปินส์จะใช้ตั้งแต่ช่วงระยะเวลาการเตรียมบ่อ และในระหว่างการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และการใช้โพรไบโอติกมีทั้งใช้แบบผสมกับอาหารสัตว์น้ำและเติมลงในน้ำเพื่อปรับปรุงคุณภาพน้ำตามคำแนะนำที่ระบุบนฉลากข้างผลิตภัณฑ์ (Cruz-Lacierda *et al.,* 2008)

3.6 อนาคตของโพรไบโอติกสำหรับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในประเทศไทย

จากความต้องการของการใช้โพรไบโอติกสำหรับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในประเทศไทยดังที่กล่าวมาแล้ว ทำให้โพรไบโอติกได้รับความนิยมในการป้องกันการเกิดโรคในสัตว์น้ำเพิ่มมากขึ้นทั้งนี้เพื่อเพิ่มอัตราการเจริญเติบโต อัตราการรอดชีวิตและลดต้นทุนการผลิตจากค่าใช้จ่ายในการใช้ยาปฏิชีวนะ และที่สำคัญที่สุดจะทำให้ผลผลิตโดยรวมของผลผลิตสัตว์น้ำของประเทศไทยมีคุณภาพสูงขึ้น ไม่มีการตกค้างหรือปนเปื้อนของยาปฏิชีวนะ เพราะการใช้โพรไบโอติกจะช่วยกำจัดเศษอาหาร ของเสียที่พื้นบ่อ รวมทั้งตะกอนและสารอินทรีย์ที่แขวนลอยอยู่ในน้ำให้เป็นสารอนินทรีย์ที่สามารถละลายน้ำได้ ส่งผลให้สารพิษบางชนิดที่เป็นพิษต่อสัตว์น้ำเปลี่ยนไปอยู่ในรูปที่ไม่เป็นพิษต่อสัตว์น เช่น การเปลี่ยนแอมโมเนียให้เป็นไนเทรต การเปลี่ยนก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ให้เป็นซัลเฟต ทำให้แพลงก์ตอนพืชได้รับแร่ธาตุ หรือปุ๋ย เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ แอมโมเนียไนเทรต และธาตุอาหารอื่นๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต นอกจากนี้การใช้โพรไบโอติกจะช่วยให้ระบบนิเวศของบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีคุณภาพดี ขี้เลนไม่สะสมในปริมาณมาก อีกทั้งการใช้โพรไบโอติกยังเป็นการใช้วิธีทางธรรมชาติมาช่วยลดและควบคุมปริมาณแบคทีเรียก่อโรคภายในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เช่น *Vibrio* โดยที่ไม่ต้องใช้สารเคมี ยาปฏิชีวนะในการเลี้ยงซึ่งทำให้ผลผลิตที่ได้ปลอดภัยต่อผู้บริโภคและไม่ทำลายสิ่งแวดล้อม แต่อย่างไรก็ตามการใช้โพรไบโอติกนั้นควรมีความเข้าใจในกลไกการทำงานของโพรไบโอติก เนื่องจากข้อเสียของการใช้โพรไบโอติกนั้นจะทำให้บ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่มีการสะสมของสารอินทรีย์ปริมาณมากหรือบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่มีอุณหภูมิสูงกว่า 28 องศาเซลเซียส เมื่อเติมโพรไบโอติกลงไปจะทำให้โพรไบโอติกเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว ส่งผลให้เกิดการแย่งก๊าซออกซิเจนกับสัตว์น้ำ โดยเฉพาะเวลากลางคืน เมื่อก๊าซออกซิเจนไม่เพียงพอสัตว์น้ำจะเกิดอาการเครียดและอาจก่อให้เกิดการติดเชื้อก่อโรคได้ รวมทั้งการเกิดกิจกรรมการย่อยสลายของเสียของโพรไบโอติกในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำโดยเฉพาะบริเวณกลางบ่อซึ่งมีการสะสมของขี้เลนในปริมาณมาก เมื่อสัตว์น้ำไปรวมกันบริเวณกลางบ่อและเมื่อหว่านอาหารไปยังบริเวณกลางบ่อจะทำให้สัตว์น้ำไม่ได้รับอาหาร ทำให้สัตว์น้ำไม่เจริญเติบโตหรือมีขนาดที่แตกต่างกันมาก

การใช้โพรไบโอติกเพื่อทำให้สัตว์น้ำแข็งแรงและทำให้การใช้ยาปฏิชีวนะลดลงหรือไม่ต้องใช้ยาปฏิชีวนะนั้นเปรียบเสมือนคนที่แข็งแรงย่อมไม่มีโรคมาเบียดเบียน แต่อย่างไรก็ตามความสำเร็จของการใช้โพรไบโอติกนั้นจะเริ่มต้นจากชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์เป็นอันดับแรก เพราะจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีธรรมชาติของการแข่งขันระหว่างชนิดหรือสายพันธุ์ของแบคทีเรียโพรไบโอติกกับเชื้อก่อโรคแตกต่างกัน รวมทั้งต้องมีปริมาณของโพรไบโอติกเพียงพอที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ ความเหมาะสมของโพรไบโอติกต่อชนิดของสัตว์น้ำและสภาวะแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงต้องมีความเหมาะสมด้วยเช่นกัน รวมทั้งผู้ดำเนินการต้องมีข้อมูลและเทคนิคในการใช้โพรไบโอติกที่ดี (Moriarty, 1999)

บทที่ 4 การพัฒนาจุลินทรีย์คุ้นถิ่น

จุลินทรีย์ท้องถิ่น หรือจุลินทรีย์คุ้นถิ่น หมายถึง จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในขอบเขตของระบบนิเวศนั้น ๆ ไม่ได้นำเข้ามาจากภายนอกระบบ ภายนอกท้องถิ่น ภายนอกเมือง ภายนอกประเทศ หรือภายนอกภูมิภาคโลกนั้น ๆ เรียกเป็นภาษาอังกฤษได้ว่า Indigenous Micro Organisms (IMO) เป็นจุลินทรีย์ที่ช่วยในการย่อยสลายอินทรีย์ ที่มีอยู่ในดินทั้งบนผิวดินและใต้พื้นดิน จัดเป็นจุลินทรีย์ที่อยู่ในประเภทจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ช่วยในการกำจัดจุลินทรีย์ที่ไม่มีประโยชน์ หรือจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโทษ (จุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเน่าเหม็นต่าง ๆ) สำหรับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญ ได้แก่จุลินทรีย์กลุ่มบาซิลลัสที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ หรือเป็นจุลินทรีน์กลุ่มบาซิลลัสที่มีการพัฒนา หรือนำมาจากแหล่งอื่นๆพัฒนาเพื่อประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และจุลินทรีย์เหล่านั้นสามารถปรับตัวอยู่ในสภาพธรรมชาตินั้นๆได้จนเป็นจุลินทรีย์คุ้นถิ่น เกษตรกร หรือนักวิชาการสามารถนำจุลินทรีย์ที่พบอยู่ในธรรมชาติ หรือในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำนำมาคัดเลือก โดยการคัดแยกจุลินทรีย์จากตัวอย่าง ดิน น้ำ สัตว์น้ำ จากในแหล่งน้ำธรรมชาติ และแหล่งเพาะเลี้ยงเพื่อให้ได้จุลินทรีย์ชนิดใหม่ๆ สามารถพัฒนา และทดสอบประสิทธิภาพการนำมาใช้ประโยชน์เป็นจุลินทรีย์ชนิดใหม่ทดแทนจากธรรมชาติได้ โดยการพัฒนาจุลินทรีย์คุ้นถิ่น ในเอกสารฉบับนี้ จะนำเสนอในส่วนของการคัดเลือกจุลินทรีย์คุ้นถิ่นจากตัวอย่างดินพื้นบ่อในฟาร์มเลี้ยงกุ้งทะเล โดยมีขั้นตอนการดำเนินการดังนี้

4.1 การเก็บตัวอย่างดินและการเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

เก็บตัวอย่างดินพื้นบ่อเลี้ยงกุ้งที่เลี้ยงด้วยจุลินทรีย์ตลอดการเลี้ยง โดยเก็บตัวอย่างดินใน 1 บ่อ จำนวน 5 จุด (ความลึกจากระดับผิวดินลงไปประมาณ 30 เซนติเมตร) โดยเก็บฟาร์มละ 3 บ่อ (ภาพที่3) แล้วนำดินที่เก็บได้ทั้งหมดมาผสมรวมกัน จากนั้นนำตัวอย่างดินมาชั่ง 10±0.1กรัม ผสมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 90 มิลลิลิตร เขย่าแรง ๆ 25-30 ครั้ง เพื่อให้ตัวอย่างดินผสมเป็นเนื้อเดียวกัน เจือจางที่ระดับ 10^{-1} ถึง 10^{-6} ดูดน้ำละลายดินที่ระดับความเจือจาง 10^{-4} ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA (Nutrient Agar) 0.1 มิลลิลิตร ทำการเกลี่ย (Spread plate) จนทั่วอาหารหรือจนอาหารแห้ง (ทำ 3 ซ้ำ) หลังจากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เลือกโคโลนีที่มีลักษณะเด่น ๆ สังเกตุจากลักษณะของโคโลนีที่แตกต่างกัน เช่น โคโลนีที่มีลักษณะกลม มีดอกขอบหยัก ขอบเรียบ มันวาวใส มันขาวขุ่น สีขาวขุ่นหน้าโคโลนีเยิ้ม เป็นต้น ทำการแยกโคโลนีในแต่ละลักษณะนำไปเลี้ยงให้บริสุทธิ์ โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA (Nutrient Agar) และอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Susrose) เพื่อดูเชื้อก่อโรคไปทีเดียวกัน ถ้าตรวจพบโคโลนีสีเขียวและสีเหลืองขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS จะทำการคัดออก (อรวรรณ์ และ คณะ 2556)

ภาพที่ 3 ลักษณะบ่อเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมของเกษตรกรที่สุ่มเก็บตัวอย่างดิน

4.2 ศึกษาสัณฐานวิทยาภายนอกของจุลินทรีย์

นำจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 4.1 มาทำการขีดเชื้อ (Streak plate) บนอาหาร เพื่อแยกเชื้อให้บริสุทธิ์อีกครั้ง บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง สังเกตลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของจุลินทรีย์ที่พบด้วยตาเปล่า บันทึกผล ขนาด และลักษณะสี

4.3 การเตรียมสไลด์จุลินทรีย์

นำห่วงถ่ายเชื้อ (Loop) เผาไฟจนแดง ทิ้งไว้ให้เย็น นำไปแตะหยดน้ำแล้วนำมาแตะวางบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด จากนั้นนำห่วงถ่ายเชื้อเผาไฟจนแดงทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำไปแตะเชื้อจุลินทรีย์ตัวอย่างมาผสมกันในหยดน้ำบนแผ่นสไลด์ที่เตรียมไว้ทำการเกลี่ยเชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่ในหยดน้ำบนแผ่นสไลด์ให้กระจายออกบาง ๆ ปล่อยสไลด์ทิ้งให้แห้ง จากนั้นทำให้เซลล์จุลินทรีย์ติดแน่นบนแผ่นสไลด์โดยวิธีใช้ความร้อน (Heat fixed) โดยนำแผ่นสไลด์ที่มีเซลล์จุลินทรีย์มาผ่านเปลวไฟอ่อน ๆ จากตะเกียงแอลกอฮอล์ประมาณ 5 - 6 ครั้ง จากนั้นปล่อยให้แผ่นสไลด์เย็นลงในอากาศแล้วนำแผ่นสไลด์ที่เตรียมได้ไปทำการย้อมสีแกรมแบคทีเรีย (พิมพร ทองเมือง 2558)

4.4 การย้อมแกรมเซลล์จุลินทรีย์

นำแผ่นสไลด์ที่ได้จากข้อ 4.3 มาหยดสี Crystal violet บนแผ่นสไลด์ ทิ้งไว้นาน 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำสะอาด จากนั้นหยด Gram iodine ลงบนแผ่นสไลด์ทิ้งไว้นาน 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำสะอาด และทำการล้างสีส่วนเกินออกโดยแช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 วินาที ล้างออกด้วยน้ำสะอาด จากนั้นหยดสี Safranin ให้ท่วมแผ่นสไลด์ ทิ้งไว้นาน 15-30 วินาที ล้างออกด้วยน้ำสะอาดปล่อยแผ่นสไลด์ทิ้งให้แห้งในอากาศ ทำการตรวจลักษณะของเซลล์และแกรมของจุลินทรีย์ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า โดยเซลล์จุลินทรีย์ที่เป็นแกรมบวก ติดสีม่วงหรือน้ำเงินของสี Crystal violet และเซลล์จุลินทรีย์ที่เป็นแกรมลบ ติดสีแดงหรือชมพูของสี Safranin (พิมพร ทองเมือง 2558)

4.5 การระบุสายพันธุ์เชื้อด้วยวิธี 16S rRNA gene

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นแกรมบวกติดสีม่วงหรือน้ำเงินของสี Crystal violet จากข้อ 4.4 มาทำให้บริสุทธิ์ โดยเลือกตัวแทนเชื้อจำนวน 1 โคโลนี เพื่อขยายปริมาณโดยการเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำโคโลนีเชื้อมาทำการสกัด genomic DNA แล้วนำไปทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ Primer สำหรับ 16S rRNA gene แล้วนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอด้วยวิธี DNA Sequencing หลังจากนั้นนำข้อมูล DNA Sequencing ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลเชื้อใน GenBank Database ตัวอย่างเชื้อบริสุทธิ์ ส่งจำแนกชนิดเชื้อที่หน่วยความร่วมมืองานวิจัยด้านวิทยาศาสตร์ชีวภาพและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งมหาวิทยาลัยมหิดลและมหาวิทยาลัยโอซากา(MU–OU : CRC) และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์โดยบริษัท Macrogen.Ibe

4.6 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* (Vp_{AHPND})

นำเชื้อ Vp_{AHPND} ที่แยกได้จากกุ้งขาวแวนนาไมที่ป่วยและเก็บในห้องปฏิบัติการ และ ผ่านการทดสอบและยืนยันเชื้อก่อโรคโดยเทคนิคทางพีซีอาร์ นำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA (Tryptic Soy Agar) ผสม 1.5 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในสภาพที่เขย่าตลอดเวลาที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที (rpm) จากนั้นนำไปปั่นให้ตกตะกอนที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที หลังจากนั้นทิ้งส่วนใส (Supernatant) และนำตะกอนของ

เชื้อ *Vp*$_{AHPND}$ ที่ได้ใส่ลงใน 1.5 เปอร์เซ็นต์ NaCl แล้วทำการประเมินปริมาณ *Vp*$_{AHPND}$ ที่ละลายอยู่โดยดูจากความสัมพันธ์ระหว่างค่าดูดกลืนแสง (Absorbance) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ซึ่งพบว่าปริมาณของเชื้อ *Vp*$_{AHPND}$ ที่มีค่า Absorbance เท่ากับ 1.0 มีความเข้มของเชื้อ *Vp*$_{AHPND}$ เท่ากับ 1.95x10^{8} CFU/ml จากนั้นทำการเตรียมความเข้มข้นของเชื้อ *Vp*$_{AHPND}$ ให้ได้ 2x10^{6} CFU /ml โดยใช้สารละลาย 1.5 เปอร์เซ็นต์ NaCl

4.7 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์บาซิลลัสชนิดที่แยกได้จากดินพื้นบ่อเลี้ยงกุ้ง

เขี่ยเชื้อจุลินทรีย์ที่ทราบชนิดจากการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว ลงในอาหาร NA ผสม 1.5 เปอร์เซ็นต์ NaCl ด้วยวิธี Streak plate จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และคัดเลือกโคโลนีเดี่ยว ๆ ไปเพาะเลี้ยงต่อในอาหาร NB (Nutrient broth) ผสม 1.5 เปอร์เซ็นต์ NaCl ตามวิธีในข้อ 4.6 ซึ่งพบว่าปริมาณจุลินทรีย์บาซิลลัสที่มีค่า Absorbance เท่ากับ 1.0 จะมีความเข้มข้นของจุลินทรีย์เท่ากับ 1.95.0x10^{8} CFU/ml จากนั้นจะทำการเตรียมความเข้มข้นของเชื้อจุลินทรีย์ให้ได้ 2x10^{6} CFU/ml โดยใช้สารละลาย 1.5 เปอร์เซ็นต์ NaCl

4.8 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์บาซิลลัส

ทดสอบความสามารถในการเจริญเติบโตเมื่ออยู่ในสภาวะความเป็นกรด-ด่าง (pH) สภาวะที่มีระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรค์ (NaCl) และสภาวะที่มีระดับอุณหภูมิแตกต่างกัน โดยนำสารละลายจุลินทรีย์จากข้อ 4.7 ที่มีความเข้มข้นของเชื้อจุลินทรีย์ที่ 2x10^{6} CFU/ml ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร มาใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton Broth (MHB) ผสม 1.5 เปอร์เซ็นต์ NaCl ปริมาณ 9.5 มิลลิลิตร ที่มีการปรับค่า pH เท่ากับ 4, 7, 10 และรวมถึง MHB ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรค์ 0, 0.5, 1, 2, 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาพที่มีการเขย่าตลอดเวลา นอกจากนี้ นำเชื้อจุลินทรีย์จากข้อ 4.7 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ไปใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ผสม 1.5 เปอร์เซ็นต์NaCl ปริมาตร 9.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่ 25, 30 และ 40 องศาเซลเซียส โดยจะตรวจสอบการเจริญเติบโตในเวลา 24 ชั่วโมง โดยแต่ละชุดการทดลองทำการทดลอง ๆ ละ 3 ซ้ำ

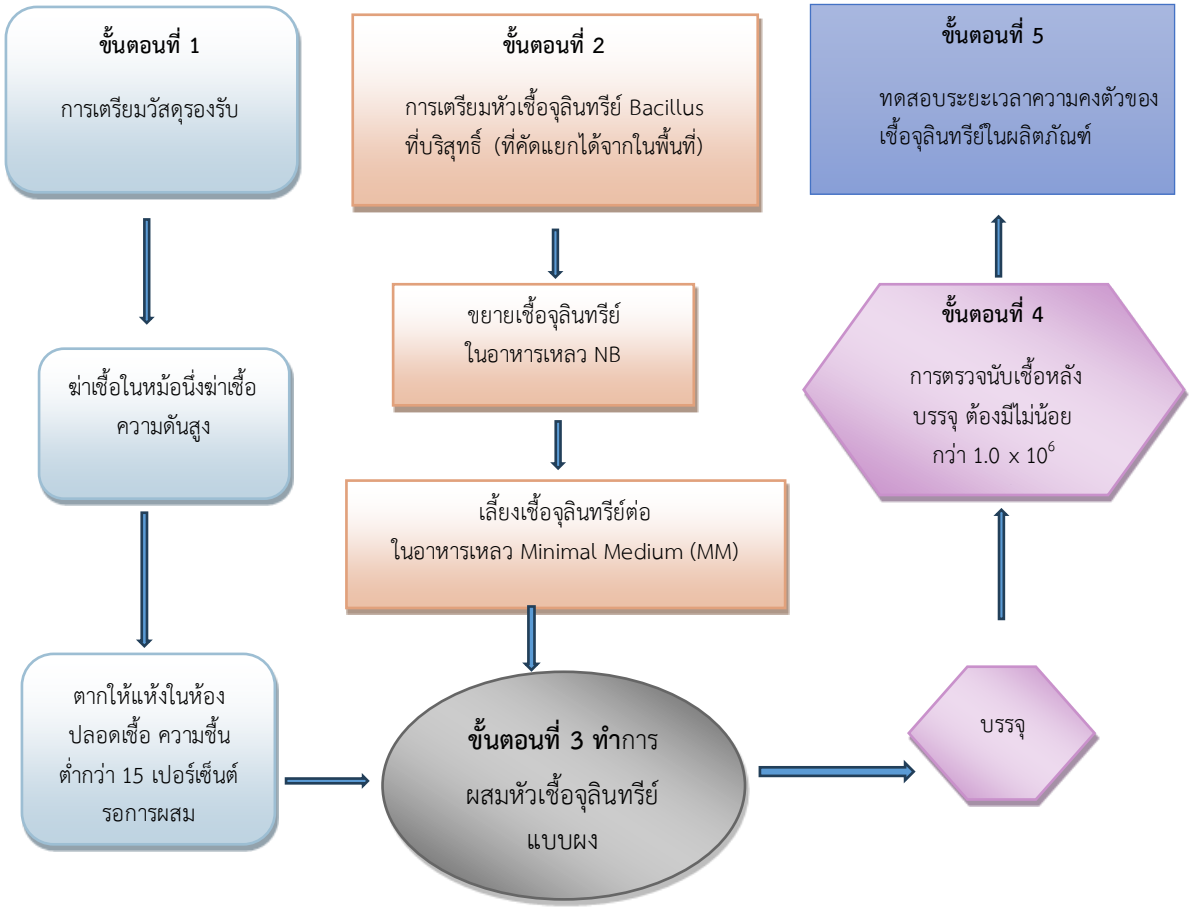
4.9 ศึกษาประสิทธิภาพในการครอบครองเชื้อ *Vp*$_{AHPND}$ ของจุลินทรีย์ด้วยวิธี Co – culture system

ดูดสารละลายแบคทีเรียและเชื้อจุลินทรีย์จากข้อ 4.6 และข้อ 4.7 มาชนิดละ 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นหยดสารละลายเชื้อ *Vp*$_{AHPND}$ และเชื้อจุลินทรีย์ใน 1 เปอร์เซ็นต์ MHB ที่มีความเข้มข้นของ 1.5 เปอร์เซ็นต์NaCl 9 มิลลิลิตร โดยชุดการทดสอบนี้จะใช้หลอดทดลองที่มีเฉพาะเชื้อจุลินทรีย์ชนิดใดชนิดหนึ่งเป็นกลุ่มควบคุม (Control) ชนิดละ 3 ซ้ำ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาพที่มีการเขย่าตลอดเวลา จากนั้นทุก ๆ เวลาที่ 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง นำสารละลาย 100 ไมโครลิตร มาทำการ Spread plate เพื่อประเมินจำนวนเชื้อ Vp$_{AHPND}$ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS และอาหารเลี้ยงเชื้อ NA agar จากนั้นทำการคำนวณปริมาณเชื้อ *Vp*$_{AHPND}$ และบาซิลลัส แล้วทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range tests (DMRT) ด้วยโปรแกรมทางสถิติ

4.10 คัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยสลายสารอินทรีย์ผลิตเป็นจุลินทรีย์ผง

คัดเลือกจุลินทรีย์บาซิลลัสที่คัดแยกได้จากพื้นที่เลี้ยงกุ้ง โดยคัดเลือกจุลินทรีย์ชนิดที่มีคุณสมบัติในการย่อยสลายสารอินทรีย์ มาผลิตเป็นจุลินทรีย์ชนิดน้ำเพื่อฉีดพ่นในวัสดุรองรับเป็นจุลินทรีย์ชนิดผง และจะเรียกจุลินทรีย์ชนิดผงนี้ว่าเป็น “ผลิตภัณฑ์”

ขั้นตอนการผลิตจุลินทรีย์ผง ประกอบด้วย 5 ขั้นตอน แสดงตามภาพที่ 4



ภาพที่ 4 ขั้นตอนการผลิตจุลินทรีย์ผง

4.11 การเตรียมวัสดุรองรับขั้นตอนการผลิตจุลินทรีย์ผง

1) การเตรียมสื่อผสม (ดินราชบุรี) ที่ต้องการทำจุลินทรีย์ผงมาชั่งน้ำหนักถุงละ 10 กิโลกรัม แล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันสูง ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที นำสื่อผสมไปตากในห้องปลอดเชื้อที่มีระบบดูดอากาศ ตากประมาณ 3-4 วัน หรือวัดความชื้นด้วยเครื่องมือวัดความชื้นให้ความชื้นอยู่ในระดับที่ต่ำกว่า 15 เปอร์เซ็นต์ เพื่อรอการผสม

2) การเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ (เชื้อที่คัดแยกได้จากในพื้นที่)

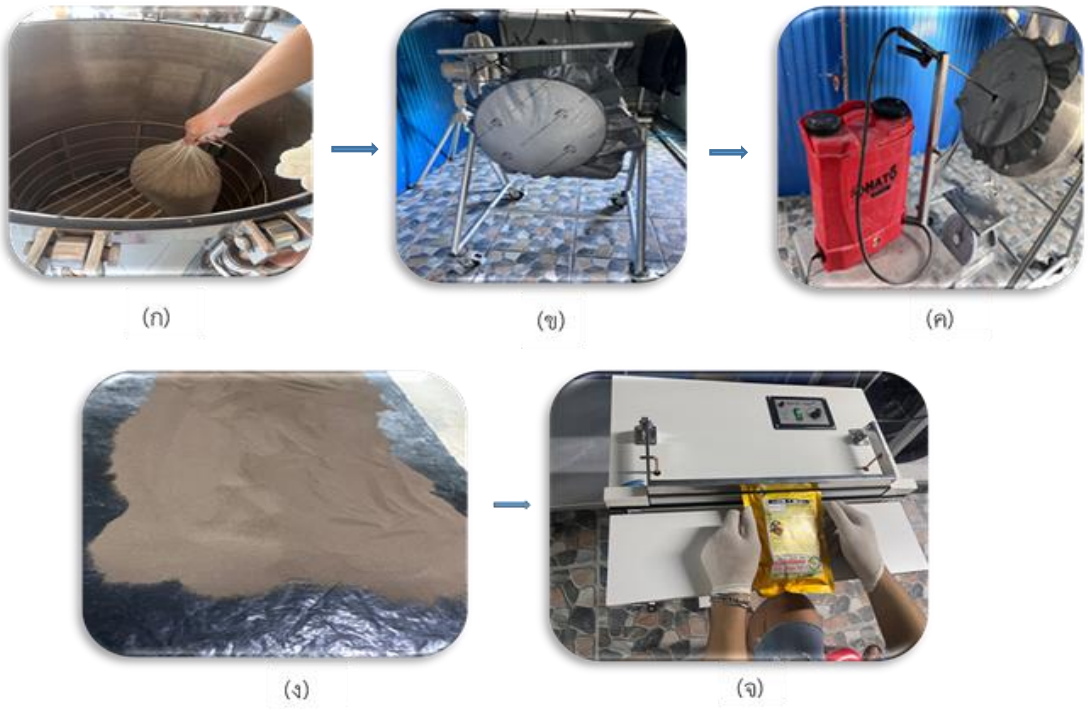
โดยนำ Stock จากหัวเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ (เชื้อที่คัดแยกได้จากในพื้นที่) ต่อลงบนอาหาร NAที่มี 1% NaCl บ่มที่อุณหภูมิ 32-35 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง เก็บเชื้อโคโลนีเดี่ยว ๆ ที่อยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA จำนวน 10-15 โคโลนี (ประมาณ 2 loop) เขี่ยลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มล. ที่มีอาหาร NB ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ปิดปากขวดรูปชมพู่ด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ แล้วพันทับด้วยแผ่นพาราฟิล์มเพื่อกัน

อลูมิเนียมฟอยล์ที่ปิดไว้หลุดระหว่างการเขย่า จากนั้นนำอาหารที่มีเชื้อจุลินทรีย์ไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตจากความขุ่นของอาหาร และปริมาณเชื้อในอาหารขยายต้องมีระดับความเข้มข้นที่10^9 cfu/ml

3) นำเชื้อจุลินทรีย์ที่ขยายได้แล้วไปเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณในอาหาร Minimal Medium (MM) ตามวิธีการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ (ปม.1) ในบทที่5 ใช้เวลาในการขยายหัวเชื้อจุลินทรีย์ประมาณ 24 - 36 ชั่วโมง จะได้หัวเชื้อจุลินทรีย์ขยายที่ระดับความเข้มข้นที่ 10^9 cfu/ml และนำไปใช้ในการผสมกับวัสดุรองรับ

4) ในการผสมหัวเชื้อจุลินทรีย์กับวัสดุรองรับ ทำความสะอาดและฆ่าเชื้ออุปกรณ์ทุกชิ้นด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ โดยเฉพาะสายปั๊มที่ใช้ฉีดหัวเชื้อ ต้องใช้น้ำเปล่าฉีดล้างเพื่อไล่แอลกอฮอล์ออกจากสายให้หมด นำหัวเชื้อจุลินทรีย์ชนิดที่คัดเลือกได้และขยายในสูตรอาหาร MM ระดับความเข้มข้นของเชื้อจุลินทรีย์ที่ 10^9 cfu/ml ใส่ในถังเครื่องพ่นละอองฝอย และฉีดพ่นในเครื่องโม่อัตโนมัติในอัตราสื่อผสม 50 กิโลกรัม : หัวเชื้อจุลินทรีย์น้ำ 10 ลิตร เครื่องพ่นอัตโนมัติจะหมุนไปเรื่อย ๆ จนกว่าน้ำจุลินทรีย์จะหมดจากถังพ่น และเครื่องโม่จะหมุนต่อไปอีก 20 นาที เพื่อให้น้ำจุลินทรีย์ผสมให้เข้ากันกับสื่อผสม

5) นำสื่อผสมที่มีหัวเชื้อจุลินทรีย์ผสมเข้ากันเรียบร้อยแล้ว มาตากในห้องปลอดเชื้อและมีระบบระบายอากาศเพื่อไล่ความชื้นอีกรอบ ตากให้แห้งใช้ระยะเวลาประมาณ 7 วัน หรือวัดระดับความชื้นลดลงเหลือ 15 เปอร์เซ็นต์ จึงสามารถนำมาบรรจุในถุงอลูมิเนียมฟลอยด์ในปริมาณซองละ 100 กรัม ในขั้นตอนนี้ หลังจากบรรจุในซองผลิตภัณฑ์แล้ว เก็บรักษาหัวเชื้อไว้ในตู้เย็นหรือในที่ร่มได้นาน 6 เดือน (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 ขั้นตอนการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ชนิดผง ก.นึ่งฆ่าเชื้อวัสดุรองรับ ข.วัสดุรองรับในเครื่องผสม ค.ฉีดพ่นน้ำจุลินทรีย์ในเครื่องผสม ง.วัสดุรองรับที่มีหัวเชื้อจุลินทรีย์ผสมตาก เพื่อไล่ความชื้นในห้องปลอดเชื้อ จ.บรรจุในถุงอลูมิเนียมฟลอยด์

4.12 การตรวจนับสปอร์ของจุลินทรีย์ชนิดผง

ในการผลิตจุลินทรีย์บาซิลลัสชนิดผง มีการควบคุมคุณภาพโดยการสุ่มตัวอย่างผลิตภัณฑ์เพื่อนำมาเพาะเชื้อและนับจำนวนโคโลนี ตลอดจนตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อชนิดวิบริโอ โดยปริมาณบาซิลลัสในซองผลิตภัณฑ์ ต้องมีปริมาณเชื้อบาซิลลัสไม่ต่ำกว่า 10^6 cfu/g วิธีการตรวจนับสปอร์ของจุลินทรีย์ชนิดผง ดังนี้

1) เตรียม 0.85 %NaCl (ซั่งโซเดียมคลอไรด์ 0.85 กรัม เติมน้ำกลั่นปรับให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร) แบ่ง 0.85 %NaCl ใส่ในหลอดทดลองหลอดละ 9 มิลลิลิตร จำนวนหลอดตามที่ต้องการ ปิดฝาหลอดหลวม ๆ จากนั้นนำไปอบฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นก่อนนำมาใช้งาน

2) เก็บตัวอย่างจุลินทรีย์ผงในซองผลิตภัณฑ์ ชั่งน้ำหนัก 1 กรัม ใส่ในหลอดที่มี 0.85 %NaCl ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน โดยการเขย่าหลอดนาน 15 วินาที หรือเขย่าโดยใช้เครื่อง Vortex mixer จะได้ความเข้มข้นที่ 10^{-1} นำตัวอย่างในหลอดที่ 1 ไปทำช็อกด้วยความร้อน (Heat shock) ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที โดยนำไปวางในบีกเกอร์ที่ใส่น้ำตั้งบนเครื่องให้ความร้อน หรือ อ่างควบคุมอุณหภูมิ จากนั้นทำการช็อกด้วยความเย็น (Cold shock) โดยนำมาแช่ในน้ำเย็นทันทีประมาณ 1 นาที หรือจนหลอดทดลองเย็น เพื่อให้ได้สปอร์ของเชื้อจุลินทรีย์ ดูดสารละลายจากหลอดที่ 1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดที่ 2 เขย่าให้เข้ากัน (ความเข้มข้น 10^{-2}) และทำการเจือจางต่อไปเรื่อย ๆ หรือที่เรียกว่า การทำ 10 fold serial dilution จนได้สารละลายที่ความเข้มข้นเท่ากับ 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} ตามลำดับ

3) ดูดสารละลายปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร จากหลอดที่มีความเข้มข้น 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} โดยใช้ Autopipette ปล่อยลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร NA (หลอดละ 3 ซ้ำ) จากนั้นใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมทำการเกลี่ยเชื้อให้ทั่ว บ่มเชื้อในจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจนับโคโลนีที่ขึ้นบนจานเพาะเชื้อ คำนวณเป็นค่า cfu/g ค่าที่ได้ต้องไม่น้อยกว่า 1.0×10^6 cfu/g จึงจะถือว่าผ่านมาตรฐาน

4.13 การทดสอบระยะเวลาความคงตัวของเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์

การทดสอบระยะเวลาความคงตัวของเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ โดยทำการสุ่มเลือกผลิตภัณฑ์มาจำนวน 12 ถุงทุกครั้งที่ผลิต และทำการทดสอบโดยการตรวจนับปริมาณสปอร์ของจุลินทรีย์ ตามวิธีการตรวจนับสปอร์ของจุลินทรีย์ชนิดผง ทุก ๆ 15 วัน เป็นระยะเวลา 6 เดือน เพื่อทดสอบระยะเวลาคงตัวของจุลินทรีย์เกณฑ์การยอมรับของผลิตภัณฑ์ ต้องตรวจพบปริมาณสปอร์ของจุลินทรีย์บาซิลลัสไม่น้อยกว่า 1.0×10^6 cfu/g ถึงจะผ่านเกณฑ์การยอมรับ

4.14 การตรวจวิเคราะห์และการทดสอบสารสำคัญในผลิตภัณฑ์

ผลิตภัณฑ์ของจุลินทรีย์ สำหรับปรับสภาพน้ำ หรือที่ทำขึ้นเพื่อป้องกัน กำจัด ทำลาย หรือควบคุมจุลชีพ ปรสิต พืช หรือสัตว์อื่นในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำ ผู้นำเข้าหรือผู้ผลิตจะต้องดำเนินการขอขึ้นทะเบียนวัตถุอันตรายกับกรมประมงก่อนดำเนินกิจการ รายการทดสอบที่สำคัญในการประกอบการขอขึ้นทะเบียน หรือการตรวจวิเคราะห์เพื่อให้มั่นใจถึงประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกมาสามารถลดปริมาณสารอินทรีย์รวม แอมโมเนีย และไนไตรท์ หรือการทดสอบหาประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อวิบริโอได้ ดำเนินการตรวจวิเคราะห์และทดสอบสารสำคัญดังนี้

การตรวจวิเคราะห์และทดสอบสารสำคัญของหัวเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ ส่งผลิตภัณฑ์เพื่อตรวจวิเคราะห์ ณ หน่วยความร่วมมือการวิจัย MU-OU:CRC คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยมหิดล

1) เตรียมตัวอย่างหัวเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์

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

2) ตรวจนับปริมาณแบคทีเรีย (Aerobic Plate Count)

นำตัวอย่างที่เตรียมไว้จากข้อ 1) ที่เจือจางด้วยความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เทลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar (PCA) โดยทำ 3 ซ้ำ ในแต่ละความเข้มข้น นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีตัวอย่างมาบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง เพื่อนำไปตรวจสอบปริมาณและลักษณะของโคโลนีต่อไป

3) ตรวจนับปริมาณเชื้อ *Bacillus* spp.(*Bacillus* Count)

นำตัวอย่างที่เตรียมไว้จากข้อ1) ที่เจือจางด้วยความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เทลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Agar (M152) โดยทำ 3 ซ้ำ ในแต่ละความเข้มข้น นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีตัวอย่างมาบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เพื่อนำไปตรวจสอบปริมาณและลักษณะของโคโลนีต่อไป (FDA BAM online,chapter 3)

4) การปนเปื้อนของยีสต์และรา

เตรียมตัวอย่างหัวเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์โดยชั่งตัวอย่างปริมาณ 25 กรัม ใส่ในถุงพลาสติก เติม 0.1 เปอร์เซ็นต์ Peptone Water (PW) ปริมาณ 225 มิลลิลิตร ผสมตัวอย่างด้วยเครื่องตีตัวอย่างให้กระจายทั่ว PW เป็นเวลา 2 นาที จนได้สารละลายตัวอย่างที่ระดับการเจือจาง 10^{-1} นำตัวอย่างสารละลายมาเจือจาง โดยปิเปตตัวอย่างที่เจือจาง 10^{-1} ปริมาตร1 มิลลิลิตร ผสมกับ PW ปริมาตร 9 มิลลิลิตร (เจือจาง 10^{-2}) เขย่าให้เข้ากันแล้วทำซ้ำในหลอดต่อไปจนถึงระดับการเจือจางที่ 10^{-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)

5) การระบุสายพันธุ์เชื้อด้วยวิธี 16S rRNA gen (ความยาวประมาณ 1500 เบส)

นำตัวแทนกลุ่มเชื้อจากการจำแนกเชื้อในผลิตภัณฑ์มาทำให้บริสุทธิ์ และเลือกตัวแทนเชื้อจำนวน 1 โคโลนี เพื่อขยายปริมาณโดยการเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้น นำเชื้อโคโลนีมาทำการสกัด genomic DNA และนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primers สำหรับ 16S rRNA gene แล้วนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอด้วยวิธี DNA sequencing หลังจากนั้นนำข้อมูล DNA sequencing ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลเชื้อใน GenBank Database

6) การทดสอบการไม่สร้างยาปฏิชีวนะของเชื้อ *Bacillus subtilis* ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์ด้วยวิธี Agar well diffusion assay ดังนี้

(6.1) การเตรียมตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียบ่งชี้ (indicator bacteria)

นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรียที่ใช้เป็นตัวบ่งชี้ 2 ชนิด ได้แก่ ชนิดแกรมบวก คือ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และชนิดแกรมลบ คือ *Escherichia coli* ATCC 25922 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Broth (MHB) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

(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 โดยเลี้ยงแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่เวลา 24, 48, และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ และนำตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที โดยแบ่งตัวอย่างที่เก็บได้ เป็น 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 ซึ่งผ่านการกรองด้วยแผ่นกรองขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร (µm)

(6.3) การทดสอบการยับยั้งเชื้อด้วยวิธี Agar well diffusion assay

นำเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบที่ใช้เป็นแบคทีเรียบ่งชี้ที่เตรียมไว้ มาปรับความเข้มข้นของเชื้อ Physiological Saline Solution 0.85 เปอร์เซ็นต์ (0.85% PSS) เทียบกับ 0.5 McFarland standard ให้ได้ปริมาณเชื้อ $1.5x10^8$ cfu/ml และใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อมาจุ่มลงในตัวอย่างแบคทีเรียบ่งชี้ เพื่อทาให้ทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA 1 ชนิดต่อ 1 จานอาหาร หลังจากนั้นใช้ Sterile cork borer (เส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร) เจาะหลุมจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA หยดตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ ที่ต้องการทดสอบ ทั้ง CP และ SP ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในหลุมที่เจาะเตรียมไว้ โดยมีตัวอย่างควบคุมชนิดpositive control เป็นยาปฏิชีวนะ (Ampicillin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และชนิด Negative control เป็น TSB ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร หลังจากนั้น นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อสังเกต Inhibition zone (มิลลิเมตร) แล้วบันทึกผล

4.15 การทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์บาซิลลัสในการควบคุมสารอินทรีย์ที่เป็นของเสียจากสิ่งขับถ่ายของกุ้งที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

ทำการทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในการควบคุมสารอินทรีย์ในของเสียสิ่งขับถ่ายจากการเลี้ยงกุ้งในห้องปฏิบัติการ โดยการทดสอบการควบคุมปริมาณแอมโมเนียรวมและไนไตรท์ในน้ำ โดยมีอุปกรณ์ และขั้นตอนการทดลอง ดังนี้

1) อุปกรณ์

- ชุดกระบอกเก็บดิน (Gravity core) หรือกระบอกเก็บสุญญากาศ
- กระดาษอลูมิเนียม (Aluminum foil)

- กระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman No. 1)
- ถ้วยทนความร้อน (crucible)
- ขวดเก็บตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร
- หลอดทดลอง
- โกร่งบดสาร
- ตู้กระจกทดลอง
- ถาดอะลูมิเนียม
- เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
- โถดูดความชื้น (desiccators)
- ตู้อบลมร้อน (hot-air over)
- ตู้เผาความร้อนสูง (furnace heater)
- เครื่อง Spectophotometer
- สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพน้ำ
- น้ำกลั่น
- หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave)

2) การเตรียมสารอินทรีย์

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

3) การเตรียมน้ำ

ก่อนนำน้ำมาใช้ในการทดลอง 7 วัน น้ำใช้ต้องผ่านการฆ่าเชื้อด้วยแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ 70 เปอร์เซ็นต์ ในระดับความเข้มข้น 25 ส่วนในล้านส่วน เปิดเครื่องให้อากาศตลอดเวลา เพื่อกำจัดคลอรีนที่หลงเหลืออยู่ออกจนหมด และใช้โพแทสเซียมไอโอไดด์ตรวจสอบน้ำว่าไม่มีคลอรีนหลงเหลืออยู่ พร้อมทั้งฆ่าเชื้ออุปกรณ์ที่นำมาใช้ด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

4) การเตรียมจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองเป็นผลิตภัณฑ์ชนิดผงที่แยกได้จากพื้นที่ที่มีคุณสมบัติในการย่อยสลายสารอินทรีย์ โดยใช้จุลินทรีย์ผง 200 กรัม และอาหารกุ้งบดละเอียด 200 กรัม ผสมในน้ำสะอาด 200 ลิตร แล้วให้อากาศเป็นระยะเวลา 36-38 ชั่วโมง ก่อนนำไปสาดลงบ่อ ซึ่งผลิตภัณฑ์นี้ประกอบด้วยจุลินทรีย์ ที่มีปริมาณจุลินทรีย์รวมมากกว่า หรือเท่ากับ 1.0×10^6 cfu/g

5) การดำเนินการทดลอง

5.1) สุ่มสารอินทรีย์จากข้อ 2) ไปวิเคราะห์ปริมาณสารอินทรีย์รวม (Total organic matter) และนำไปใส่ในตู้กระจกทดลองขนาด 40X70X40 ซม. ที่มีปริมาตร 110 ลิตร โดยใส่สารอินทรีย์ลงไปปริมาตรตู้ละ 20 ลิตร แล้วเติมน้ำให้ได้ปริมาตรตู้ละ 60 ลิตร จำนวน 20 ตู้ เก็บที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส มีเครื่องให้อากาศตลอดเวลา จากนั้นจึงเริ่มทำการทดลองโดยแบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 (กลุ่มควบคุม) ไม่มีการเติมผลิตภัณฑ์ในตู้กระจกทดลอง จำนวน 5 ตู้
กลุ่มที่ 2 (300 ลิตร/ไร่) เติมผลิตภัณฑ์ 0.19 มิลลิลิตรต่อลิตร จำนวน 5 ตู้
กลุ่มที่ 3 (500 ลิตร/ไร่) เติมผลิตภัณฑ์ 0.31 มิลลิลิตรต่อลิตร จำนวน 5 ตู้
กลุ่มที่ 4 (700 ลิตร/ไร่) เติมผลิตภัณฑ์ 0.44 มิลลิลิตรต่อลิตร จำนวน 5 ตู้
หมายเหตุ : คำนวณอัตราส่วนการเติมผลิตภัณฑ์ต่อพื้นที่ 1 ไร่ น้ำลึก 1 เมตร

5.2) เริ่มต้นสุ่มวิเคราะห์ปริมาณสารอินทรีย์รวมจากทุกกลุ่มการทดลอง หลังจากนั้นกลุ่มที่ 2, 3 และ 4 ใส่ผลิตภัณฑ์ในปริมาณดังที่กล่าวไว้ข้างต้น และทุก ๆ 7 วัน ในวันที่ 7, 14, และ 21 ของการทดลอง เก็บตัวอย่างตะกอนบริเวณก้นตู้นำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารอินทรีย์รวม โดยวิธี Ignition loss (Cunniff, 1995) ดังนี้

5.3) เก็บสารอินทรีย์บริเวณก้นตู้โดยใช้กระบอกเก็บสุญญากาศให้ได้สารอินทรีย์ในปริมาณรวม 2 กรัม ในแต่ละกลุ่มการทดลองมาอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน จากนั้นนำสารอินทรีย์ไปบดให้ละเอียดเพื่อนำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

5.4) นำเบ้าหลอม (crucible) ที่ผ่านการเผาที่อุณหภูมิ 450 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง เสร็จแล้วนำไปพักไว้ในโถดูดความชื้นเพื่อรอให้ crucible เย็นลง ทำการการชั่งน้ำหนัก crucible และจดบันทึกน้ำหนัก

5.5) นำตัวอย่างสารอินทรีย์ที่ผ่านการบดแล้ว มาชั่งลงใน crucible ที่ทราบน้ำหนัก จากนั้นนำตัวอย่างสารอินทรีย์ที่ชั่งได้ไปเผาที่อุณหภูมิ 550±50 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง เสร็จแล้วทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น นำ crucible ไปชั่งเพื่อหาน้ำหนักสารอินทรีย์หลังเผาแล้วคำนวณหาน้ำหนักที่หายไป และคำนวณหาค่า Total organic matter content (เปอร์เซ็นต์) โดยใช้สูตร

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

6) การวิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำ

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

บทที่ 5 การจัดตั้งห้องปฏิบัติการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์

กรมประมงได้มีการพัฒนาและส่งเสริมให้เกษตรกรใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ตั้งแต่ปี 2551 โดยได้ผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ ปม.1 สูตรแรกขึ้นมา เป็นการเร่งด่วนเพื่อช่วยเหลือเกษตรกรในช่วงที่ต้องประสบปัญหาการแพร่ระบาดของโรคตายด่วน (EMS) และใช้แก้ไขปัญหาด้านคุณภาพน้ำได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่อย่างไรก็ตาม เนื่องจากเชื้อก่อโรคยังคงทวีความรุนแรงมากขึ้น การใช้จุลินทรีย์ ปม.1 เพียงอย่างเดียวจึงไม่เพียงพอที่จะลดปัญหาการก่อโรค กรมประมงจึงได้มีการพัฒนาหัวเชื้อจุลินทรีย์ ปม.2 ในปี 2564 โดยมีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก (probiotic) ช่วยควบคุมแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหาร และผลิตเอนไซม์ช่วยในการย่อยอาหาร ทำให้กุ้งดูดซึมสารอาหารได้ดียิ่งขึ้น ส่งผลให้กุ้งมีความแข็งแรง และเจริญเติบโตได้ดี ลดปัญหาโรคตายด่วนจากเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

ปัจจุบันกรมประมงยังคงส่งเสริมให้เกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ของกรมประมงทั้ง ปม.1 และ ปม.2 อย่างต่อเนื่อง ซึ่งตั้งแต่ปี 2561 เป็นต้นมา กรมประมงยังได้ดำเนินโครงการสร้างทักษะและส่งเสริมอาชีพด้านการเกษตร กิจกรรมขยายฐานการผลิตจุลินทรีย์ โดยได้จัดตั้งหน่วยผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ของกลุ่มเกษตรกรที่มีความพร้อม จำนวน 20 หน่วย ปัจจุบันมีกลุ่มที่ยังดำเนินการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ จำนวน 18 หน่วย ครอบคลุมพื้นที่ 17 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดตราด จันทบุรี ระยอง นครปฐม กาญจนบุรี ราชบุรี ชุมพร ประจวบคีรีขันธ์ สุราษฎร์ธานี ระนอง ภูเก็ต ตรัง พังงา กระบี่ นครศรีธรรมราช พัทลุง และปัตตานี และในปี 2566 เพิ่มขึ้นอีกหนึ่งหน่วยผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ของกลุ่มเกษตรกรที่ประสบความสำเร็จ คือชมรมผู้เลี้ยงกุ้งฉะเชิงเทราที่ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากผู้ว่าราชการจังหวัด ในการจัดตั้งศูนย์ผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ และมีหน่วยงานของกรมประมงในพื้นที่ติดตามกำกับดูแลและให้การสนับสนุนด้านวิชาการ มีเป้าหมายมุ่งเน้นให้เกษตรกรเกิดการรวมกลุ่มและสามารถพึ่งพาตนเองได้ โดยในปีงบประมาณ 2566 กรมประมงตั้งเป้าหมายผลิตจุลินทรีย์ ปม.2 จำนวน 100,000 ซอง/ขวด เพื่อนำไปแจกจ่ายให้เกษตรกรได้นำไปใช้ในการจัดการระบบการเลี้ยงสัตว์น้ำต่อไป นอกจากนี้ยังคงมีกลุ่มเกษตรกรที่มีความประสงค์ที่จะรวมกลุ่มเพื่อจัดตั้งห้องปฏิบัติการเพื่อผลิตหัวเชื้อจุลินทรียืทั้งชนิดน้ำและชนิดผงเพื่อใช้ในการเลี้ยงกุ้งทะเลอย่างเพียงพอภายในกลุ่ม และมีความสนใจที่จะจัดตั้งห้องปฏิบัติการ ซึ่งสามารถศึกษาในขั้นตอนการจัดตั้งห้องปฏิบัติการโดยมีรายละเอียด และขั้นตอนดังนี้

5.1) คุณลักษณะของเครื่องมือ และวัสดุอุปกรณ์ในการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ ดังนี้

1.1) ตู้เขี่ยเชื้อ

- ขนาดของตู้ไม่ต่ำกว่า 1,100 x 500 x 500 มิลลิเมตรตัวเครื่องป้องกันสนิม
- พื้นที่ปฏิบัติการเป็นสแตนเลส เกรด 304 ประตูบานกระจก ปิด เปิด ขึ้นลงสะดวก
- ระบบกรองผ่าน HEPA filterมีหลอด UV สำหรับฆ่าเชื้อภายในตู้ มีคู่มือการใช้งาน
- ภายในตู้มีระบบไฟให้แสงสว่างใช้ไฟฟ้า 220 โวลต์ รับประกันเครื่องไม่น้อยกว่า 1 ปี

1.2) หม้อนึ่งฆ่าเชื้อระบบไอน้ำ

- ตัวหม้อทำด้วยสแตนเลส ความจุไม่น้อยกว่า 400 ลิตร
- เป็นหม้อนึ่งฆ่าเชื้อใช้ระบบแก๊สในการให้ความร้อน
- มีอุปกรณ์ในการควบคุมการทำงาน
- เกจวัดความดัน คอนโทรลวาล์ว เซฟตี้วาล์ว (safety valve)
- เกจวัดอุณหภูมิ หัวแก๊สและที่วางหัวแก๊ส
- ภายในหม้อมีตะแกรงทำด้วยสแตนเลส จำนวน 2 ใบ
  เส้นผ่าน ศูนย์กลาง 70 x 35 เซนติเมตร
- มีคู่มือการใช้งาน รับประกันเครื่องไม่น้อยกว่า 1 ปี
- อุปกรณ์ประกอบถังแก๊สขนาดไม่ต่ำกว่าแ 15 kg. ไม่น้อยกว่า 1 ถัง
  วาล์วปรับระดับความดันของถังแก๊ส จำนวน 1 อัน

1.3) หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ อัตโนมัติ

- มีขนาดไม่ต่ำกว่า 30 ลิตร
- ฆ่าเชื้อด้วยระบบแรงดันไอน้ำ แบบอัตโนมัติ
- หน้าจอแสดงตัวเลข อุณหภูมิและเวลา
- ตั้งเวลาได้ไม่น้อยกว่า 0 – 60 นาที
- มีสัญญาณเตือนเมื่อเครื่องขัดข้อง เช่น ระดับน้ำต่ำกว่าปกติ
- มีสัญญาณเตือนเมื่อสิ้นสุดการทำงาน
- มีเซฟตี้วาล์ว (safety valve) เพื่อป้องกันแรงดันในเครื่องสูงเกิน
- มีระบบป้องกันการเปิดฝาเครื่องขณะที่เครื่องมีแรงดันภายในสูง
- มีระบบระบายไอน้ำออกจากเครื่องอัตโนมัติ
- มีล้อสำหรับเคลื่อนที่
- มีตัวตัดระบบไฟ (breaker) เพื่อใช้เปิด-ปิด และตัดระบบไฟฟ้า เมื่อมีเหตุกระแสไฟฟ้าขัดข้อง
- ใช้ไฟฟ้า 220 โวลต์
- รับประกันไม่น้อยกว่า 1 ปี
- มีคู่มือการใช้งาน

อุปกรณ์ประกอบหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ

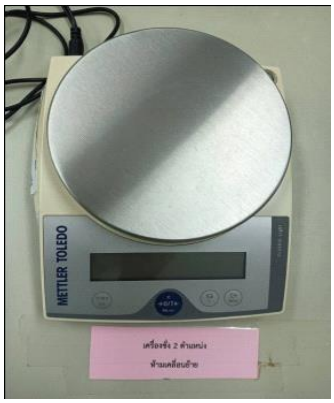
- ตะกร้าสแตนเลส2 ใบ
- ตะขอสแตนเลสสำหรับเกี่ยวตะกร้าออกจากเครื่อง เพื่อป้องกันความร้อนจากเครื่อง

1.4) เครื่องเขย่าแนวราบ พร้อมตัวยึด

- โครงสร้างป้องกันสนิม
- รัศมีการเขย่าไม่น้อยกว่า 15 มิลลิเมตร
- สามารถวางขวดชมพู่ (flask) ขนาด 50 มิลลิลิตร, 125มิลลิลิตร , 250 มิลลิลิตร , 500 มิลลิลิตร ได้ไม่น้อยกว่า 10 ใบ
- ใช้ไฟฟ้า 220 โวลต์ 50 เฮิรตซ์
- รับประกันไม่น้อยกว่า 1 ปี
- มีคู่มือการใช้งาน

1.5) เครื่องชั่งสาร ทศนิยม 2 ตำแหน่ง

- เป็นเครื่องช่างไฟฟ้า แสดงผลเป็นตัวเลขไฟฟ้า (Digital display)
- สามารถชั่งน้ำหนักได้ไม่น้อยกว่า 1 กิโลกรัม
- อ่านค่าได้ละเอียด (Readability) 0.01 กรัม
- ปุ่มการเปิด ปิดเครื่อง การปรับให้เป็นศูนย์ (Tare) และการสอบเทียบ (Calibration) เป็นระบบสัมผัส
- ใช้ไฟฟ้า 220 โวลต์ 50 เฮิรตซ์
- รับประกันอุปกรณ์และอะไหล่ไม่น้อยกว่า 1 ปี
- มีคู่มือการใช้งาน



1.6) ขวดทนความร้อน และความดัน

- ขวดแก้ว ขนาด 5 ลิตร
- สามารถทนความร้อนและแรงดันได้ไม่น้อยกว่า 121 องศาเซลเซียส และ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

1.7) ปั๊มลม

- เป็นแบบโรตารี่
- มีขนาดไม่น้อยกว่า 50 วัตต์
- ใช้ไฟฟ้า 220 โวลต์
- รับประกันไม่น้อยกว่า 1 ปี มีคู่มือการใช้งาน

1.8) ตู้เย็นสำหรับเก็บสต๊อกเชื้อจุลินทรีย์

- เป็นแบบ 2 ประตู
- มีขนาดไม่ต่ำกว่า 10.5 คิว
- ระบบ No frost (ไม่มีน้ำแข็งเกาะ)
- มีมาตรฐานประหยัดไฟ เบอร์ 5
- ใช้ไฟฟ้า 220 โวลต์
- รับประกันไม่น้อยกว่า 1 ปี
- มีคู่มือการใช้งาน

1.9) ตู้แช่ สำหรับเก็บหัวเชื้อจุลินทรีย์สูตรน้ำ

- เป็นตู้กระจก 2 ประตู
- ขนาดความจุ ไม่น้อยกว่า 20 คิว
- มีชั้นวางภายในไม่น้อยกว่า 8 ชั้น
- มีหลอดแสงสว่างภายในตู้
- อุณหภูมิ 0 ถึง 10 องศาเซลเซียส
- รับประกันเครื่องไม่น้อยกว่า 1 ปี
- รับประกันคอมเพรสเซอร์ไม่น้อยกว่า 5 ปี
- มีคู่มือการใช้งาน

1.10) ตู้บ่มเชื้อ

- ขนาดไม่น้อยกว่า 50 ลิตร
- สามารถควบคุมอุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิห้องตั้งแต่ 5 องศาเซลเซียส จนถึงไม่น้อยกว่า 60 องศาเซลเซียส
- ชั้นวางของ 2 ชั้น ปลอดสนิม
- สามารถตั้งเวลาทำงานได้
- มีระบบเตือนเมื่ออุณหภูมิสูงเกินค่าที่ตั้งไว้
- ใช้ไฟฟ้า 220 โวลต์
- รับประกันเครื่องไม่น้อยกว่า 1 ปี
- มีคู่มือการใช้งาน

1.11) โต๊ะสแตนเลส

- เป็นสแตนเลส เกรด 304 2. มีขนาดไม่ต่ำกว่า 140x80x80 เซนติเมตร

1.12) เครื่องปรับอากาศ

- ขนาดไม่ต่ำกว่า 18,000 btu
- ได้รับฉลากประหยัดไฟ เบอร์ 5 หรือดีกว่า
- รับประกันตัวเครื่องไม่น้อยกว่า 1 ปี
- รับประกัน คอมเพรสเซอร์ ไม่น้อยกว่า 5 ปี
- มีคู่มือการใช้งาน

1.13) เครื่องผสมสารแบบให้ความร้อน (Hot plate stirrer)

- เครื่องสามารถรับน้ำหนักได้ไม่น้อยกว่า 2 กิโลกรัม
- เครื่องสามารถให้ความร้อนในช่วง 60 ถึง 380 องศาหรือสูงกว่า
- อัตราเร็วในการกวนสาร 60 ถึง 1500 rpm หรือมากกว่า
- ใช้ไฟฟ้า 220 โวลต์
- รับประกันเครื่องไม่น้อยกว่า 1 ปี
- มีคู่มือการใช้งาน

1.14) เครื่องดูดจ่ายสารอัตโนมัติ (autopipette/micropipette)

- เป็นไมโครไปเปตชนิดปรับปริมาตรได้เป็นตัวเลข 4 หลัก ประกอบด้วย 3 ขนาด คือ 20 – 200 ,100 – 1,000 และ 500 – 5,000 ไมโครลิตร
- สามารถนึ่งฆ่าเชื้อได้ที่อุณหภูมิ 121 °C (20 นาที) ได้ทั้งเครื่องโดยไม่ต้องถอดแยกส่วน
- มีปุ่มสำหรับปลดทิป (Tip ejector) แยกต่างหากจากปุ่มดูด-จ่ายสารละลาย
- เป็นผลิตภัณฑ์จากผู้ผลิตที่ได้รับมาตรฐาน ISO 9001 : 2008
- ตัวเครื่องมีความแข็งแรง น้ำหนักเบา มีรูปทรงกระชับมือ แป้นกดเบา แรงมีแป้นสำหรับพักนิ้วมือ (Finger rest) เพื่อลดความเมื่อยล้าในการทำงาน
- รับประกันเครื่องไม่น้อยกว่า 1 ปี
- มีคู่มือการใช้

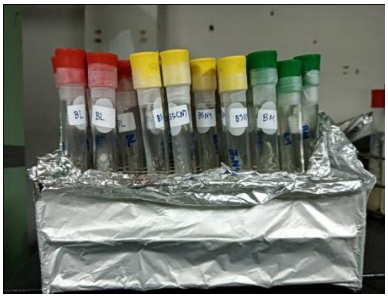
5.2 การผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ สูตรน้ำ

กรมประมงได้พัฒนาหัวเชื้อจุลินทรีย์ ปม. 2 ผลสำเร็จภายใต้ความร่วมมือกับสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) เป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก (Probiotic) มีประสิทธิภาพในการป้องกันและควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียใน ระบบทางเดินอาหารในสัตว์น้ำได้ดีขึ้น โดยเฉพาะ “กุ้งทะเล” ซึ่งมีโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารพิษ ทำให้เกิดโรคตายด่วนหรือ Vp_{AHPND} ส่งเสริมให้เกษตรกรใช้ตลอดสายการผลิตกุ้งทะเล ตั้งแต่การเตรียมบ่อ การเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ การอนุบาล จนถึงในระหว่างการเลี้ยง เพื่อลดความเสี่ยงของการเกิดโรค และ

เพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตกุ้งทะเล เพิ่มอัตรารอด ลดต้นทุน ให้กับเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งได้เป็นอย่างดี ศูนย์ศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบนอันเนื่องมาจากพระราชดำริ ได้เล็งเห็นประโยชน์และความสำคัญของจุลินทรีย์ ปม. 2 เพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล เพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอินทรีย์ การยับยั้งการเกิด ไบโอฟิล์ม (Biofilm) ของเชื้อก่อโรค Vp_{AHPND} ลดความเสี่ยงของการเกิดโรคกุ้งทะเลที่เป็นต้นทุนแฝงที่สำคัญช่วยลดการใช้ยาปฏิชีวนะและลดต้นทุนการใช้พลังงานในการรักษาคุณภาพน้ำในระบบของการเลี้ยงกุ้งทะเล คู่มือการผลิตจุลินทรีย์สูตรน้ำเป็นแนวทางและเป็นความรู้สำหรับผู้ที่สนใจนำไปผลิตและประยุกต์ใช้จุลินทรีย์สูตรน้ำ

ขั้นตอนที่ 1 การเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์

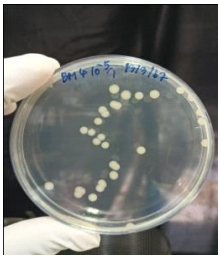
(1) เตรียมหลอดทดลองที่มีอาหาร Nutrient agar (NA) โดยวางหลอดให้เอียง (เพื่อให้มีพื้นผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อมากขึ้น) ให้มีจำนวนเพียงพอสำหรับการเก็บรักษาหัวเชื้อแบคทีเรียนาน 3 - 6 เดือน หรือจนถึง 1 ปี



(2) นำstock ของเชื้อ *Bacillus subtilis* (BS), *B.megaterium* (BM*)* และ *B. licheniformis* (BL) ในจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร TSA หรือ NA+1% NaCl บ่มที่อุณหภูมิ 32-35 °C นาน 18-24 ชั่วโมง

Bacillus licheniformis.

Bacillus subtilis.



Bacillus megaterrium.

(3) เลือกโคโลนีเดี่ยวๆ ของเชื้อ Bacillus แต่ละชนิด เขี่ยลงในหลอด stock เชื้อ ติดฉลากข้างหลอดเขียนระบุ ชนิดของเชื้อและวันเดือนปีที่เก็บเชื้อ

(4) บ่มที่อุณหภูมิ 32-35 °C นาน 18-24 ชั่วโมง

(5) พันปิดฝาหลอด stock อีกครั้งด้วยแผ่นพาราฟิล์ม (parafilm) แล้วนำไปเก็บไว้ในตู้เย็น 4 °C

ขั้นตอนที่ 2 การเตรียม Starter

(1) นำ Stock ของเชื้อ BS, BM และ BLจาก หลอด Stock เชื้อ ต่อลงบนเพลทอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA หรือ อาหาร NA + 1% NaCl (หลอด stock เชื้อแต่ละหลอดนำมาใช้ต่อขยายเชื้อเพียงครั้งเดียว ไม่ควรนำหลอด stock เชื้อเดียวกันมาต่อเชื้อหลายครั้ง) บ่มที่อุณหภูมิ 32 -35°C นาน 18 -24 ชั่วโมง

(2) เผาลวดเขี่ยเชื้อ (loop) ให้แดง และลนไฟเพื่อฆ่าเชื้อตรงก้านลวดเขี่ยเชื้อถึงบริเวณที่ต้องใส่ลงในขวดชมพู่ (flask) ตั้งไว้ให้เย็น แล้วนำไปเขี่ยเก็บเชื้อโคโลนีเดี่ยวๆ ที่อยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 10-15 โคโลนี (ประมาณ 2 loop) เขี่ยลงใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร nutrientbroth (NB) ปริมาณ 80 มิลลิลิตร

(3) ปิด flask ด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ แล้วพันทับด้วยแผ่นพาราฟิล์ม หรือยางเส้นเพื่อกันอลูมิเนียมฟอยล์ที่ปิดไว้หลุดระหว่างการเขย่า

(4) นำอาหารที่มีเชื้อไปเขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ขั้นตอนที่ 3 การเตรียมอาหาร Minimal Medium (MM)

(1) การเตรียม Minimal Medium (MM) ปริมาตร 8 ลิตร
โดยชั่งสารเคมีดังนี้

Sucroses	80.00 g
KH_2PO_4	20.00 g
K_2HPO_4	20.00 g
$(NH_4)_2HPO_4$	8.00 g
$MgSO_4\ 7H_2O$	1.60 g

(2) ละลายสารเคมีข้างต้น ด้วยน้ำกลั่นลงในบีกเกอร์ขนาด 2 ลิตรกวนให้เข้ากันด้วยเครื่องกวนสาร แล้วเทลงในขวด Duran ขนาด 10 ลิตร ที่มีน้ำกลั่นอยู่แล้ว 6 ลิตร จะได้ปริมาตรเท่ากับ 8 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ 400ลิตร ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที นำออกจากหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ 400 ลิตร ทิ้งไว้จนเย็น

(3) เตรียมอุปกรณ์เติมอากาศเพื่อนำไปฆ่าเชื้อประกอบท่อหลอดแก้วสำหรับอากาศเข้าและออก สายซิลิโคน จุกยาง ชุดกรองอากาศ (หลอดฉีดยาขนาด 50 มล. พร้อมสำลี และจุกยาง)

(4) ฉีกสำลีออกเป็นชิ้นๆ นำไปใส่ลงในหลอดฉีดยาขนาด 50 มล.จนเต็มหลอด (ไม่ต้องให้แน่นมาก) โดยชุดกรองนี้สามารถนำมาฆ่าเชื้อใช้ได้หลายครั้งจนกว่าสำลีจะเสื่อมสภาพอัดตัวแน่นอากาศผ่านได้ไม่ดี จึงทำการเปลี่ยนสำลีใหม่ (ข้อดีของการใช้หลอดกรองขนาดใหญ่คือทำให้เชื้อได้รับปริมาณออกซิเจนที่เพียงพอสามารถลดหรือเร่งการเจริญของเชื้อ *Bacillus* ได้ดี

(5) ห่ออุปกรณ์ด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ นำอาหารและอุปกรณ์ทั้งหมดไปนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 °C นาน 15 นาที

(6) หม้อฆ่าเชื้อภายใต้แรงดัน (Retort) กึ่งอัตโนมัติแบบแนวตั้ง

(7) เมื่อครบเวลาและความดันในหม้อนึ่งลดลงถึงความดันปกติเปิดฝาเอาอาหารและอุปกรณ์ออก อย่าทิ้งไว้ในหม้อนึ่งนานเพราะจะทำให้น้ำตาลในอาหาร MM ไหม้เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล นำขวดที่มีอาหาร MM ออกมาปิดฝาให้สนิท

(8) รอให้อาหารเย็น(สามารถพักไว้ข้ามคืน)เพื่อนำมาเติมแมงกานีส($MnSO_4.H_2O$)และเหล็ก($Fe_2SO_4.7H_2O$) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (นึ่งพร้อมอุปกรณ์) แล้วมาละลายด้วยน้ำกลั่นจนเป็นสารละลายเนื้อเดียวกัน

(9) ควรวางแผนการฆ่าเชื้อวัสดุอุปกรณ์และอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมาะสมเพื่อประหยัดเวลาและมีประสิทธิภาพ

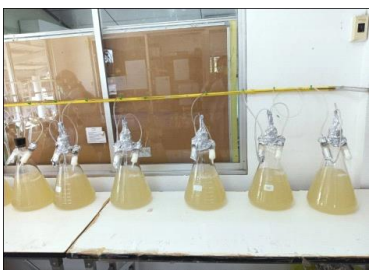
ขั้นตอนที่ 4 การผสมสาร และเชื้อ *Bacillus* ทั้ง 3 ชนิด แยกลงในอาหาร MM แต่ละขวด

(1) นำสำลีพันปากขวดเล็กน้อยสเปรย์75%แอลกอฮอล์พอชุ่มจุดไฟที่สำลีเพื่อป้องกันการปนเปื้อนระหว่างการเติมสาร และเชื้อจุลินทรีย์

(2) เติมสารละลายแมงกานีส และสารละลายเหล็กที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

(3) เติมหัวเชื้อ Starter ที่มีเชื้อ *Bacillus* แต่ละชนิด ปริมาณ 80 มิลลิลิตร ลงในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ MM. 8 ลิตร (อัตราส่วน 1:100) ขวดละ 1 ชนิด

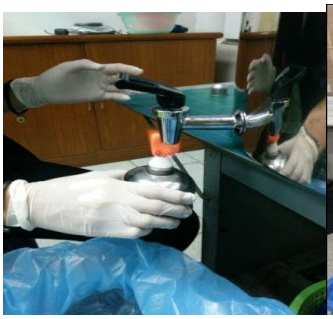
(4) เมื่อเทส่วนผสมครบแล้ว ปิดฝาขวดให้สนิทด้วยจุกยางและชุดกรองอากาศที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ใช้ forceps หรือที่คีบ นำสำลีที่ติดไฟใส่ลงในภาชนะที่มีน้ำอยู่เพื่อดับไฟ



(5) เติมอากาศโดยใช้ปั๊มลมเติมอากาศ ต่อเข้ากับชุดกรองอากาศที่เตรียมไว้ เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิห้องนาน ประมาณ 48- 72 ชั่วโมง

(6) ตรวจสอบจำนวนเชื้อให้มีไม่น้อยกว่า 10^8 CFU/ml (Total plate count technique)

(7) นำเชื้อทั้ง 3 ชนิดมาผสมรวมกันหรือบรรจุแยกเฉพาะเชื้อ BL ในคูลเลอร์สแตนเลสที่สะอาดผ่านการฆ่าเชื้อโดยฉีดและเช็ดด้วย 75% เอธานอล (ส่วนภายในหัวก๊อกควรใช้การแช่ด้วย 75% เอธานอล แล้วเปิดให้แอลกอฮอล์ไหลออก) เปิดหัวเชื้อจุลินทรีย์ ปม.1 ทิ้งออกก่อนประมาณ 50-100 มิลลิลิตร ก่อนนำมาบรรจุ ปม.1 ลงขวดในขั้นตอนต่อไป



(8) BL ใช้เป็นโปรไบโอติกเพื่อผสมอาหารในการป้องกัน หรือควบคุมโรคสัตว์น้ำจากเชื้อแบคทีเรีย เช่น EMS และโรคขี้ขาวในกุ้งทะเล หรือเชื้อ *Aeromonas*และ เชื้อ *Streptococcus* ในปลา

(9) บรรจุลงขวดพลาสติก พร้อมปิดฝาให้สนิท เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C (เก็บหัวเชื้อไว้ได้ 1-3 เดือน)

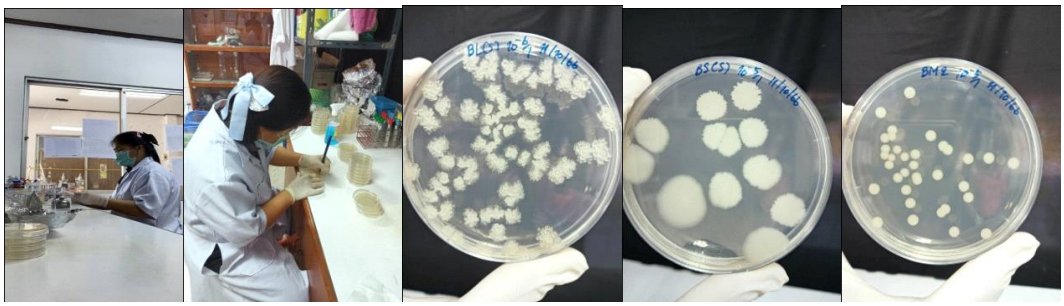
5.3 การตรวจสอบปริมาณหัวเชื้อจุลินทรีย์

อุปกรณ์

- หลอดทดลองขนาดบรรจุ ไม่น้อยกว่า 10 มิลลิลิตร
- เกลือ (Sodium chloride; NaCl)
- อาหารเลี้ยงเชื้อ NA (Nutrient agar) หรืออาหารเลี้ยงเชื้อ TSA (Trypticase soy agar)
- จานเพาะเชื้อ
- แท่งแก้วสามเหลี่ยม (Spreader)
- Autopipette ขนาด 1,000 ไมโครลิตร และ 100 ไมโครลิตร และ pipette tip
- ตะเกียงแอลกอฮอล์
- เครื่องชั่งดิจิตอล ทศนิยม 2 ตำแหน่ง
- ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)
- หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave)
- เครื่องผสมสาร (Vortex mixer)

วิธีการ

1. เตรียมน้ำเกลือเข้มข้น 0.85% (ชั่งโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 0.85 กรัม เติมน้ำกลั่นปรับให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร)
2. แบ่งน้ำเกลือจากข้อ 1 ใส่ในหลอดทดลอง หลอดละ 9 มิลลิลิตร จำนวนหลอดตามที่ต้องการ ปิดฝาหลอดหลวม ๆ จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 °C นาน 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นก่อนนำมาใช้งาน
3. สุ่มหัวเชื้อจุลินทรีย์ ปม.2 (BS, BM และ BL) ในอาหาร NB หรือในอาหาร MM จำนวน 3 ขวด ที่ทำการเลี้ยงครบระยะเวลาที่กำหนด มาตรวจสอบปริมาณเชื้อ BS, BM และ BL
4. เขย่าผสมหัวเชื้อจุลินทรีย์ในขวดประมาณ 10 วินาที เพื่อให้มีความเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นดูดตัวอย่างเชื้อ 1 มิลลิลิตร จากขวดจุลินทรีย์ โดยใช้ Autopipette ปล่อยลงในหลอดทดลองที่มีน้ำเกลือ 9 มิลลิลิตร (หลอดที่ 1) ผสมให้มีความเป็นเนื้อเดียวกัน โดยการเขย่าหลอดนาน 15 วินาที หรือเขย่าโดยใช้เครื่อง Vortex mixer (ความเข้มข้น 10^{-1}) และทำการเจือจางต่อไปเรื่อย ๆ หรือที่เรียกว่า การทำ 10 fold serial dilution จนได้สารละลายที่ความเข้มข้นเท่ากับ 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} และ 10^{-6}
5. ดูดสารละลายจากหลอดที่มีความเข้มข้น 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6} โดยใช้ Autopipette ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ปล่อยลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร NA หรืออาหาร TSA (หลอดละ 2 ซ้ำ) จากนั้นใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมทำการเกลี่ยเชื้อให้ทั่ว
6. บ่มเชื้อในจานเพาะเชื้อ ที่อุณหภูมิ 35 - 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
7. ตรวจนับโคโลนีที่ขึ้นบนจานเพาะเชื้อ คำนวณเป็นค่า CFU/ml (พร้อมถ่ายรูปลักษณะโคโลนี)
8. ค่าที่ได้ต้องมากกว่า 1.0 x 10^8 CFU/ml จึงจะถือว่าผ่านการตรวจวัด



5.4 การตรวจสอบปริมาณสปอร์ของหัวเชื้อจุลินทรีย์

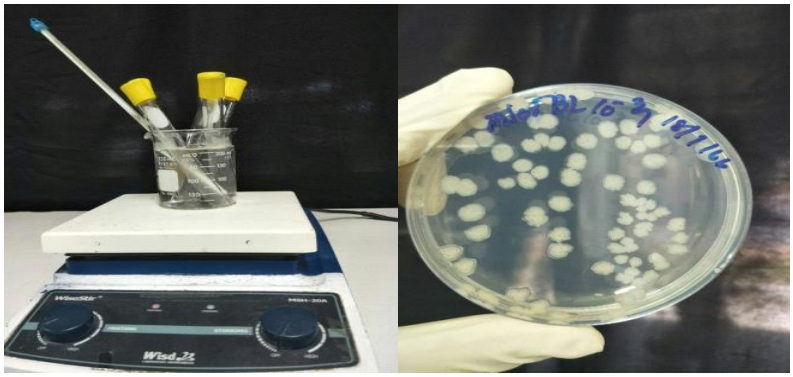
อุปกรณ์

- หลอดทดลองขนาดบรรจุ ไม่น้อยกว่า 10 มิลลิลิตร
- เกลือ (Sodium chloride; NaCl)
- อาหารเลี้ยงเชื้อ NA (Nutrient agar) หรืออาหารเลี้ยงเชื้อ TSA (Trypticase soy agar)
- จานเพาะเชื้อ
- แท่งแก้วสามเหลี่ยม (Spreader)
- Autopipette ขนาด 1,000 ไมโครลิตร และ 100 ไมโครลิตร และ pipette tip
- ตะเกียงแอลกอฮอล์
- บีกเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร
- เครื่องชั่งดิจิตอล ทศนิยม 2 ตาแหน่ง
- เครื่องให้ความร้อน (Hot plate)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)
- ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)
- หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave)
- เครื่องผสมสาร (Vortex mixer)

วิธีการ

1. เตรียมน้ำเกลือเข้มข้น 0.85% (ชั่งโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 0.85 กรัม เติมน้ำกลั่นปรับให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร)
2. แบ่งน้ำกลือจากข้อ 1 ใส่ในหลอดทดลอง หลอดละ 9 มิลลิลิตร จำนวนหลอดตามที่ต้องการ ปิดฝาหลอดหลวม ๆ จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 °C นาน 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นก่อนนำมาใช้งาน
3. สุ่มหัวเชื้อจุลินทรีย์ (BS, BM และ BL) ในอาหาร NB หรือในอาหาร MM จำนวน 3 ขวด ที่ทำการเลี้ยงครบระยะเวลาที่กาหนด มาตรวจสอบปริมาณสปอร์ของเชื้อ BS, BM และ BL
4. เขย่าผสมหัวเชื้อจุลินทรีย์ในขวดประมาณ 10 วินาที เพื่อให้มีความเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นดูดตัวอย่างเชื้อ 1 มิลลิลิตร จากขวดจุลินทรีย์ โดยใช้ Autopipette ปล่อยลงในหลอดทดลองที่มีน้ำเกลือ 9 มิลลิลิตร (หลอดที่ 1) ผสมให้มีความเป็นเนื้อเดียวกัน โดยการเขย่าหลอดนาน 15 วินาที หรือเขย่าโดยใช้เครื่อง Vortex mixer ความเข้มข้น 10^{-1}
5. นำตัวอย่างในหลอดที่ 1 ไปทำช๊อคด้วยความร้อน (Heat shock) ที่อุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 20 นาที โดยนำไปวางในบีกเกอร์ที่ใส่น้ำตั้งบนเครื่อง Hot pate หรือ Water bath จากนั้นทำช๊อคด้วยความเย็น (Cold shock) โดยนำมาแช่ในน้ำเย็นทันทีประมาณ 1 นาทีหรือจนหลอดทดลองเย็น เพื่อให้ได้สปอร์ของเชื้อแบคทีเรีย (มินตรา, 2552)
6. ดูดสารละลายจากหลอดที่ 1 ใส่ลงในหลอดที่ 2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน (ความเข้มข้น 10^{-2}) และทำการเจือจางต่อไปเรื่อย ๆ จนได้สารละลายที่ความเข้มข้นเท่ากับ 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5}
7. ดูดสารละลายจากหลอดที่มีความเข้มข้น 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} โดยใช้ Autopipette ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ปล่อยลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร NA หรืออาหาร TSA (หลอดละ 2 ซ้า) จากนั้นใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมทำการเกลี่ยเชื้อให้ทั่ว
8. บ่มเชื้อในจานเพาะเชื้อ ที่อุณหภูมิ 35 - 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

9. ตรวจนับโคโลนีที่ขึ้นบนจานเพาะเชื้อ คำนวณเป็นค่า CFU/ml (พร้อมถ่ายรูปลักษณะโคโลนี)
10. ค่าที่ได้ต้องมากกว่า 1.0 x 10^6 CFU/ml จึงจะถือว่าผ่านการตรวจวัด



5.5 การนำจุลินทร์ที่ขยายแล้วไปใช้ประโยชน์

การคัดเลือกจุลินทรีย์ในกลุ่ม Bacillus 3 ชนิด คือ *B. subtilis*, *B. megaterium* และ *B. licheniformis* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายสารอินทรีย์ ใช้สำหรับบำบัดสารอินทรีย์ที่ตกค้างสะสมในบ่อเลี้ยงสัตว์ นอกจากคุณสมบัตินี้แบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดนี้ยังมีคุณสมบัติสามารถนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกเพื่อกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสและแบคทีเรีย B. licheniformis ช่วยกระตุ้นระดับภูมิคุ้มกัน *B. megaterium* ยับยั้งการเจริญเติบโตและยับยั้งการทำลายเม็ดเลือดของ *V. harveyi* (Nakayama *et al*., 2009) และ *B. subtilis* สามารถย่อยสลายอินทรีย์ได้ดี และมีประสิทธิภาพในการย่อยได้ทั้งโปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต โดยเฉพาะในสภาพที่มีออกซิเจน ในขณะที่ *B. licheniformis* มีคุณสมบัติเช่นเดียวกับ *B. subtilis* โดยมีลักษณะพิเศษคือสามารถทำงานได้ดีทั้งในสภาพที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน จึงเหมาะที่จะใช้ในการย่อยสลายร่วมกับ *B. subtilis* และพบว่า *B. licheniformis* มีความสามารถในการย่อยโปรตีนที่มีโครงสร้างซับซ้อนที่ย่อยสลายได้ยาก เช่น เคราติน (keratin) ได้ดี นอกจากนี้มีการวิจัยนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกเพื่อใช้ในการเลี้ยงกุ้งขาวแบบพัฒนา พบว่าสามารถลดปริมาณเชื้อ *Vibrio* และเพิ่มปริมาณแบคทีเรียที่มีประโยชน์รักษาสมดุลย์ของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารรวมทั้งเพิ่มภูมิคุ้มกัน นอกจากนี้พบว่า *B. licheniformis* บางสายพันธุ์ยังเป็นพวก Denitrifiers สามารถเปลี่ยนไนเตรท (NO_3^-) ไปเป็นไนไตรท์ (NO_2^-) จนถึงก๊าซไนโตรเจน (N_2)

การนำแบคทีเรียที่มีอยู่ในหัวเชื้อจุลินทรีย์ ปม.1 และปม2. มาใช้เพื่อเป็นโปรไบโอติก เพื่อป้องกันโรคเป็นแนวทางหนึ่งในการลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคในกุ้งขาวแวนนาไมและยังช่วยลดการใช้ยาปฏิชีวนะ รวมถึงเป็นการใช้ประโยชน์จากผลิตพันธุ์หัวเชื้อจุลินทรีย์ได้อย่างเต็มที่ ทั้งการบำบัด การปรับปรุงคุณภาพน้ำและดิน จนถึงการใช้เพื่อกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันโรคและต้านการเกิดโรคที่เกิดจากแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งขาวแวนนาไม โดยเฉพาะการป้องกันและลดความเสียหายอันเกิดจากการตายของกุ้งก่อนวัยอันควรหรือกลุ่มอาการตายด่วน (EMS)

การเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์ (BS, BM และ BL) เพื่อใช้เป็นโปรไบโอติก

1) หัวเชื้อจุลินทรีย์ (BS, BM และ BL) 5 กรัม

2) น้ำตาลทรายแดง 20 กรัม

3) อาหารกุ้งบดละเอียด 10 กรัม

4) น้ำสะอาด 1 ลิตร

5) ผสมทุกส่วน ในภาชนะที่มีฝาหรือมีวัสดุปิดเช่นเพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อฝุ่นหรืออากาศ ให้อากาศปานกลาง เพียงพอให้ส่วนผสมทั้งหมดไม่ตกตะกอน ไม่ต้องเติมอากาศมากจนเกิดฟองอากาศกระจายเต็มภาชนะ ขยายหัวเชื้อเป็นเวลา 36 -72 ชั่วโมง

5.6 การนำน้ำขยายหัวเชื้อจุลินทรีย์ (BS, BM และ BL)มาใช้งาน

1) การใช้น้ำหัวเชื้อจุลินทรีย์ (BS, BM และ BL) มาเพิ่มคุณค่าของอาร์ทีเมีย (artemia) โดยนำน้ำขยายหัวเชื้อจุลินทรีย์มากรองผ่านผ้าขาวบาง นำน้ำที่มีเชื้อจุลินทรีย์ใสในในถังที่มีอาร์ทีเมีย ระยะ instar I ให้อากาศเต็มที่นาน 6 - 24 ชั่วโมง จึงนำมาเป็นอาหารลูกกุ้งวัยอ่อน

2) การใช้น้ำหัวเชื้อจุลินทรีย์ (BS, BM และ BL) ผสมกับอาหารกุ้งสำเร็จรูป ประมาณ 10-20 มิลลิลิตร หรือคลุกกับอาหารให้พอหมาดอาหารไม่เปียกจนติดเป็นก้อน นำไปให้กุ้งกินทุกมื้อจนถึงลูกกุ้งอายุ 30-60 วัน หรือจนกว่าจะพ้นระยะเสี่ยงของการเกิดโรค

3) การใช้น้ำหมักสับปะรดเพื่อป้องกันโรคตายด่วน และโรคขี้ขาว

การนำน้ำหมักสับปะรดมาใช้ผสมอาหารให้กุ้งกิน สับปะรดประกอบไปด้วยสารอาหารที่ช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน เช่น มีวิตามินซีและวิตามินบีสูง และที่สำคัญมีเอนไซม์บรอมีเลน (Bromelain) ช่วยยับยั้งการอักเสบ มีฤทธิ์ช่วยในระบบการย่อยอาหาร ช่วยย่อยโปรตีนจากถั่วเหลืองซึ่งเป็นส่วนผสมสำคัญของอาหารกุ้งได้ดี สามารถย่อยโปรตีนให้มีโมเลกุลเล็กลง ช่วยในการสมานแผลในกระเพาะอาหาร pH ที่ต่ำประมาณ 4-5 ของน้ำสับปะรด ช่วยลดหรือยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย โดยเฉพาะกลุ่มวิบริโอได้ดี เช่น *Vibrio parahaemolyticus*, *V. harveyi, V. cholerae* เป็นต้น ทำให้ลดการติดเชื้อแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอระบบทางเดินอาหาร เพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในระบบทางเดินอาหาร ลดการเกิดการตายด่วนของกุ้งที่เกิดจากเชื้อวิบริโอ รวมทั้งอาการขี้ขาวที่เกิดจากการอักเสบของลำไส้ ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการนำพาสารอาหาร เข้าสู่เนื้อเยื่อในร่างกาย นอกจากนี้สับปะรดยังประกอบด้วย เบต้าแคโรทีน แมงกานีส ปริมาณมาก

การเตรียมน้ำหมักจากสับปะรด

สับปะรดสุกหรือสุกปานกลาง 2 ส่วน สับหรือปั่นบดละเอียด (เนื้อและแกนสับปะรด) ผสมกับกากน้ำตาลหรือน้ำตาลทราย 1 ส่วน น้ำสะอาด 3 ส่วน เช่น สับปะรด 2 กิโลกรัม + กากน้ำตาลหรือน้ำตาลทราย 1 กิโลกรัม น้ำสะอาด 3 ลิตร ส่วนผสมทั้งหมดผสมให้เข้ากัน หรือกรณีที่พบตับ/ตับอ่อนกุ้งซีด หรือผิดปกติ มีเชื้อวิบริโอจำนวนมาก ให้เพิ่มอัตราส่วนของสับปะรด เป็น 2-3 ส่วนผสมกับกากน้ำตาลหรือน้ำตาลทราย 1 ส่วน น้ำสะอาดลดเหลือ 1 ส่วน ใส่ในภาชนะที่ทนกรดได้ หรือถ้าเป็นพลาสติกคุณภาพบรรจุอาหารได้ทนกรด และควรเป็นสีขาวหรือไม่มีสีฉูดฉาด หรือซ้อนถุงพลาสติกไว้ข้างใน เพื่อป้องกันการละลายออกของ

สารเคมีจากสภาพที่เป็นกรด ปิดฝาให้สนิทหมักไว้ประมาณ 5-14 วัน หรือจนกว่าน้ำหมักจะมีกลิ่นหอม หรือมี pH ประมาณ 4-5 (ในระหว่างการหมัก จะเกิดแก๊สในถังหมัก ให้เปิดฝาเพื่อระบายแก๊สและคนส่วนผสมเบาๆ และรีบปิดฝาถังเพื่อป้องกันไม่ให้ออกซิเจนลงไปในถังหมัก) เมื่อครบกำหนดและนำมาใช้งานดังนี้

1) นำน้ำหมักมากรองเฉพาะส่วนน้ำมาผสมกับอาหารกุ้งสำเร็จรูป 10-20 มิลลิลิตรหรือให้พอหมาดๆ อาหารไม่เปียกจนจับเป็นก้อน

2. ผสมให้กุ้งกินตั้งแต่เริ่มลงเลี้ยงในบ่อดิน จนถึงอายุ 30 วัน

5.7 การใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์เพื่อบำบัดคุณภาพน้ำและดิน สูตรของกรมประมง

การเตรียมบ่อ

1) หลังจากจับกุ้งกรณีมีการสะสมของเลนและของเสียในบ่อมากให้กำจัดของเสียออก

2) ตากบ่อให้แห้งสนิท กรณีที่ดินเป็นกรดให้ทำการบำบัดเลนโดยไม่ต้องตากบ่อให้แห้ง

3) บำบัดพื้นบ่อโดยนำน้ำเข้าบ่อลึกประมาณ 30-50 เซนติเมตร หรือมีความลึกเพียงพอที่อุปกรณ์ที่ใช้ในการลากโซ่ คราด ไถพรวน เป่าเลน หรืออุปกรณ์อื่นที่ช่วยในการผสมเลน สารอินทรีย์ น้ำและออกซิเจน เพื่อให้สารพิษที่สะสมในดินละลายออกมาสัมผัสกับน้ำและออกซิเจน และจุลินทรีย์ที่อยู่ในดินเจริญขึ้นมา

4) ขยายหัวเชื้อจุลินทรีย์ (ปม1 หรือปม.2) สาดให้ทั่วบ่อในอัตรา 100 ลิตร ต่อไร่ (หัวเชื้อจุลินทรีย์ 100 กรัม + กากน้ำตาล 500 มิลลิลิตร + อาหารกุ้ง 500 กรัม + น้ำสะอาด 250 ลิตร ให้อากาศเบาๆ นาน 36-72 ชั่วโมง)

5) ลากโซ่หรืออุปกรณ์อื่นๆ ตามข้อ 3 ให้ทั่วพื้นบ่อวันละ 3-4 รอบ จนกว่าระดับ pH ของน้ำบริเวณพื้นบ่อที่ลดลงในช่วงแรกสูงขึ้นประมาณ 8 และตรวจไม่พบแอมโมเนีย เป็นเวลา 1-4 สัปดาห์ ขึ้นอยู่กับปริมาณสารอินทรีย์ที่สะสมอยู่

6) เติมน้ำที่ผ่านการพัก บำบัด และกรองเข้าสู่บ่อจนถึงระดับที่ใช้เลี้ยง

7) เตรียมอาหารธรรมชาติ

8) น้ำในบ่อมีสีเขียวอ่อน หรือน้ำตาลอ่อน pH ของน้ำควรอยู่ในช่วง 7.8-8.3 ปล่อยลูกกุ้งที่ผ่านการทดสอบตามมาตรฐานของกรมประมงลงเลี้ยง

9) ผสมอาหารเม็ดสำเร็จรูปกับน้ำขยายหัวเชื้อจุลินทรีย์ หรือน้ำหมักสับปะรด คลุกให้เข้ากันพอหมาดๆ อาหารไม่ติดกันเป็นก้อน พักไว้ 10-30 นาที ผสมให้กินทุกมื้อจนกุ้งอายุ 30-60 วันหรือจนกว่าจะไม่มีความเสี่ยงของการเกิดโรค

10) สาดน้ำขยายหัวเชื้อจุลินทรีย์ให้ทั่วบ่อในอัตรา 50 ลิตรต่อไร่ อาทิตย์ละ 1-2 ครั้ง กรณีพบกุ้งตายด้วยด้วยสาเหตุจาก EMS ให้งดอาหาร เพิ่มการตีน้ำ ปรับปรุงคุณภาพน้ำ เติมแร่ธาตุให้เหมาะสม และใส่น้ำขยายหัวเชื้อจุลินทรีย์ สาดให้ทั่วบ่อในอัตรา 50 ลิตร ต่อไร่ ทุกๆ 2 วัน

5.8 การใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์เพื่อบำบัดคุณภาพน้ำและดิน สูตรของชมรมผู้เลี้ยงกุ้ง

1) ชนิดของเชื้อ *Bacillus subtilis* ชนิดน้ำขนาด 300 มิลลิลิตร หรือ ชนิดผงขนาด 200 กรัม

<u>คุณสมบัติ</u>

- ลดปริมาณสารอินทรีย์และควบคุมปริมาณแอมโมเนีย
- ใช้เป็นโปรไบโอติก มีเอนไซม์โปรติเอสช่วยในระบบการย่อยอาหารของกุ้ง

<u>วิธีการหมักขยาย</u>

นำจุลินทรีย์ชนิดน้ำหรือชนิดผงใส่ลงในน้ำสะอาด หรือน้ำประปาที่เป่าไล่คลอรีนแล้วประมาณ 6 ชั่วโมง จำนวน180-200 ลิตร ปรับความเค็มน้ำในถังหมักขยายให้ใกล้เคียงกับความเค็มน้ำในบ่อโดยใช้เกลือป่น (เกลือป่น 1 กิโลกรัม ให้ความเค็มน้ำประมาณ 5 พีพีที เกลือป่น 2 กิโลกรัม (ให้ความเค็มน้ำประมาณ 10 พีพีที) ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรสำเร็จรูปของชมรม 1 ซอง ให้ออกซิเจนตลอด 24 ชั่วโมง หรือจนกว่า pH ของน้ำหมักได้ 4.5-5 สามารถลงในบ่อกุ้งได้เวลาประมาณ 9.00-10.00 น.

<u>อัตราการใช้</u>

ใส่จุลินทรีย์ที่หมักขยายแล้วประมาณ 100-200 ลิตร/ไร่ หรือตามปริมาณแอมโมเนียที่เกิดขึ้นในบ่อเลี้ยง ใส่วันเว้นวัน หรือใส่ทุกวันในกรณีกุ้งโตกินอาหารปริมาณมาก หรือปรีมาณแอมโมเนียเกิน 0.2 พีพีเอ็ม

2) ชนิดของเชื้อ *Bacillus subtilis* (BS), *B. megaterium* (BM) และ *B. licheniformis* (BL)

ชนิดน้ำขนาด 300 มิลลิลิตร หรือ ชนิดผงขนาด 200 กรัม

<u>คุณสมบัติ</u>

- ลดปริมาณสารอินทรีย์และควบคุมปริมาณแอมโมเนีย ลด pH ของน้ำ
- ใช้เป็นโปรไบโอติก ลดและควบคุมเชื้อก่อโรคในน้ำและในตัวกุ้ง
- ลดปริมาณฟอสเฟตในน้ำ

<u>วิธีการหมักขยาย</u>

นำจุลินทรีย์ชนิดน้ำหรือชนิดผงใส่ลงในน้ำสะอาดหรือน้ำประปาที่เป่าไล่คลอรีนแล้วประมาณ 6 ชั่วโมง 180-200 ลิตร ปรับความเค็มน้ำในถังหมักขยายให้ใกล้เคียงกับความเค็มน้ำในบ่อเลี้ยง กรณีหมักขยายลงบ่อเลี้ยงกุ้งในระบบความเค็มต่ำ จะใช้เกลือป่น (เกลือป่น 1 กิโลกรัม ได้ความเค็มน้ำ 5 พีพีที. เกลือป่น 2 กิโลกรัม ได้ความเค็มน้ำ 10 พีพีที.) ใส่น้ำตาลทรายหรือเดกซ์โตสโมโนไฮเดรต 0.5 กิโลกรัม อาหารกุ้งเบอร์เล็ก 200 กรัม หรือใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรสำเร็จรูปของชมรม 1 ซอง หมักขยาย 24 ชั่วโมง ให้ออกซิเจนระดับปานกลางจนกว่าน้ำในถังหมักขยายได้ pH 4.5-5 ก็สามารถใส่ลงในบ่อเลี้ยงได้ในเวลา 9.00-11.00 น.

<u>อัตราการใช้</u>

ใส่จุลินทรีย์ที่หมักขยายแล้วประมาณ 100-200 ลิตรต่อไร่ หรือตามปริมาณของเสียในบ่อที่เกิดขึ้น กุ้งเล็กใส่วันเว้นวัน กุ้งใหญ่ใส่ทุกวัน กรณี pH ของน้ำสูงกว่า 8.2 ตอนบ่ายโมง ให้ใช้จุลินทรีย์หมักขยายร่วมกับกากน้ำตาล 5 กก.ใส่ตอน 19.00 น. ของทุกวันจน pH กลับมาปรกติอยู่ในช่วง 7.8-8.2

3) ชนิดของเชื้อ Lactobacillus **(**พบในน้ำหมักสับปะรดในฟาร์มกุ้งจังหวัดฉะเชิงเทรา**)**

ชนิดน้ำขนาด 300 มิลลิลิตร หรือ ชนิดผงขนาด 200 กรัม

คุณสมบัติ

-ลดปริมาณเชื้อก่อโรคโดยเฉพาะเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* (Vp_{AHPND}) ในน้ำ และใช้เป็นโปรไบโอติกลดปริมาณเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ในตัวกุ้ง

วิธีการหมักขยาย

นำจุลินทรีย์ชนิดน้ำหรือชนิดผงใส่ลงในน้ำสะอาดหรือน้ำประปาที่เป่าไล่คลอรีนแล้วประมาณ 6 ชั่วโมง น้ำ 180 -200 ลิตรปรับความเค็มน้ำในถังหมักขยายให้ใกล้เคียงกับความเค็มน้ำในบ่อเลี้ยง กรณีหมักขยายลงบ่อเลี้ยงกุ้งในระบบความเค็มต่ำ จะใช้เกลือป่น (เกลือป่น 1 กิโลกรัม ได้ความเค็ม 5 พีพีที เกลือป่น 2 กิโลกรัม ได้ความเค็ม 10 พีพีที) เดกซ์โตสโมโนไฮเดรต 0.5 กิโลกรัม นมจืด 200-400 มิลลิลิตร คนส่วนผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ 24 ชั่วโมงโดยไม่ต้องเป่าออกซิเจน หรือจนกว่าน้ำหมักขยายในถังได้ pH 4.5-5 ใส่ลงในบ่อเลี้ยงได้สองเวลาคือ 9.00-11.00 น. หรือในเวลา 19.00 น.

อัตราการใช้

จุลินทรีย์ที่หมักขยายแล้วประมาณ 100-200 ลิตรต่อไร่หรือตามความเข้มข้นของเชื้อก่อโรคที่เกิดขึ้นในบ่อ และในตัวกุ้ง

4) ชนิดของเชื้อ Lactobacillus และ *Bacillus subtilis* (BS),

ชนิดน้ำขนาด 300 มิลลิลิตร หรือ ชนิดผงขนาด 200 กรัม

คุณสมบัติ

- ลดปริมาณเชื้อก่อโรคโดยเฉพาะกลุ่มวานิฟิคัส และแอลจิโนไลทิคัสในน้ำ
- ใช้เป็นโปรไบโอติกเพื่อลดเชื้อกลุ่มวานิฟิคัส และแอลจิโนไลทิคัสในระบบทางเดินอาหารของกุ้ง

วิธีการหมักขยาย

นำจุลินทรีย์ชนิดน้ำหรือชนิดผงใส่ลงในน้ำสะอาดหรือน้ำประปาที่เป่าไล่คลอรีนแล้วประมาณ 6 ชั่วโมง น้ำ 180 -200 ลิตร ปรับความเค็มน้ำในถังหมักขยายให้ใกล้เคียงกับความเค็มน้ำในบ่อเลี้ยง กรณีหมักขยายลงบ่อเลี้ยงกุ้งในระบบความเค็มต่ำ โดยใช้เกลือป่น (เกลือป่น 1 กิโลกรัม ได้ความเค็ม 5 พีพีที เกลือป่น 2 กิโลกรัม ได้ความเค็ม 10 พีพีที) เดกซ์โตสโมโนไฮเดรต 0.5 กิโลกรัม นมจืด 200-400 มิลลิลิตร คนส่วนผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง โดยไม่ต้องเป่าออกซิเจน หรือจนกว่าน้ำหมักขยายในถังได้ pH 4.5-5 ใส่ลงในบ่อเลี้ยงได้สองเวลาคือ 9.00-11.00 น. หรือ 19.00 น.

อัตราการใช้

จุลินทรีย์ที่หมักขยายแล้วประมาณ 100-200 ลิตรต่อไร่ หรือตามความเข้มข้นของเชื้อก่อโรคที่เกิดขึ้นในบ่อ และในตัวกุ้ง

5) ชนิดของเชื้อ (*Bacillus subtilis* (BS)), (C.N.D)

ชนิดน้ำขนาด 300 มิลลิลิตร หรือ ชนิดผงขนาด 200 กรัม

คุณสมบัติ

- ลดสารอินทรีย์ในน้ำทำให้น้ำโปร่งขึ้น
- ลดและควบคุมปริมาณไนไตรต์ให้คงที่ไม่ให้เป็นพิษแก่กุ้ง

วิธีการหมักขยาย

เริ่มหมักขยายลงบ่อถ้าตรวจพบว่ามีปริมาณไนไตรท์ในน้ำ นำจุลินทรีย์ชนิดน้ำหรือชนิดผงใส่ลงในน้ำสะอาดหรือน้ำประปาที่เป่าไล่คลอรีนประมาณ 6 ชั่วโมง ใช้น้ำสะอาดประมาณ 180 -200 ลิตร อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป 1 ซอง หมักขยาย 24 ชั่วโมง ให้ออกซิเจนปานกลาง หรือจนกว่าน้ำหมักขยายในถังหมักได้ pH 4.5 -5 ก็สามารถใส่ลงบ่อได้ในตอน 9.00-11.00 น.

อัตราการใช้

จุลินทรีย์ที่หมักขยายแล้ว 200 ลิตรต่อไร่ ใส่ทุกวัน

6) ชนิดของเชื้อ *Bacillus subtilis* (BS),(Natto)

ชนิดน้ำขนาด 300 มิลลิลิตร หรือ ชนิดผงขนาด 200 กรัม

คุณสมบัติ

- ลดไบโอฟิล์มในน้ำ
- ลดปริมาณสารอินทรีและค่า TOC ของน้ำ
- ลดความเข้มความหนืดของน้ำ
- ใช้เป็นโปรไบโอติก มีเอนไซม์โปรตีเอสช่วยในระบบการย่อยอาหารของกุ้งให้ดีขึ้น

วิธีการหมักขยาย

นำจุลินทรีย์ชนิดน้ำหรือชนิดผงใส่ลงในน้ำสะอาดหรือน้ำประปาที่เป่าคลอรีนประมาณ 6 ชั่วโมง ปรับความเค็มของน้ำในถังหมักขยายให้ใกล้เคียงกับน้ำในบ่อ กรณีหมักขยายลงบ่อเลี้ยงกุ้งในระบบความเค็มต่ำโดยใช้เกลือป่น (เกลือป่น 1 กิโลกรัม ได้ความเค็ม 5 พีพีที เกลือป่น 2 กิโลกรัม ได้ความเค็ม 10 พีพีที) เดกซ์โตสโมโนไฮเดรต 0.5 กิโลกรัม อาหารกุ้งเบอร์เล็ก 200 กรัม หมักขยาย 24 ชั่วโมง หรือจนกว่าน้ำหมักในถังได้ pH 4.5-5 ก็สามารถลงบ่อได้ในช่วงเวลา 9.00-11.00 น. ในกรณีลดความเขียวของน้ำให้ใส่น้ำหมักขยายลงในเวลา 13.00 น.

อัตราการใช้

จุลินทรีย์ที่หมักขยายแล้ว 200 ลิตรต่อไร่ ระยะเวลาการใส่ขึ้นอยู่กับปริมาณสารอินทรีย์ในบ่อและค่า TOC ของน้ำ

7) ชนิดของเชื้อ Lactobacillus (LB 2)

ชนิดน้ำขนาด 300 มิลลิลิตร หรือ ชนิดผงขนาด 200 กรัม

คุณสมบัติ

- ลดการอักเสบของทางเดินอาหารของกุ้ง
- ลดปริมาณเชื้อก่อโรคในน้ำ
- เป็นโปรไบโอติกลดปริมาณ เชื้อก่อโรคในตัวกุ้ง
- เป็นส่วนผสมทำน้ำหมักสับปะรด

วิธีการหมักขยาย

นำจุลินทรีย์ชนิดน้ำหรือชนิดผงใส่ในน้ำสะอาดหรือน้ำประปาที่เป่าคลอรีนแล้วประมาณ 6 ชั่วโมง ปรับความเค็มน้ำในถังหมักขยายให้ใกล้เคียงกับน้ำในบ่อ กรณีหมักขยายลงบ่อเลี้ยงกุ้งในระบบความเค็มต่ำ

โดยใช้เกลือป่น (เกลือป่น 1 กิโลกรัม ได้ความเค็ม 5 พีพีที เกลือป่น 2 กิโลกรัม ได้ความเค็ม 10 พีพีที) เดกซ์โตสโมโนไฮเดรต 0.5 กิโลกรัม นมจืด 200-400 มิลลิลิตร หมักขยาย 24 ชั่วโมง โดยไม่ใช้ออกซิเจนจนน้ำหมักในถังหมักขยายได้ pH 4.5-5 ก็ใส่ลงบ่อได้

<u>อัตราการใช้</u>

น้ำหมักขยาย 100 ถึง 200 ลิตรต่อไร่ ขึ้นอยู่กับปริมาณของเชื้อก่อโรคในน้ำ

8) จุลินทรีย์ทำน้ำหมักสับปะรด สูตร Lactobacillus (LB 2)

ประกอบด้วยจุลินทรีย์ Lactobacillus สายพันธุ์ที่ดีลดและควบคุมเชื้อก่อโรคในตับและทางเดินอาหารของกุ้ง เพิ่มประสิทธิภาพในระบบการย่อยและดูดซึมอาหาร ลดโอกาสเป็นขี้ขาว และสามารถใช้เมื่อเป็นขี้ขาวแล้ว กระตุ้นภูมิคุ้มกัน กุ้งแข็งแรง ต้านทานโรคดีขึ้น สร้างสมดุลจุลินทรีย์ของในระบบทางเดินอาหารกุ้ง

<u>สูตรการหมัก น้ำหมักสับปะรด</u>

- สับปะรดบด หรือ สับ 20 กิโลกรัม เลือกผลน้ำฉ่ำๆ
- น้ำตาลทรายแดง 6 กิโลกรัม
- LB 2 ชนิดผง 200 กรัม หรือ ชนิดน้ำ 300 มิลลิลิตร

<u>วิธีหมัก</u>

ล้างผลสับปะรดให้สะอาด ผึ่งให้แห้ง จากนั้นบดหรือสับทั้งเปลือก นำส่วนผสมทั้ง 4 อย่างตามสูตรใส่รวมกันในภาชนะและอุปกรณ์ที่สะอาดเพื่อน้ำหมักที่สะอาด และปลอดเชื้อโรค ปิดฝาหมักทิ้งไว้ 14 วัน และสามารถทยอยใช้ไปเรื่อยๆ น้ำหมักในถังหมักมีอายุนาน 3 เดือน หากใช้ไม่หมด ให้กรองเฉพาะน้ำใส่ขวดแช่ตู้เย็นก็จะยืดระยะการใช้งานออกไปได้

<u>อัตราส่วนการใช้งาน</u>

เพื่อประสิทธิภาพที่ดีในการใช้ให้ตรวจเชื้อในจานเพาะเชื้อด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อTCBS หรือ Chrom agar เป็นประจำอย่างน้อย 3 วัน ต่อครั้ง และดูจากปริมาณการกินอาหารของกุ้ง ปริมาณการใช้ขยับเพิ่มหรือลดตามปริมาณเชื้อที่ตรวจพบตามหน้างานแต่ละบ่อ เมื่อพบเชื้อน้อย ถึงปานกลาง ให้ใช้น้ำหมัก 30-40 มิลลิลิตร ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เมื่อพบเชื้อระดับเต็มเพลท ให้ใช้น้ำหมัก 50 มิลลิลิตร ต่ออาหาร1 กก. กิโลกรัม หากพบอาการขี้ขาว หรือ Vp_{AHPND} ใช้น้ำหมัก 50 มิลลิลิตร ผสมกับอาหารกุ้งต่อ 1 กิโลกรัม ใช้คู่กับหัวเชื้อจุลินทรีย์ BS, BM **และ** Bl ปริมาณ 40 มิลลิลิตร ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เพื่อเพิ่มศักยภาพในการลดเชื้อ Vp_{AHPND}

ภาพที่ 6 ผลผลิตกุ้งของฟาร์มเกษตรกรในจังหวัดฉะเชิงเทราที่มีการเลี้ยงกุ้งโดยใช้จุลินทรีย์จากชมรมผู้เลี้ยงกุ้งจังหวัดฉะเชิงเทราที่แยกได้จากพื้นที่ฉะเชิงเทราในระบบการเลี้ยงทั้งระบบ

บทที่ 6 การขึ้นทะเบียนวัตถุอันตรายประเภทที่ 2

ตามที่กรมประมงได้ส่งเสริมให้มีการใช้จุลินทรีย์ ปม.1 และ ปม.2 ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เพื่อลดการใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะ และได้สนับสนุนให้กลุ่มเกษตรกรจัดตั้งศูนย์ผลิตจุลินทรีย์เอง เพื่อให้มีปริมาณจุลินทรีย์เพียงพอต่อความต้องการของเกษตรกร ซึ่งปัจจุบันมีกลุ่มเกษตรกรที่ผลิตจุลินทรีย์ภายใต้การสนับสนุนจากภาครัฐ ได้แก่ กลุ่มเกษตรกรที่เข้าร่วมโครงการสร้างทักษะและส่งเสริมอาชีพด้านการเกษตร กิจกรรมขยายฐานการผลิตจุลินทรีย์ ภายใต้โครงการไทยนิยมยั่งยืนปีงบประมาณ 2561 และกลุ่มเกษตรกรที่ได้รับงบประมาณจากงบจังหวัด ทั้งนี้ การผลิตจุลินทรีย์เพื่อแจกจ่ายสมาชิกในกลุ่มเกษตรกรเดียวกันไม่จำเป็นต้องขึ้นทะเบียนวัตถุอันตรายชนิดที่ 2 (สำหรับผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ที่ใช้ในการปรับสภาพน้ำ) ที่กรมประมงรับผิดชอบ ตามพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ. 2535 และไม่จำเป็นต้องขึ้นทะเบียนอาหารสัตว์ควบคุมเฉพาะ(สำหรับผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นสารผสมส่วงหน้า (พรีมิกซ์) ชนิดสารเสริมชีวนะ) ตามพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. 2558 แต่หากกลุ่มเกษตรกรมีความประสงค์จะผลิตจุลินทรีย์เพื่อจำหน่ายได้กับบุคคลอื่น จำเป็นต้องขึ้นทะเบียนฯ ตามพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ.2534 หรือพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ 2558 ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการใช้งานจุลินทรีย์

6.1 หลักเกณฑ์การขึ้นทะเบียนผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ปรับสภาพน้ำที่ใช้ทางการประมง

ผลิตภัณฑ์จุลชีพจัดเป็นวัตถุอันตรายชนิดที่ 2 ตามบัญชีแนบท้ายประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม เรื่อง บัญชีรายชื่อวัตถุอันตราย พ.ศ. 2556 บัญชี 2.3 รายชื่อกลุ่มผลิตภัณฑ์ควบคุม ลำดับที่ 1 ผลิตภัณฑ์จุลชีพสำหรับปรับสภาพน้ำ หรือที่ทำขึ้นเพื่อป้องกัน กำจัด ทำลาย หรือควบคุมจุลชีพ ปรสิต พืช หรือสัตว์อื่นในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำ ผู้นำเข้าหรือผู้ผลิตจะต้องดำเนินการขอขึ้นทะเบียนวัตถุอันตรายกับกรมประมงก่อนดำเนินกิจการ ซึ่งกรมประมง ได้จัดทำคู่มือประชาชนเรื่องการขึ้นทะเบียนวัตถุอันตรายทางการประมงเพื่อเผยแพร่ประชาสัมพันธ์ช่องทางการยื่นคำขอ ขั้นตอนวิธีการ และระยะเวลาดำเนินการของการรับขึ้นทะเบียนวัตถุอันตรายและการออกใบสำคัญการขึ้นทะเบียนซึ่งต้องปฏิบัติตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง การขึ้นทะเบียนวัตถุอันตราย การออกใบสำคัญและการต่ออายุใบสำคัญการขึ้นทะเบียนวัตถุอันตรายที่กรมประมงเป็นผู้รับผิดชอบ พ.ศ. 2551

การขอขึ้นทะเบียนผลิตภัณฑ์จุลชีพกับกรมประมงให้ใช้แบบคำขอขึ้นทะเบียน วอ.กษ./กปม.1 สำหรับรายละเอียดข้อมูล หรือเอกสารที่ใช้ประกอบการขอขึ้นทะเบียนให้ปฏิบัติตามหลักเกณฑ์ ดังนี้

6.1.1 รายงานผลการวิเคราะห์ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ ประกอบด้วย

1) หนังสือรับรองชนิด (species) ของจุลชีพที่เป็นสารสำคัญในผลิตภัณฑ์ โดยชนิดของจุลชีพต้องตรงตาม ที่ระบุในผลิตภัณฑ์ที่ขอขึ้นทะเบียน

2) หนังสือรับรองปริมาณจุลชีพทั้งหมด (total plate count) หน่วยเป็น cfu/g หรือ cfu/ml โดยผลการวิเคราะห์ปริมาณจุลชีพทั้งหมดต้องได้ไม่น้อยกว่าที่ขอขึ้นทะเบียน

3) หนังสือรับรองการปนเปื้อนของยีสต์และราในผลิตภัณฑ์ โดยผลิตภัณฑ์ต้องมียีสต์ปนเปื้อนไม่เกิน 10 cfu/g หรือ cfu/ml และราปนเปื้อนไม่เกิน 10 cfu/g หรือ cfu/ml ยกเว้นผลิตภัณฑ์ที่มียีสต์ชนิด *Saccharomyces cerevisiae* เป็นส่วนประกอบ ให้แนบหนังสือรับรองการปนเปื้อนราในผลิตภัณฑ์ไม่เกิน 10 cfu/g หรือ cfu/ml

6.1.2 รายงานผลการทดลองประสิทธิภาพ

- เอกสารวิชาการที่ตีพิมพ์ในวารสารที่น่าเชื่อถือหรือผลการทดลองจากห้องปฏิบัติการหรือภาคสนามโดยหน่วยงานราชการ

- รายงานต้องแสดงถึงประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ในการลดปริมาณสารอินทรีย์รวม แอมโมเนียและไนไตรท์ หรือการทดสอบหาประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อวิบริโอ (ถ้ามี)

- การออกแบบการทดลองต้องอยู่บนพื้นฐานทางหลักวิทยาศาสตร์ มีมาตรฐาน เชื่อถือได้ หากรายงานฯ ไม่เป็นเช่นนั้น ทางคณะทำงานสามารถพิจารณาให้ทำการทดลองเพิ่ม หรือเสนอให้ทำลองใหม่ได้

6.1.3 ตัวอย่างฉลาก

- การแสดงข้อมูลในฉลาก ให้ระบุข้อมูลตามรายละเอียดตัวอย่างการเขียนฉลากจุลชีพที่กองตรวจสอบเรือประมง สินค้าสัตว์น้ำ และปัจจัยการผลิตแนะนำ

- วิธีการใช้และอัตราการใช้ต้องสอดคล้องกับรายงานผลการทดลองประสิทธิภาพ

6.1.4 หลักเกณฑ์การระบุวันล่วงอายุในฉลาก

- วันล่วงอายุให้ระบุเป็น “จำนวนเดือน” นับจากวันที่ผลิต เช่น วันล่วงอายุ 12 เดือน นับจากวันที่ผลิต

- แบบผง หรือเม็ด : เบื้องต้นอนุญาตให้ระบุวันล่วงอายุได้ไม่เกิน 6 เดือน

- แบบน้ำ : เบื้องต้นอนุญาตให้ระบุวันล่วงอายุได้ไม่เกิน 1 เดือน

6.1.5 หน่วยงานที่รับวิเคราะห์และออกหนังสือรับรอง

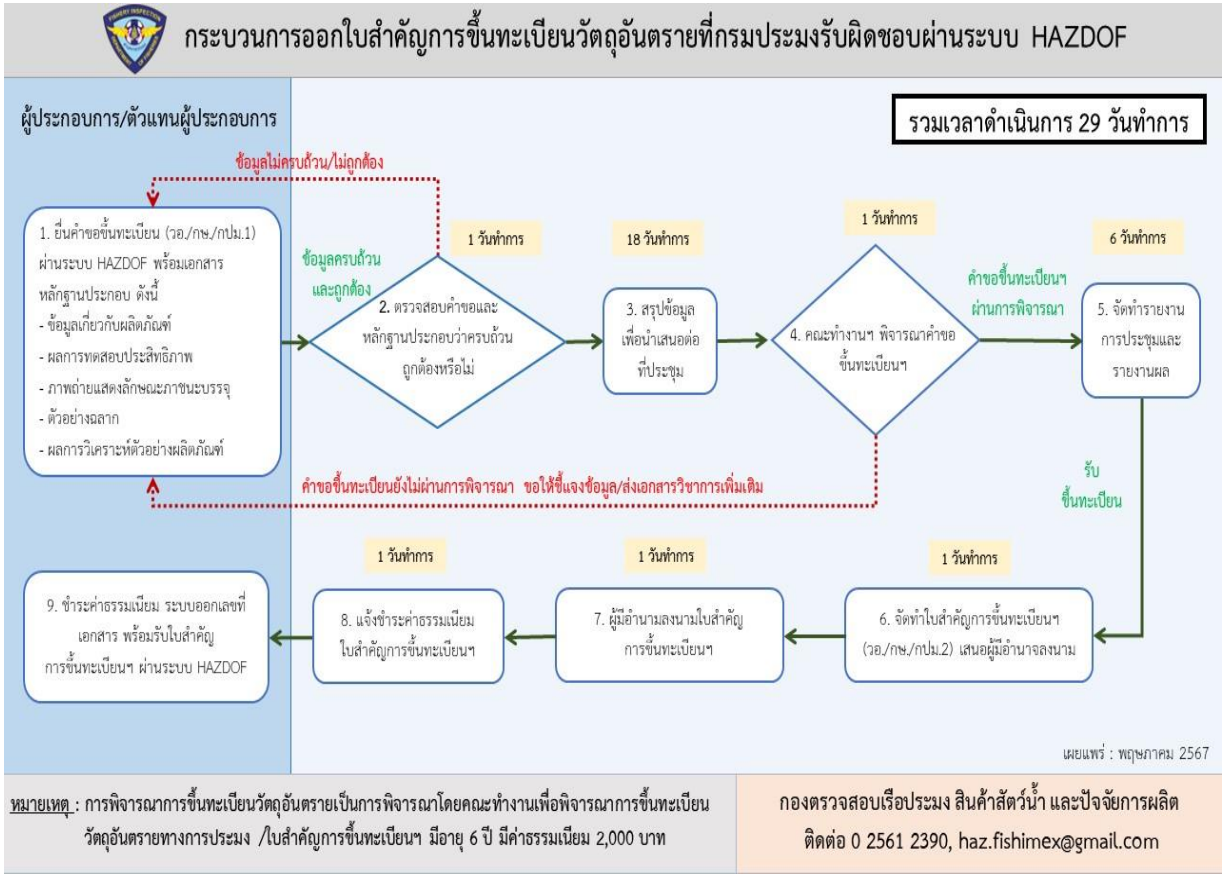
ให้ผู้ขอขึ้นทะเบียนวัตถุอันตราย ส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์หรือทดลองประสิทธิภาพ ตามประกาศกรมประมง เรื่อง ห้องปฏิบัติการที่ทำการตรวจวิเคราะห์วัตถุอันตรายหรือผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายเพื่อการขึ้นทะเบียน พ.ศ. 2562 ดังนี้

1) ห้องปฏิบัติการของหน่วยงานรัฐที่เป็นส่วนราชการ รัฐวิสาหกิจ องค์การมหาชน และมหาวิทยาลัย ในกำกับของรัฐ ทั้งในประเทศและต่างประเทศ

2) ห้องปฏิบัติการของหน่วยงานเอกชนผู้ให้บริการตรวจวิเคราะห์ที่ได้รับการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC: 17025 ในขอบข่ายที่เกี่ยวข้องกับการตรวจวิเคราะห์วัตถุอันตรายหรือผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายที่ขอขึ้นทะเบียนกับกรมประมง ทั้งในประเทศและต่างประเทศ

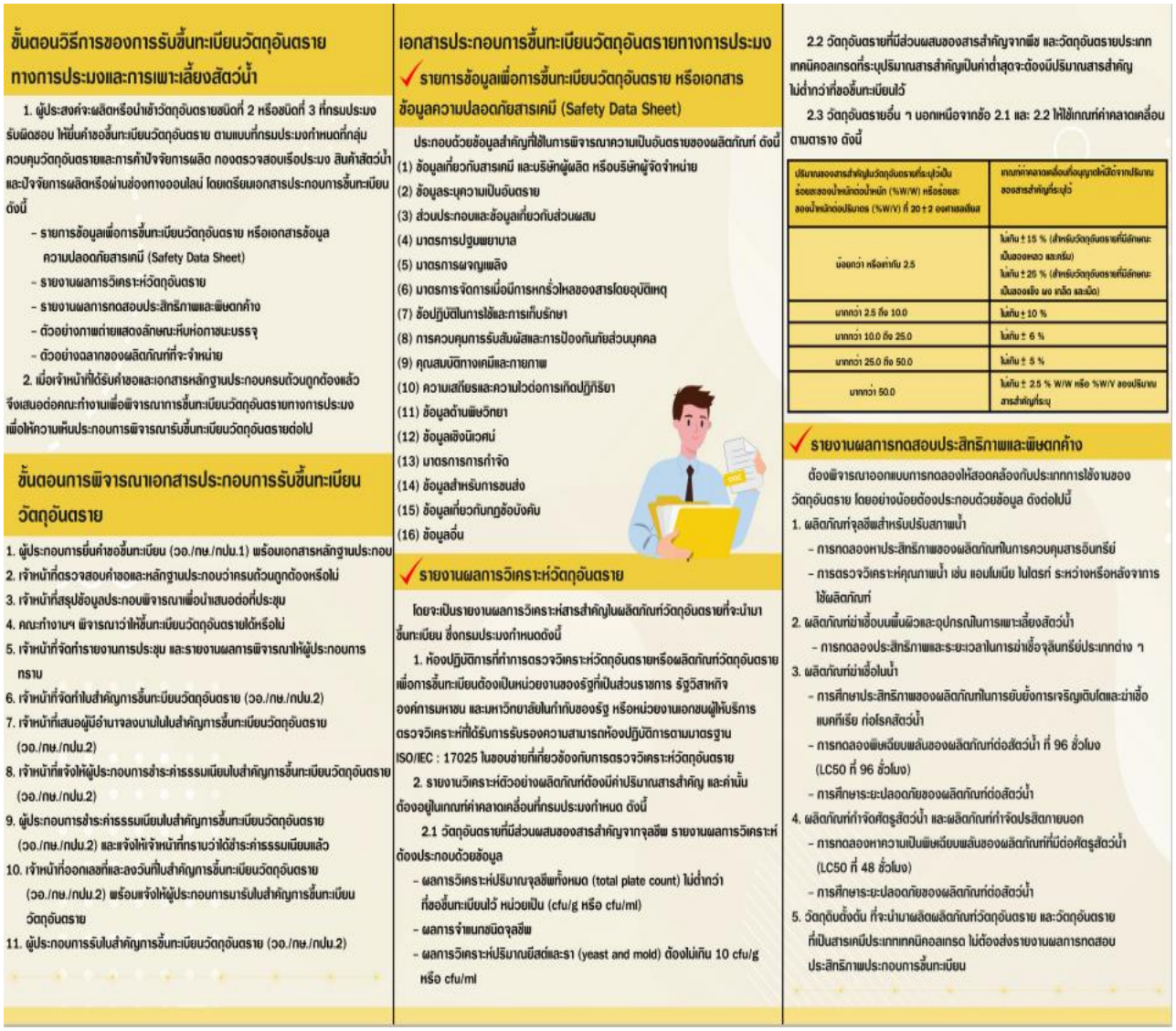
6.2 การพิจารณารับขึ้นทะเบียนวัตถุอันตราย

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



ภาพที่ 7 กระบวนการออกหนังสือการขึ้นทะเบียนวัตถุอันตรายที่กรมประมงรับผิดชอบผ่านระบบ HAZDOF

ภาพที่ 8 การขึ้นทะเบียนวัตถุอันตรายของกรมประมง



ภาพที่ 8 การขึ้นทะเบียนวัตถุอันตรายของกรมประมง (ต่อ)

ตารางที่ 4 รายชื่อห้องปฏิบัติการที่ทำการตรวจวิเคราะห์วัตถุอันตรายเพื่อการขึ้นทะเบียนในการกำกับของรัฐ

รายชื่อห้องปฏิบัติการ	สถานที่ติดต่อ	โทรศัพท์	อีเมล	วิเคราะห์สารสำคัญ (Active ingredient)	ทดสอบประสิทธิภาพ	ตัวอย่างที่รับวิเคราะห์
๑. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)	๓๕ หมู่ ๓ เทคโนธานี ต.คลองห้า อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี ๑๒๑๒๐	๐ ๒๕๗๗ ๙๓๔๔ ๐ ๒๕๗๗ ๙๐๐๙	onestop@tistr.or.th	/	-	จุลินทรีย์
๒. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล	๒๗๒ ถนนพระรามที่ ๖ แขวงทุ่งพญาไท เขตราชเทวี กรุงเทพฯ ๑๐๔๐๐	๐ ๒๒๐๑ ๕๐๐๐	-	/	-	จุลินทรีย์
๓. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	๕๐ ถนนงามวงศ์วาน เขตจตุจักร แขวงลาดยาว กทม. ๑๐๙๐๐	๐ ๒๕๖๒ ๕๔๔๔ ๐ ๒๕๖๒ ๕๕๕๕	sci@ku.ac.th	/	/	จุลินทรีย์ สารเคมี
๔. บริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด สาขากรุงเทพฯ	๒๑๗๙ ถ.พหลโยธิน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ ๑๐๙๐๐	๐ ๒๙๔๐ ๕๙๙๓ ๐ ๒๕๖๑ ๔๓๘๗-๘	-	/	-	จุลินทรีย์ สารเคมี
๕. บริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด สาขาฉะเชิงเทรา	๓๖/๖ หมู่ ๘ ต.ท่าสะอ้าน อ.บางปะกง จ.ฉะเชิงเทรา ๒๔๑๓๐	๐ ๓๘๕๓ ๓๔๗๖ ๙	-	/	-	จุลินทรีย์ สารเคมี
๖.กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ สำนักเครื่องสำอางค์และวัตถุอันตราย	๘๘/๗ บำราศนราดูร ถ.ติวานนท์ ต.ตลาดขวัญ อ.เมือง จ.นนทบุรี ๑๑๐๐๐	๐ ๒๙๕๑ ๐๐๐๐ ๐ ๒๙๕๑ ๐๐๐๐ ต่อ ๙๙๔๙๕	coshaz@dmsc.mail.go.th	/	/	สารเคมี
๗. กรมวิทยาศาสตร์บริการ	๗๕/๗ ถ.พระราม ๖ ราชเทวี กทม. ๑๐๔๐๐	๐ ๒๓๓๓ ๓๗๐๐ ๐ ๒๒๐๑ ๗๒๑๑-๒	chemistry@dss.go.th	/	-	สารเคมี

รายชื่อห้องปฏิบัติการ	สถานที่ติดต่อ	โทรศัพท์	อีเมล	วิเคราะห์สารสำคัญ (Active ingredient)	ทดสอบประสิทธิภาพ	ตัวอย่างที่รับวิเคราะห์
๘. สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์	๙๑ หมู่ ๔ ต.บางกะดี อ.เมือง จ.ปทุมธานี ๑๒๐๐๐	๐ ๒๙๖๗ ๙๗๐๐ ต่อ ๒๑๐๖, ๐ ๒๙๖๗ ๙๗๑๐	qcontrol@dld.go.th	/	/	สารเคมี
๙. สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ	๑๑๔ อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย ถนนพหลโยธิน ต.คลองหนึ่ง อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี ๑๒๑๒๐	๐ ๒๕๖๔ ๖๕๐๐ ต่อ ๔๒๑๕	MCU-CTL@mtec.or.th	/	-	สารเคมี
๑๐. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี (บางขุนเทียน)	๔๙ ซอยเทียนทะเล ๒๕ ถนนบางขุนเทียน-ชายทะเล แขวงท่าข้าม เขตบางขุนเทียน กรุงเทพฯ ๑๐๑๕๐	๐ ๒๔๕๒ ๓๔๕๖	-	/	-	สารเคมี
๑๑. คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	๓๙ ถนนอังรีดูนังต์ แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพมหานคร ๑๐๓๓๐	๐ ๒๒๑๘ ๙๗๗๑	-	-	/	สารเคมี
๑๒. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา	๑๖๙ ถ.ลงหาดบางแสน ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี ๒๐๑๓๑	๐ ๓๘๑๐ ๓๐๑๐ ๑๑	-	/	-	จุลินทรีย์
๑๓. คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล	๓๘๓๙-๓๔๙๖ ๙๙๙ ถนนพุทธมณฑลสาย ๔ ต.ศาลายา อ.พุทธมณฑล จ.นครปฐม ๗๓๑๗๐	๐ ๒๔๔๑ ๔๓๗๑-๕ ต่อ ๒๒๐๒	mumtpr@mahidol.edu	-	/	สารเคมี
๑๔. ศูนย์วิจัยธุรกิจเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมงมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	๕๐ ถนนพหลโยธิน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร ๑๐๙๐๐	๐ ๒๙๔๐ ๕๖๙๕	ffisntc@ku.ac.th	-	-	จุลินทรีย์ สารเคมี

รายชื่อห้องปฏิบัติการ	สถานที่ติดต่อ	โทรศัพท์	อีเมล	วิเคราะห์สารสำคัญ (Active ingredient)	ทดสอบประสิทธิภาพ	ตัวอย่างที่รับวิเคราะห์
๑๕. สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	อาคารสถาบัน ๓ จุฬาซอย ๖๒ ถ. พญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กทม. ๑๐๓๓๐	๐ ๒๒๑๘ ๘๐๖๑	-	/	/	จุลินทรีย์ สารเคมี
๑๖. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสุรินทร์	๑๔๕ หมู่ ๑๕ ถนนสุรินทร์-ปราสาท ต.นอกเมือง อ.เมือง จ.สุรินทร์ ๓๒๐๐๐	๐๔๔ ๕๑๓ ๒๓๖	-	-	/	สารเคมี
๑๗. ภาควิชาจุลชีววิทยา วิทยาลัยแพทย์ศาสตร์พระมงกุฎเกล้า	๓๑๗ ถนนราชวิถี แขวงทุ่งพญาไท เขตราชเทวี กรุงเทพมหานคร ๑๐๔๐๐	๐ ๒๓๕๔ ๗๘๒๖	-	-	/	จุลินทรีย์

เอกสารอ้างอิง

ไตรมาศ บุญไทย, วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย และสุบัณฑิต นิ่มรัตน์ 2550. ผลของโพรไบโอติกต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณของ Vibrio และปริมาณแบคทีเรียโพรไบโอติกระหว่างการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45 วันที่ 30 มกราคม - 2 กุมภาพันธ์ 2550. ณ กรุงเทพฯ. หน้า 245-253

นัยนา เสนาศรี. 2558. ผลของการใช้แบคทีเรีย *Bacillus* spp. เป็นโปรไบโอติกผสมอาหารในการเลี้ยงปลานิล. วารสารวิจัย มทร.ตะวันออก. 8(2) : 61-66

ประจวบ หลำอุบล. 2527. กุ้ง. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

พิมพร ทองเมือง. 2558. เอกสารประกอบการสอนรายวิชาความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับจุลชีววิทยาทางการแพทย์. มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา. 145 หน้า.

มนฑกานต์ สมบูรณ์, ชลอ ลิ้มสุวรรณ, นิติ ชูเชิด และพรเลิศ จันทร์รัชชกูล. 2552. ผลของการใช้จุลินทรีย์กลุ่ม Bacillus ที่แตกต่างกัน 3 กลุ่มต่อแบคทีเรียวิบริโอ (Vibrio spp.) คุณภาพน้ำและอัตรารอดตายในการอนุบาลลูกกุ้งขาวแวนนาไม (Litopenaeus vannamei). รายงานการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 47 วันที่ 17 – 20 มีนาคม 2552. ณ กรุงเทพฯ. หน้า 178-187.

สุนิสา สุขสวัสดิ์, วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย และสุบัณฑิต นิ่มรัตน์ 2549. การกำจัด Vibrio spp. และ Pseudomonas spp. ในขี้เลนด้วยวิธีการบำบัด 4 วิธีที่แตกต่างกัน. เอกสารประกอบการประชุมวิชาการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติครั้งที่ 5 วันที่ 8 - 10 มีนาคม 2549. ณ โรงแรมสยามซิตี้ กรุงเทพฯ.

สุนิสา สุขสวัสดิ์, วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย และสุบัณฑิต นิ่มรัตน์ 2550. ผลการบำบัดขี้เลนจากการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ 4 วิธีที่แตกต่างกันต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่มที่ใช้ออกซิเจน, แบคทีเรียแกรมลบ และ Vibrio spp. รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45 วันที่ 30 มกราคม - 2 กุมภาพันธ์ 2550. ณ กรุงเทพฯ. หน้า 776-783

สุนิสา สุขสวัสดิ์, วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย และสุบัณฑิต นิ่มรัตน์ 2551. การศึกษาผลของการบำบัดขี้เลน 4 วิธีต่อปริมาณแบคทีเรียในขี้เลนสะสมจากการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46 วันที่ 29 มกราคม - 1 กุมภาพันธ์ 2551. ณ กรุงเทพฯ. หน้า 490-497

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, มานพ กาญจนบุรางกูร, ปิยาภรณ์ สมสมัคร นเรศ เชื้อสุวรรณ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. 2550. คุณสมบัติของผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกที่จำหน่ายในประเทศไทยและต่างประเทศ. วารสารการประมง 60(1) : 27-34.

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, รณชัย ทองสนธิ, สุนิสา สุขสวัสดิ์, นเรศ เชื้อสุวรรณ, บุญรัตน์ ประทุมชาติ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย 2550. การใช้โพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. วารสารการประมง 60(2) : 128-136.

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์. 2551. การพัฒนาผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกสำหรับการเลี้ยงกุ้งทะเล. การนำเสนอผลงานวิจัยแห่งชาติ 2551 สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ณ ศูนย์ประชุมบางกอกคอนเวนชันเซ็นเตอร์ เซ็นทรัลเวิลด์, กรุงเทพฯ, วันที่ 12-16 กันยายน 2551.

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, ไตรมาศ บุญไทย และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย 2551. ผลของแบคทีเรียโพรไบโอติกต่อการเปลี่ยนแปลง ปริมาณบาซิลลัสและการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ. รายงานการประชุมทางวิชาการ “วิจัยบูรพา ครบรอบวันสถาปนา 58 ปี” มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี, วันที่ 7 กรกฎาคม 2551.

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, สุนิสา สุขสวัสดิ์, พงศ์ศิริ มาลีเวช และ วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. 2551. Organic sludge management in simulated black tiger shrimp ponds: Effects of liming and probiotic treatments. รายงานการประชุมวิชาการ “นักวิจัยรุ่นใหม่ พบ เมธีวิจัยอาวุโส สกว” โรงแรมฮอลิเดย์ อินน์ รีสอร์ท รีเจนท์ บีช ชะอำ เพชรบุรี, วันที่ 16 - 18 ตุลาคม 2551.

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, ประพัตร์ แก้วมณี, ไตรมาศ บุญไทย และ วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. 2552. การสำรวจการใช้โพรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งขาวแปซิฟิกในจังหวัดระยอง. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา 14 (1) : 53-66.

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. 2552. การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอย่างยั่งยืน: บทบาทของจุลินทรีย์และการประยุกต์ใช้. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ. 308 หน้า.

สุรางค์ สุธิราวุธ. 2538. การศึกษาคุณสมบัติทางจุลชีววิทยาของ EM: การศึกษา Lactic acid bacteria. เอกสารประกอบการสัมมนาการแถลงผลการดำเนินงานวิจัย โครงการวิจัย EM และผลของการใช้ต่อการเกษตรและสิ่งแวดล้อม. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 184 หน้า

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2548. https://www.oae.go.th/view/1/หน้าแรก/TH-TH.

Balcazar, J.L.. de Blas I. Ruiz-Zarzuela I. Cunningham D.. Vendrell D., and Muzquiz J.L. 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*. 114 : 173–186.

Boyd, C.E. 1979. Water Quality in Warmwater Fish Ponds. Alabama: Fisheries and Allied. Agricultural Experiment Station, Auburn University. 359 pp.

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

Claus, D. and Berkeley R. C. W. 1986. Genus Bacillus Cohn 1872, 174AL. Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology. Williams and Wilkins, Baltimore. 2 : 1105-1139.

Cruz-Lacierda, E.R., Corre, Jr., V.L., Yamamoto, A., Koyama, J., and 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.

Direkbusarakom, S., Yoshimizu, M., Ezura, Y., Ruangpan, L. and Danayadol, Y. 1998. *Vibrio* spp. the dominant flora in shrimp hatchery against some fish pathogenic viruses. *Journal of Marine Biotechnology*. 6 : 266- 267.

FAO/WHO 2001. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Cordoba, Argentina.

FAO. 2006. State of world aquaculture: 2006. Fisheries Department, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.

Flach, J., Pilet, P. E. and Jolles, P. 1992. “What’s new in chitinase research.” Experientia. 48(8) : 701-716.

Flemming, H., J. Wingender, U. Szewzyk, P. Steinberg, S.A. Rice, and S. Kjelleberg. 2016. Biofilms: An emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*. 14(9) : 563-575.

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

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

Hamza, F., A. R. Kumar, and S. Zinjarde. 2015. Antibiofilm potential of a tropical marine Bacillus licheniformis isolate: Role in disruption of aquaculture associated biofilms. *Aquaculture Research*. 47(8) : 2661-2669.

Jeuniaux, C. 1996. A brief survey of the early contribution of European scientiststo chitin knowledae. In AdvancesinChitin Sciences,Domard, A., Jeuniaux, C., Muzzarelli, R.A. A., Roberts, G., Fds.Jacques Andre Publ.Lyon, France. pp. 1-9.

Kamei, Y., Yoshimizu, M., Ezura, Y., and Kimura, T. 1988. Screening of bacteria with antiviral activity from freshwater salmonid hatcheries. *Microbiology and Immunology*. 32 : 67-73.

Lilley, D.M., and Stillwell, R.J. 1965. Probiotics: growth promoting factors produced by micro-organisms. *Science*. 147 : 747-748.

Metchnikoff, E. 1908. The nature of man: Studies in optimistic philosophy. William Heinemann, London. 309 pp.

Moriarty. D.J.W. 1998. Control of luminous Vibrio species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture*. 164 : 351- 358.

Moriarty, DJ.W. 1999. Disease control in shrimp aquaculture with probiotic bacteria. In C.R. Bell, M. Brylinsky, and P. Johnson-Green (Eds.). Microbial Biosystems: New Frontiers Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology. Halifax Atlantic Canada Society for Microbial Ecology.

Nimrat, S., and Vuthiphandchai, V. 2007a. Characteristics of commercial probiotic products for aquaculture of marine shrimp in Thailand. **In:** International Conference on Recent trends in biodiversity and biotechnology (RTBB-2007). 15-17 November 2007. Aurangabad, India.

Nimrat, S., and Vuthiphandchai, V. 2007b. In vitro assessment of potential probiotic bacteria from aquaculture environments in Thailand. **In:** International Conference Ion The Sixth Princess Chulabhorn International Science Congress. 25-29 November 2007. Shangri-La Hotel, Bangkok, Thailand.

Nimrat, S., and Vuthiphandchai, V. 2007c. Bacterial composition of commercial probiotic products for use in marine shrimp culturation in Thailand. **In:** International Conference on The Sixth Princess Chulabhorn International Science Congress. 25-29 November 2007. Shangri-La Hotel, Bangkok, Thailand.

Nimrat, S., and Vuthiphandchai, V. 2007d. Bacterial composition of commercial probiotic products for use in marine shrimp cultivation in Thailand. **In:** The 7 Annual Meeting of the Science and Technology: Science and Technology for Self Sufficient Economics. 28-30 November 2007. Institute of Science and Technology for Research and Development Mahidol University, Salaya, Nakhonpathom, Thailand.

Nimrat, S., and Vuthiphandchai, V. 2007e. The role of probiotic for aquaculture in Thailand. **In:** Sustainable Agriculture: Issues and the Way Forward. 6-8 December, PPL Conference Room. Universiti Putra Malaysia. Selangor, Malaysia.

Nimrat, S., Suksawat, S., Maleeweach, P., and01111111111111
Vuthiphandchai. V. 2008. Effect of different shrimp pond bottom soil treatments on the change of physical characteristics and pathogenic bacteria in pond bottom soil. *Aquaculture*. 285 : 123-129.

Nimrat, S., Suksawat, S. and Vuthiphanchai, V. 2009. Organic sludge treatment and impact in marine shrimp cultivation. **In:** International Symposium on Recent Trend in Environmental Pollution and Impact 4-6 March 2009. Burapha University. Chon Buri, Thailand.

Parker, R.B. 1974. Probiotics: The other half of the antimicrobial story. *Animal Nutrition and Health*.29 : 4-8.

Qi, Z., Zhang, X.H., Boon, N., and Bossier, P. 2009. Probiotics in aquaculture of China current state, problems and prospect. *Aquaculture*. 290 : 15-21.

Rosovitz, M.J., Voskuil, M.I., and Chambliss, G.H. 1998. Bacillus.Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections Systematic Bacteriology. 2 : 709-729

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

Thomas, G.M., Ward, C.H., Raymond. R.L, Wilson, J.T., and Loehr, R.C. 1992. In J. Leperberg (Ed.). Bioremediation in Encyclopedia Microbiology. Academic Press, London. pp. 369-385.

Turnbull, P.C.B., Kramer, J.M., and Melling, J. 1990. Bacillus.Topley and Wilson's Principle of Bacteriology, Virology and Immunity. 2 : 187-210.

Venkat, H.K., Sahu, N.P., and Jain, K.K. (2004). Effect of feeding *Lactobacillus*-based probiotics on the gut microflora, growth and survival of postlarvae of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquaculture Research*. 35 : 501-507.

ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 รายชื่อวัตถุอันตรายประเภทที่ 2 ที่ขึ้นทะเบียนกับกรมประมง

ลำดับ	เลขที่ กษ	บริษัท	ดำเนินการ	ชื่อวัตถุอันตราย	ชื่อทางการค้า	วัตถุประสงค์	ชื่อผู้ผลิต	แหล่งผลิต	ผู้จัดจำหน่าย
1	กษ 0514 01 2 0023 50	บริษัท เบ็นไมเยอร์ เคมีคอลส์ (ที) จำกัด	นำเข้า	จุลินทรีย์	อีพิซิน (EPICIN)	บำบัดน้ำในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	Epicore BioNetworks Inc.	ประเทศสหรัฐอเมริกา	บริษัท เบ็นไมเยอร์ เคมีคอลส์ (ที) จำกัด
2	กษ 0514 01 2 0023 51	บริษัท เบ็นไมเยอร์ เคมีคอลส์ (ที) จำกัด	นำเข้า	จุลินทรีย์	อีพิซิน-ดี (EPICIN-D)	บำบัดน้ำในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	Epicore BioNetworks Inc.	ประเทศสหรัฐอเมริกา	บริษัท เบ็นไมเยอร์ เคมีคอลส์ (ที) จำกัด
3	กษ 0514 01 2 0026 54	บริษัท เวอร์แบค (ประเทศไทย) จำกัด	นำเข้า	จุลินทรีย์	ไบโอมารีน (BIO MARINE)	ลดสารอินทรีย์จากเศษอาหารและขี้กุ้ง	Virbac Vietnam	ประเทศสาธารณรัฐสังคมนิยมเวียดนาม	บริษัท เวอร์แบค (ประเทศไทย) จำกัด
4	กษ 0514 01 2 0027 54	บริษัท เวอร์แบค (ประเทศไทย) จำกัด	นำเข้า	จุลินทรีย์	เอโคมารีน (ECO MARINE)	ลดสารอินทรีย์จากเศษอาหารและขี้กุ้ง	Virbac Vietnam	ประเทศสาธารณรัฐสังคมนิยมเวียดนาม	บริษัท เวอร์แบค (ประเทศไทย) จำกัด
5	กษ 0514 01 2 0030 57	บริษัท บลูอควา อินเตอร์เนชั่นแนล (ประเทศไทย) จำกัด	นำเข้า	จุลินทรีย์	ซอยล์โกร (SoilGro)	ลดของแข็งในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	Blue Aqua International Pte Ltd.	ประเทศสาธารณรัฐสิงคโปร์	บริษัท บลูอควา อินเตอร์เนชั่นแนล (ประเทศไทย) จำกัด
6	กษ 0514 01 2 0031 57	บริษัท บลูอควา อินเตอร์เนชั่นแนล (ประเทศไทย) จำกัด	นำเข้า	จุลินทรีย์	แบคโตโกร (BactoGro)	ลดของแข็งแขวนลอยในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	Blue Aqua International Pte Ltd.	ประเทศสาธารณรัฐสิงคโปร์	บริษัท บลูอควา อินเตอร์เนชั่นแนล (ประเทศไทย) จำกัด

ลำดับ	เลขที่ กษ	บริษัท	ดำเนินการ	ชื่อวัตถุอันตราย	ชื่อทางการค้า	วัตถุประสงค์	ชื่อผู้ผลิต	แหล่งผลิต	ผู้จัดจำหน่าย
7	กษ 0514 01 2 0005 58	บริษัท เออร์เบอร์ ไบโอเทค (ประเทศไทย) จำกัด	นำเข้า	จุลินทรีย์	ไบโอมิน พี ไลฟ์ (BiominR P Life)	ลดแอมโมเนียในบ่อเลี้ยงกุ้ง	บริษัท ไบโอมิน (สิงคโปร์) จำกัด	ประเทศสาธารณรัฐสิงคโปร์	-
8	กษ 0514 01 2 0015 58	บริษัท เออร์เบอร์ ไบโอเทค (ประเทศไทย) จำกัด	นำเข้า	จุลินทรีย์	ไบโอมิน พี ไลฟ์ พลัส (BiominR P Life Plus)	ลดแอมโมเนียในบ่อเลี้ยงกุ้ง	บริษัท ไบโอมิน (สิงคโปร์) จำกัด	ประเทศสาธารณรัฐสิงคโปร์	-
9	กษ 0514 01 2 0029 60	บริษัท เจ๊บเซ่น แอนด์ เจ๊สเซ่น อินกรีเดียนส์ (ที) จำกัด	นำเข้า	จุลินทรีย์	บาซิลลัส เอส-อาร์25 คอนเซนเทรท (Bacillus S-R25 Concentrate)	ใช้เพื่อปรับปรุงคุณภาพน้ำในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	Lallemand Animal Nutrition UK Limited	ประเทศสหราชอาณาจักร	บริษัท เจ๊บเซ่น แอนด์ เจ๊สเซ่น อินกรีเดียนส์ (ที) จำกัด
10	กษ 0514 01 2 0043 60	บริษัท อินตรอน ไลฟ์ไซเอนซ์ (ประเทศไทย) จำกัด	นำเข้า	จุลินทรีย์	ซอยเล็กซ์ (SOILEX)	ลดตะกอนอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	Intron Life Sciences	ประเทศสาธารณรัฐอินเดีย	บริษัท ออล เวท จำกัด
11	กษ 0514 01 2 0044 60	บริษัท ไทย อะโกรเทรด จำกัด	นำเข้า	จุลินทรีย์	โอเชี่ยนนิก (Oceanic)	ลดตะกอนอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	Advanced Green Biotechnolgy Inc.	ประเทศไต้หวัน	บริษัท ไทย อะโกรเทรด จำกัด
12	กษ 0514 01 2 0007 62	บริษัท ไบโอโฟล (ประเทศไทย) จำกัด	นำเข้า	จุลินทรีย์	เอบีเอส-เอสเอฟ (ABS-SF)	ลดตะกอนอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	Aquatic BioScience, LLC	สหรัฐอเมริกา	บริษัท ไบโอโฟล (ประเทศไทย) จำกัด
13	กษ 0514 01 2 0008 62	บริษัท เอ็น ซี เอช (ประเทศไทย) จำกัด	นำเข้า	จุลินทรีย์	ฟรี-โฟลว์TM โพรไบโอติค วอเตอร์ ทรีทเมนต์ แท็บเล็ทส์ (FREE FLOWTM PROBIOTIC WATER TREATMENT TABLET)	ลดตะกอนอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	NCH Life Sciences	ประเทศสหรัฐอเมริกา	บริษัท เอ็น ซี เอช (ประเทศไทย) จำกัด
14	กษ 0514 01 2 0048 62	บริษัท ออลเวท จำกัด	นำเข้า	จุลินทรีย์	เอ็นไวรอน-เอซี (ENVIRON-AC)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	Biostadt India Limited	ประเทศสาธารณรัฐอินเดีย	บริษัท ออลเวท จำกัด
15	กษ 0514 01 2 0051 62	บริษัท มอนเทค เอเชีย จำกัด	นำเข้า	จุลินทรีย์	โปร พาวเดอร์ พาวเวอร์ (Pro Powder Power)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	Bio Future Ltd.	ประเทศสาธารณรัฐไอซ์แลนด์	บริษัท มอนเทค เอเชีย จำกัด

ลำดับ	เลขที่ กษ	บริษัท	ดำเนินการ	ชื่อวัตถุอันตราย	ชื่อทางการค้า	วัตถุประสงค์	ชื่อผู้ผลิต	แหล่งผลิต	ผู้จัดจำหน่าย
16	กษ 0514 01 2 0039 64	บริษัท แอ๊ดว้านซ์ฟาร์ม่า จำกัด	นำเข้า	จุลินทรีย์	มาจิก บี โปร (MAJIK B PRO)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	C.P. Vietnam Corporotion	ประเทศสาธารณรัฐสังคมนิยมเวียดนาม	บริษัท แอ๊ดว้านซ์ฟาร์ม่า จำกัด
17	กษ 0514 01 2 0026 65	บริษัท อีแลนโค (ประเทศไทย) จำกัด	นำเข้า	จุลินทรีย์	พอนด์พลัส (PondPlus)	จุลินทรีย์เพื่อการบำบัดน้ำในการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล	Novozymes (Shenyang) Biologicals Co., Ltd.	ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน	บริษัท อีแลนโค (ประเทศไทย) จำกัด
18	กษ 0514 01 2 0027 65	บริษัท อีแลนโค (ประเทศไทย) จำกัด	นำเข้า	จุลินทรีย์	พอนด์ดีท็อกซ์ (PondDtox)	จุลินทรีย์เพื่อการบำบัดน้ำในการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล	Novozymes (Shenyang) Biologicals Co., Ltd.	ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน	บริษัท อีแลนโค (ประเทศไทย) จำกัด
19	กษ 0514 01 2 0031 65	บริษัท อีแลนโค (ประเทศไทย) จำกัด	นำเข้า	จุลินทรีย์	พลัส 10 (Plus 10)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	Novozymes (Shenyang) Biologicals Co., Ltd.	ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน	บริษัท อีแลนโค (ประเทศไทย) จำกัด
20	DOFH1660182	บริษัท บำบัด พัฒนา จำกัด	นำเข้า	จุลินทรีย์	ไมโครบ-ลิฟท์ อควา ซี (MICROBE-LIFT AQUA C)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	Ecological Laboratories Inc.	สหรัฐอเมริกา	บริษัท บำบัด พัฒนา จำกัด
21	กษ 0514 01 2 0025 55	บริษัท โคเดล (ประเทศไทย) จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	นูทรอล (NEUTROL)	ย่อยสลายสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท โคเดล (ประเทศไทย) จำกัด	-	บริษัท โคเดล (ประเทศไทย) จำกัด
22	กษ 0514 01 2 0071 55	บริษัท อินเว (ประเทศไทย) จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	ซาโนไลฟ์ มิก (Sanolife MIC)	ควบคุมปริมาณเชื้อวิบริโอในโรงเพาะฟัก	บริษัท อินเว (ประเทศไทย) จำกัด	-	บริษัท อินเว (ประเทศไทย) จำกัด
23	กษ 0514 01 2 0089 55	บริษัท อินเว (ประเทศไทย) จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	ซาโนไลฟ์ โปร-ดับเบิ้ลยู (Sanolife PRO-W)	ควบคุมปริมาณเชื้อวิบริโอในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท อินเว (ประเทศไทย) จำกัด	-	บริษัท อินเว (ประเทศไทย) จำกัด
24	กษ 0514 01 2 0003 56	บริษัท โคเดล (ประเทศไทย) จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	ซีเคแบค (C.K.BAC)	กำจัดของเสียอินทรีย์ในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท โคเดล (ประเทศไทย) จำกัด	-	บริษัท โคเดล (ประเทศไทย) จำกัด
25	กษ 0514 01 2 0004 56	บริษัท โคเดล (ประเทศไทย) จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	ไทแบค (TAIBAC)	กำจัดของเสียอินทรีย์ในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท โคเดล (ประเทศไทย) จำกัด	-	บริษัท โคเดล (ประเทศไทย) จำกัด

ลำดับ	เลขที่ กษ	บริษัท	ดำเนินการ	ชื่อวัตถุอันตราย	ชื่อทางการค้า	วัตถุประสงค์	ชื่อผู้ผลิต	แหล่งผลิต	ผู้จัดจำหน่าย
26	กษ 0514 01 2 0005 56	บริษัท โคเดล (ประเทศไทย) จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	บี แซด ที (B.Z.T.)	กำจัดของเสียอินทรีย์ในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท โคเดล (ประเทศไทย) จำกัด	-	บริษัท โคเดล (ประเทศไทย) จำกัด
27	กษ 0514 01 2 0029 56	บริษัท โคเดล (ประเทศไทย) จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	ดีแม็กซ์ (D Max)	ลดของเสียอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท โคเดล (ประเทศไทย) จำกัด	-	บริษัท โคเดล (ประเทศไทย) จำกัด
28	กษ 0514 01 2 0022 57	บริษัท แบ็กซ์เซล จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	เอวัน (A1)	ลดตะกอนของเสียอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง	บริษัท แบ็กซ์เซล จำกัด	-	บริษัท แบ็กซ์เซล จำกัด
29	กษ 0514 01 2 0023 57	บริษัท แบ็กซ์เซล จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	แบคติโพสท์ (สูตรผง) [Bactipost (powder)]	ลดตะกอนของเสียอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง	บริษัท แบ็กซ์เซล จำกัด	-	บริษัท แบ็กซ์เซล จำกัด
30	กษ 0514 01 2 0024 57	บริษัท แบ็กซ์เซล จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	เอนเจสท์ (สูตรผง) [Engest (powder)]	ลดตะกอนของเสียอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง	บริษัท แบ็กซ์เซล จำกัด	-	บริษัท แบ็กซ์เซล จำกัด
31	กษ 0514 01 2 0025 57	บริษัท แบ็กซ์เซล จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	โปรเจสท์ (สูตรผง) [Progest (powder)]	ลดตะกอน-ของเสียอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง	บริษัท แบ็กซ์เซล จำกัด	-	บริษัท แบ็กซ์เซล จำกัด
32	กษ 0514 01 2 0026 57	บริษัท แบ็กซ์เซล จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	เอทู (A2)	ลดตะกอนอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง	บริษัท แบ็กซ์เซล จำกัด	-	บริษัท แบ็กซ์เซล จำกัด
33	กษ 0514 01 2 0027 57	บริษัท แบ็กซ์เซล จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	แบคติโพสท์ (สูตรน้ำ) [Bactipost (liquid)]	ลดตะกอนของเสียอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง	บริษัท แบ็กซ์เซล จำกัด	-	บริษัท แบ็กซ์เซล จำกัด
34	กษ 0514 01 2 0028 57	บริษัท แบ็กซ์เซล จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	เอนเจสท์ (สูตรน้ำ) [Engest (liquid)]	ลดตะกอนของเสียอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง	บริษัท แบ็กซ์เซล จำกัด	-	บริษัท แบ็กซ์เซล จำกัด
35	กษ 0514 01 2 0029 57	บริษัท แบ็กซ์เซล จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	โปรเจสท์ (สูตรน้ำ) [Progest (liquid)]	ลดตะกอนของเสียอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง	บริษัท แบ็กซ์เซล จำกัด	-	บริษัท แบ็กซ์เซล จำกัด

ลำดับ	เลขที่ กษ	บริษัท	ดำเนินการ	ชื่อวัตถุอันตราย	ชื่อทางการค้า	วัตถุประสงค์	ชื่อผู้ผลิต	แหล่งผลิต	ผู้จัดจำหน่าย
36	กษ 0514 01 2 0010 58	บริษัท โคเดล (ประเทศไทย) จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	อควาเด็กซ์ (AQUA DEX)	ลดตะกอนอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท โคเดล (ประเทศไทย) จำกัด	-	บริษัท โคเดล (ประเทศไทย) จำกัด
37	กษ 0514 01 2 0011 58	บริษัท โคเดล (ประเทศไทย) จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	เอ 380 (A 380)	ลดตะกอนอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท โคเดล (ประเทศไทย) จำกัด	-	บริษัท โคเดล (ประเทศไทย) จำกัด
38	กษ 0514 01 2 0016 58	บริษัท แบ็กซ์เซล จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	อควาซิส (สูตรผง) [Aquasis (powder)]	ลดตะกอนของเสียอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง	บริษัท แบ็กซ์เซล จำกัด	-	บริษัท แบ็กซ์เซล จำกัด
39	กษ 0514 01 2 0017 58	บริษัท แบ็กซ์เซล จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	แบคติโพสท์ พลัส (สูตรผง) [Bactipost plus (powder)]	ลดตะกอนอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง	บริษัท แบ็กซ์เซล จำกัด	-	บริษัท แบ็กซ์เซล จำกัด
40	กษ 0514 01 2 0018 58	บริษัท แบ็กซ์เซล จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	ซิมไบโอ (สูตรผง) [Symbio (powder)]	ลดตะกอนอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง	บริษัท แบ็กซ์เซล จำกัด	-	บริษัท แบ็กซ์เซล จำกัด
41	กษ 0514 01 2 0019 58	บริษัท แบ็กซ์เซล จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	อควาซิส (สูตรน้ำ) [Aquasis (liquid)]	ลดตะกอนของเสียอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง	บริษัท แบ็กซ์เซล จำกัด	-	บริษัท แบ็กซ์เซล จำกัด
42	กษ 0514 01 2 0020 58	บริษัท แบ็กซ์เซล จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	แบคติโพสท์ พลัส (สูตรน้ำ) [Bactipost plus (liquid)]	ลดตะกอนอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง	บริษัท แบ็กซ์เซล จำกัด	-	บริษัท แบ็กซ์เซล จำกัด
43	กษ 0514 01 2 0021 58	บริษัท แบ็กซ์เซล จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	ซิมไบโอ (สูตรน้ำ) [Symbio (liquid)]	ลดตะกอนอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง	บริษัท แบ็กซ์เซล จำกัด	-	บริษัท แบ็กซ์เซล จำกัด
44	กษ 0514 01 2 0012 59	บริษัท มาริโอ ไบโอ โปรดักส์ จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	ไบโอเทค วัน (BIOTECH ONE)	ลดตะกอนอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง	บริษัท มาริโอ ไบโอ โปรดักส์ จำกัด	-	บริษัท เพอร์เฟ็คอควาคัลเจอร์ จำกัด
45	กษ 0514 01 2 0013 59	บริษัท มาริโอ ไบโอ โปรดักส์ จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	มาริโอ แบค(Mario Bac)	ลดตะกอนอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง	บริษัท มาริโอ ไบโอ โปรดักส์ จำกัด	-	บริษัท มาริโอ ไบโอ โปรดักส์ จำกัด
46	กษ 0514 01 2 0022 59	บริษัท มาริโอ ไบโอ โปรดักส์ จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	ซุปเปอร์ บาซิลลัส (Super Bacillus)	ลดตะกอนอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง	บริษัท มาริโอ ไบโอ โปรดักส์ จำกัด	-	บริษัท มาริโอ ไบโอ โปรดักส์ จำกัด

ลำดับ	เลขที่ กษ	บริษัท	ดำเนินการ	ชื่อวัตถุอันตราย	ชื่อทางการค้า	วัตถุประสงค์	ชื่อผู้ผลิต	แหล่งผลิต	ผู้จัดจำหน่าย
47	กษ 0514 01 2 0023 59	บริษัท มาริโอ ไบโอ โปร ดักส์ จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	อันดามัน บาซิลลัส (Andaman Bacillus)	ลดตะกอนอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง	บริษัท มาริโอ ไบโอ โปร ดักส์ จำกัด	-	บริษัท มาริโอ ไบโอ โปรดักส์ จำกัด
48	กษ 0514 01 2 0024 59	บริษัท มาริโอ ไบโอ โปร ดักส์ จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	ดีไลท์ บาซิลลัส (Delight Bacillus)	ลดตะกอนอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง	บริษัท มาริโอ ไบโอ โปร ดักส์ จำกัด	-	บริษัท เพอร์เฟ็ค อควาคัลเจอร์ จำกัด
49	กษ 0514 01 2 0030 59	บริษัท นีโอไซเอ็นซ์ อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	ไมโคร ซายน์ (Miro Sci)	ลดตะกอนอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง	บริษัท นีโอไซเอ็นซ์ อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด	-	บริษัท นีโอไซเอ็นซ์ อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด
50	กษ 0514 01 2 0031 59	บริษัท นีโอไซเอ็นซ์ อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	ไบโอวิสท์ (Biowish)	ลดตะกอนอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง	บริษัท นีโอไซเอ็นซ์ อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด	-	บริษัท นีโอไซเอ็นซ์ อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด
51	กษ 0514 01 2 0032 59	บริษัท นีโอไซเอ็นซ์ อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	เพาเวอร์ ทรี (Power 3)	ลดตะกอนอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท นีโอไซเอ็นซ์ อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด	-	บริษัท นีโอไซเอ็นซ์ อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด
52	กษ 0514 01 2 0034 59	บริษัท ซิตโต้ (ประเทศไทย) จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	บาซิลลัส 1070	ลดตะกอนอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท ซิตโต้ (ประเทศไทย) จำกัด	-	บริษัท ซิตโต้ (ประเทศไทย) จำกัด
53	กษ 0514 01 2 0035 59	บริษัท ซีโนเทค อะโกรบิสซิเนส จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	มาสเตอร์คลีน (MASTERCLEAN)	ลดตะกอนอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล	บริษัท ซีโนเทค อะโกรบิสซิเนส จำกัด	-	บริษัท ซีโนเทค อะโกรบิสซิเนส จำกัด
54	กษ 0514 01 2 0036 59	บริษัท ซีโนเทค อะโกรบิสซิเนส จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	ไบโอโปร (BIOPRO)	ลดตะกอนอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล	บริษัท ซีโนเทค อะโกรบิสซิเนส จำกัด	-	บริษัท ยูนิตี้ เทคโนโปรดักซ์ จำกัด
55	กษ 0514 01 2 0037 59	บริษัท ซีโนเทค อะโกรบิสซิเนส จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	เอ็ม-แบค (M-BAC)	ลดตะกอนอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล	บริษัท ซีโนเทค อะโกรบิสซิเนส จำกัด	-	บริษัท ซีโนเทค อะโกรบิสซิเนส จำกัด
56	กษ 0514 01 2 0038 59	บริษัท ซีโนเทค อะโกรบิสซิเนส จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	คลีนแบค (CLEANBAC)	ลดตะกอนอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล	บริษัท ซีโนเทค อะโกรบิสซิเนส จำกัด	-	บริษัท ซีโนเทค อะโกรบิสซิเนส จำกัด

ลำดับ	เลขที่ กษ	บริษัท	ดำเนินการ	ชื่อวัตถุอันตราย	ชื่อทางการค้า	วัตถุประสงค์	ชื่อผู้ผลิต	แหล่งผลิต	ผู้จัดจำหน่าย
57	กษ 0514 01 2 0039 59	บริษัท ซีโนเทค อะโกรบิสซิเนส จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	บาซิลลัส-109 (BACILLUS-109)	ลดตะกอนอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล	บริษัท ซีโนเทค อะโกรบิสซิเนส จำกัด	-	บริษัท ซีโนเทค อะโกรบิสซิเนส จำกัด
58	กษ 0514 01 2 0040 59	บริษัท ซีโนเทค อะโกรบิสซิเนส จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	บี-ไฟว์ (B-FIVE)	ลดตะกอนอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล	บริษัท ซีโนเทค อะโกรบิสซิเนส จำกัด	-	บริษัท ซีโนเทค อะโกรบิสซิเนส จำกัด
59	กษ 0514 01 2 0041 59	บริษัท ซีโนเทค อะโกรบิสซิเนส จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	ไบโอแบค (BIOBAC)	ลดตะกอนอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท ซีโนเทค อะโกรบิสซิเนส จำกัด	-	บริษัท ซีโนเทค อะโกรบิสซิเนส จำกัด
60	กษ 0514 01 2 0042 59	บริษัท ซีโนเทค อะโกรบิสซิเนส จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	สตาร์ แบค (STAR BAC)	ลดตะกอนอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล	บริษัท ซีโนเทค อะโกรบิสซิเนส จำกัด	-	บริษัท ซีโนเทค อะโกรบิสซิเนส จำกัด
61	กษ 0514 01 2 0043 59	บริษัท ซีโนเทค อะโกรบิสซิเนส จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	มัลติฟลอค (MULTIFLOC)	ลดตะกอนอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล	บริษัท ซีโนเทค อะโกรบิสซิเนส จำกัด	-	บริษัท ซีโนเทค อะโกรบิสซิเนส จำกัด
62	กษ 0514 01 2 0044 59	บริษัท ซีโนเทค อะโกรบิสซิเนส จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	ไมโคร-ฟลอค (MICRO-FLOC)	ลดตะกอนอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล	บริษัท ซีโนเทค อะโกรบิสซิเนส จำกัด	-	บริษัท ซีโนเทค อะโกรบิสซิเนส จำกัด
63	กษ 0514 01 2 0047 59	บริษัท ชิตโต้ (ประเทศไทย) จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	บีเอส-เอ (BS-A)	ลดตะกอนอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล	บริษัท ชิตโต้ (ประเทศไทย) จำกัด	-	บริษัท ชิตโต้ (ประเทศไทย) จำกัด
64	กษ 0514 01 2 0048 59	บริษัท ซีโนเทค อะโกรบิสซิเนส จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	ไบโอพอนด์ (BIOPOND)	ลดตะกอนอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล	บริษัท ซีโนเทค อะโกรบิสซิเนส จำกัด	-	บริษัท ซีโนเทค อะโกรบิสซิเนส จำกัด
65	กษ 0514 01 2 0049 59	บริษัท อินโนเฝทเทต มานูแฟคเจอริ่ง จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	อินทิเกรท ดีเอช-วัน (INTEGRATE DH-ONE)	ลดตะกอนอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล	บริษัท อินโนเฝทเทต มานูแฟคเจอริ่ง จำกัด	-	บริษัท อินทิเกรท อกรี เทค จำกัด
66	กษ 0514 01 2 0002 60	บริษัท ลีดเดอร์ ไมโครไบโอโลยี จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	ดีแบค. (D bact.)	ลดตะกอนอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท ลีดเดอร์ ไมโครไบโอโลยี จำกัด	-	บริษัท ลีดเดอร์ไมโครไบโอ เทคโนโลยี จำกัด

ลำดับ	เลขที่ กษ	บริษัท	ดำเนินการ	ชื่อวัตถุอันตราย	ชื่อทางการค้า	วัตถุประสงค์	ชื่อผู้ผลิต	แหล่งผลิต	ผู้จัดจำหน่าย
67	กษ 0514 01 2 0004 60	บริษัท เจพีพี ฟาร์อีส จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	ไบโอแคล พลัส (Bio Cal Plus)	ปรับปรุงคุณภาพน้ำและยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล	บริษัท เจพีพี ฟาร์อีส จำกัด	-	บริษัท เจพีพี ฟาร์อีส จำกัด
68	กษ 0514 01 2 0010 60	บริษัท อินโนเฝทเทต มานูแฟคเจอริ่ง จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	นาโน (NANO)	ลดตะกอนของเสียอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง	บริษัท อินโนเฝทเทต มานูแฟคเจอริ่ง จำกัด	-	บริษัท อินทิเกรท อกรี เทค จำกัด
69	กษ 0514 01 2 0011 60	บริษัท อินโนเฝทเทต มานูแฟคเจอริ่ง จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	จี-การ์ด (G-GUARD)	ลดตะกอนอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง	บริษัท อินโนเฝทเทต มานูแฟคเจอริ่ง จำกัด	-	บริษัท อินโนเฝทเทต มานูแฟคเจอริ่ง จำกัด
70	กษ 0514 01 2 0012 60	บริษัท อินโนเฝทเทต มานูแฟคเจอริ่ง จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	วอเตอร์ การ์ด (WATER GUARD)	ลดตะกอนของเสียอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง	บริษัท อินโนเฝทเทต มานูแฟคเจอริ่ง จำกัด	-	บริษัท อินทิเกรท อกรี เทค จำกัด
71	กษ 0514 01 2 0013 60	บริษัท อินโนเฝทเทต มานูแฟคเจอริ่ง จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	อินทิเกรท ไฮ-คิว (INTEGRATE HI-Q)	ลดตะกอนของเสียอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง	บริษัท อินโนเฝทเทต มานูแฟคเจอริ่ง จำกัด	-	บริษัท อินทิเกรท อกรี เทค จำกัด
72	กษ 0514 01 2 0014 60	บริษัท อินโนเฝทเทต มานูแฟคเจอริ่ง จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	บีพี-1 (BP-1)	ลดตะกอนอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง	บริษัท อินโนเฝทเทต มานูแฟคเจอริ่ง จำกัด	-	บริษัท อินโนเฝทเทต มานูแฟคเจอริ่ง จำกัด
73	กษ 0514 01 2 0016 60	บริษัท ซิตโต้ (ประเทศไทย) จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	ไดเจส 2 (DIGEST 2)	ลดตะกอนอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล	บริษัท ซิตโต้ (ประเทศไทย) จำกัด	-	บริษัท ซิตโต้ (ประเทศไทย) จำกัด
74	กษ 0514 01 2 0021 60	บริษัท ลีดเดอร์ ไมโครไบโอโลยี จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	จุลินทรีย์ แฮปปี้-พลัส (HAPPY-PLUS Micro Organism)	ลดตะกอนอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง	บริษัท ลีดเดอร์ ไมโครไบโอโลยี จำกัด	-	บริษัท ลีดเดอร์ ไมโครไบโอโลยี จำกัด
75	กษ 0514 01 2 0022 60	บริษัท ลีดเดอร์ ไมโครไบโอโลยี จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	ไฮเกรด-พลัส (HIGHGRADE-PLUS)	ลดตะกอนอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง	บริษัท ลีดเดอร์ ไมโครไบโอโลยี จำกัด	-	บริษัท ลีดเดอร์ ไมโครไบโอโลยี จำกัด
76	กษ 0514 01 2 0036 60	บริษัท ซีโนเทค อะโกรบิสซิเนส จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	คู-แบค (KHU-BAC)	ลดตะกอนอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล	บริษัท ซีโนเทค อะโกรบิสซิเนส จำกัด	-	บริษัท อะโกรซายซ์ อินเตอร์เทรด จำกัด

ลำดับ	เลขที่ กษ	บริษัท	ดำเนินการ	ชื่อวัตถุอันตราย	ชื่อทางการค้า	วัตถุประสงค์	ชื่อผู้ผลิต	แหล่งผลิต	ผู้จัดจำหน่าย
77	กษ 0514 01 2 0037 60	บริษัท ซีโนเทค อะโกรบิสซิเนส จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	ไฮ-แบค (HIGH-BAC)	ลดตะกอนอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล	บริษัท ซีโนเทค อะโกรบิสซิเนส จำกัด	-	บริษัท ยูนิตี้ อินโนเวชั่น อะโกร จำกัด
78	กษ 0514 01 2 0038 60	บริษัท ซีโนเทค อะโกรบิสซิเนส จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	บา-แบค (BA-BAC)	ลดตะกอนอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท ซีโนเทค อะโกรบิสซิเนส จำกัด	-	บริษัท อะโกร ซายซ์ อินเตอร์เทรด จำกัด
79	กษ 0514 01 2 0039 60	บริษัท ซีโนเทค อะโกรบิสซิเนส จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	นีโอแบค (NEOBAC)	ลดตะกอนอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท ซีโนเทค อะโกรบิสซิเนส จำกัด	-	บริษัท ยูนิตี้ อินโนเวชั่น อะโกร จำกัด
80	กษ 0514 01 2 0041 60	บริษัท แอ๊ดว้านซ์ฟาร์ม่า จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	เนอร์ส-แบค (Nurse-Bac)	ลดตะกอนอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท แอ๊ดว้านซ์ฟาร์ม่า จำกัด	-	บริษัท แอ๊ดว้านซ์ฟาร์ม่า จำกัด
81	กษ 0514 01 2 0042 60	บริษัท แอ๊ดว้านซ์ฟาร์ม่า จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	ไบโอ-รีด๊อกซ์ (Bio-Rebox)	ลดตะกอนอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท แอ๊ดว้านซ์ฟาร์ม่า จำกัด	-	บริษัท แอ๊ดว้านซ์ฟาร์ม่า จำกัด
82	กษ 0514 01 2 0045 60	บริษัท ซีโนเทค อะโกรบิสซิเนส จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	ไมโครแบค (MICROBAC)	ลดตะกอนอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล	บริษัท ซีโนเทค อะโกรบิสซิเนส จำกัด	-	บริษัท อะโกร ซายซ์ อินเตอร์เทรด จำกัด
83	กษ 0514 01 2 0051 60	บริษัท อินเว (ประเทศไทย) จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	ซีเคียว แฮทเชอรี่ (Seecure Hatchery)	ลดตะกอนอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท อินเว (ประเทศไทย) จำกัด	-	บริษัท อินเว (ประเทศไทย) จำกัด
84	กษ 0514 01 2 0052 60	บริษัท กู๊ดซุป เวิลด์ จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	ดีวัน (D1)	ลดของเสียในดินตะกอนพื้นบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท กู๊ดซุป เวิลด์ จำกัด	-	บริษัท กู๊ดซุป เวิลด์ จำกัด
85	กษ 0514 01 2 0004 61	บริษัท ไว้ท์เครน (วี.88) อะควาเท็ค จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	ไบโอชิป (BioChip)	ลดปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้ง	บริษัท ไว้ท์เครน (วี.88) อะควาเท็ค จำกัด	-	บริษัท ไว้ท์เครน (วี.88) อะควาเท็ค จำกัด
86	กษ 0514 01 2 0007 61	บริษัท สิงห์อำนวย ฟู้ดส์ จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	เชื้อจุลินทรีย์ (เพื่อนชาวกุ้ง) ชนิดผง	ลดสารอินทรีย์และควบคุมเชื้อวิบริโอในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท สิงห์อำนวย ฟู้ดส์ จำกัด	-	บริษัท สิงห์อำนวย ฟู้ดส์ จำกัด

ลำดับ	เลขที่ กษ	บริษัท	ดำเนินการ	ชื่อวัตถุอันตราย	ชื่อทางการค้า	วัตถุประสงค์	ชื่อผู้ผลิต	แหล่งผลิต	ผู้จัดจำหน่าย
87	กษ 0514 01 2 0016 61	บริษัท ซีโนเทค อะโกรบิสซิเนส จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	ไบโอบอล (BIOBALL)	ลดตะกอนอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท ซีโนเทค อะโกรบิสซิเนส จำกัด	-	บริษัท ยูนิตี้ อินโนเวชั่น อะโกร จำกัด
88	กษ 0514 01 2 0019 61	บริษัท เจริญโภคภัณฑ์อาหาร จำกัด (มหาชน)	ผลิต	จุลินทรีย์	ซุปเปอร์ พีเอส (SUPER PS)	ช่วยลดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์และลดตะกอนอินทรียืในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท เจริญโภคภัณฑ์อาหาร จำกัด	-	บริษัท แอ็ดว้านซ์ ฟาร์ม่า จำกัด
89	กษ 0514 01 2 0020 61	บริษัท ซีโนเทค อะโกรบิสซิเนส จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	นีโอบอล (NEOBALL)	ย่อยสลายสารอินทรียืในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท ซีโนเทค อะโกรบิสซิเนส จำกัด	-	บริษัท อะโกร ซายซ์ อินเตอร์เทรด จำกัด
90	กษ 0514 01 2 0021 61	บริษัท ซีโนเทค อะโกรบิสซิเนส จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	ไมโครบอล (MICROBALL)	ย่อยสลายสารอินทรียืในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท ซีโนเทค อะโกรบิสซิเนส จำกัด	-	บริษัท ยูนิตี้ อินโนเวชั่น อะโกร จำกัด
91	กษ 0514 01 2 0029 61	บริษัท อะโกรไบโอเมท จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	กรีนพ้อยท์ (GREENPOINT)	ลดตะกอนอินทรีย์และควบคุมเชื้อวิบริโอ *Vibrio harveyi* ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท อะโกรไบโอเมท จำกัด	-	บริษัท กรีนเทค อควาคัลเจอร์ จำกัด
92	กษ 0514 01 2 0030 61	บริษัท อะโกรไบโอเมท จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	แบคเตอร์ กรีน (BACTER GREEN)	ลดตะกอนอินทรีย์และควบคุมเชื้อวิบริโอ Vibrio harveyi ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท อะโกรไบโอเมท จำกัด	-	บริษัท กรีนเทค อควาคัลเจอร์ จำกัด
93	กษ 0514 01 2 0038 61	บริษัท ซีโนเทค อะโกรบิสซิเนส จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	แลคโตแบค (LACTOBAC)	ย่อยสลายสารอินทรียืในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท ซีโนเทค อะโกรบิสซิเนส จำกัด	-	บริษัท ยูนิตี้ เทคโนโปรดักซ์ จำกัด
94	กษ 0514 01 2 0039 61	บริษัท ซีโนเทค อะโกรบิสซิเนส จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	ออโต้ แบค (AUTO BAC)	ย่อยสลายสารอินทรียืในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท ซีโนเทค อะโกรบิสซิเนส จำกัด	-	บริษัท อะโกร ซายซ์ อินเตอร์เทรด จำกัด

ลำดับ	เลขที่ กษ	บริษัท	ดำเนินการ	ชื่อวัตถุอันตราย	ชื่อทางการค้า	วัตถุประสงค์	ชื่อผู้ผลิต	แหล่งผลิต	ผู้จัดจำหน่าย
95	กษ 0514 01 2 0040 61	บริษัท ซีโนเทค อะโกรบิสซิเนส จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	โกลเด้นแบค (GOLDENBAC)	ย่อยสลายสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท ซีโนเทค อะโกรบิสซิเนส จำกัด	-	บริษัท ยูนิตี้ เทคโนโปรดักซ์ จำกัด
96	กษ 0514 01 2 0009 62	บริษัท ไมโครไบโอเทค จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	ทรีอีโค 1	ลดตะกอนอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท ไมโครไบโอเทค จำกัด	-	บริษัท ทรี อีโค เวสท์ แมเนจเมนท์ จำกัด
97	กษ 0514 01 2 0024 62	บริษัท อินเว (ประเทศไทย) จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	ซีเคียว พอนด์ (Secure Pond)	ลดตะกอนอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท อินเว (ประเทศไทย) จำกัด	-	บริษัท อินเว (ประเทศไทย) จำกัด
98	กษ 0514 01 2 0028 62	บริษัท ซีโนเทค อะโกรบิสซิเนส จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	ไบโอการ์ด (BIOGUARD)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท ซีโนเทค อะโกรบิสซิเนส จำกัด	-	บริษัท อะโกรซายซ์ อินเตอร์เทรด จำกัด
99	กษ 0514 01 2 0029 62	บริษัท ซีโนเทค อะโกรบิสซิเนส จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	บอดี้การ์ด (BODYGUARD)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท ซีโนเทค อะโกรบิสซิเนส จำกัด	-	บริษัท ยูนิตี้ เทคโนโปรดักซ์ จำกัด
100	กษ 0514 01 2 0030 62	บริษัท ซีโนเทค อะโกรบิสซิเนส จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	เอ็กซ์เซลล์ (EXCELL)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท ซีโนเทค อะโกรบิสซิเนส จำกัด	-	บริษัท อะโกรซายซ์ อินเตอร์เทรด จำกัด
101	กษ 0514 01 2 0031 62	บริษัท ซีโนเทค อะโกรบิสซิเนส จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	แท็กการ์ด (TAGGUARD)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท ซีโนเทค อะโกรบิสซิเนส จำกัด	-	บริษัท ยูนิตี้ เทคโนโปรดักซ์ จำกัด
102	กษ 0514 01 2 0032 62	บริษัท ซีโนเทค อะโกรบิสซิเนส จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	โปรฟิช (PROFISH)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท ซีโนเทค อะโกรบิสซิเนส จำกัด	-	บริษัท ซีโนเทค อะโกรบิสซิเนส จำกัด
103	กษ 0514 01 2 0033 62	บริษัท ซีโนเทค อะโกรบิสซิเนส จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	โปรฟิช (PROFISH)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท ซีโนเทค อะโกรบิสซิเนส จำกัด	-	บริษัท อะโกรซายซ์ อินเตอร์เทรด จำกัด
104	กษ 0514 01 2 0034 62	บริษัท ซีแนทโก อินเตอร์เนชั่นแนล เทรดดิ้ง จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	แบคโตแซค (BACTOSAC)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท ซีแนทโก อินเตอร์เนชั่นแนล เทรดดิ้ง จำกัด	-	บริษัท ซีแนทโก อินเตอร์เนชั่นแนล เทรดดิ้ง จำกัด

ลำดับ	เลขที่ กษ	บริษัท	ดำเนินการ	ชื่อวัตถุอันตราย	ชื่อทางการค้า	วัตถุประสงค์	ชื่อผู้ผลิต	แหล่งผลิต	ผู้จัดจำหน่าย
105	กษ 0514 01 2 0035 62	บริษัท สยามอินเตอร์เนชั่นแนล อะกรีคัลเจอร์ จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	แบคมิกซ์ (BACMIX)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท สยามอินเตอร์เนชั่นแนล อะกรีคัลเจอร์ จำกัด	-	บริษัท สยามอินเตอร์เนชั่นแนล อะกรีคัลเจอร์ จำกัด
106	กษ 0514 01 2 0036 62	บริษัท กู๊ดสปีด อควาเทค จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	พอนด์ เดอ แบค (Pond der Bac)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท กู๊ดสปีด อควาเทค จำกัด	-	บริษัท กู๊ดสปีด อควาเทค จำกัด
107	กษ 0514 01 2 0037 62	บริษัท กู๊ดสปีด อควาเทค จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	แบคต้า-จี (Bacta-G)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท กู๊ดสปีด อควาเทค จำกัด	-	บริษัท กู๊ดสปีด อควาเทค จำกัด
108	กษ 0514 01 2 0045 62	บริษัท เอเชีย สตาร์แลป จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	ไมโคร สตาร์ (MICRO STAR)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท เอเชีย สตาร์แลป จำกัด	-	บริษัท เอเชีย สตาร์แลป จำกัด
109	กษ 0514 01 2 0046 62	บริษัท ออลเวท จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	ไบโอ เพ็ด (BIO PED)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท ออลเวท จำกัด	-	บริษัท ออลเวท จำกัด
110	กษ 0514 01 2 0047 62	บริษัท ออลเวท จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	พีอาร์ แบค 522 (PR BAC 522)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท ออลเวท จำกัด	-	บริษัท ออลเวท จำกัด
111	กษ 0514 01 2 0049 62	บริษัท ซีแพค เอเชีย อิมเมจิง โปรดักส์ จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	เซ็นทิเน็ล-บีเอ็มโอ (Sentinel-BMO)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท ซีแพค เอเชีย อิมเมจิง โปรดักส์ จำกัด	-	บริษัท ซีแพค เอเชีย อิมเมจิงท โปรดักษ์ จำกัด
112	กษ 0514 01 2 0050 62	บริษัท อควา แคร์ เทรดดิ้ง จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	เอ็ม 1000 (M 1000)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท อควา แคร์ เทรดดิ้ง จำกัด	-	บริษัท อควา แคร์ เทรดดิ้ง จำกัด
113	กษ 0514 01 2 0052 62	บริษัท เอเชีย สตาร์แลป จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	เอเชีย สตาร์ แบคซิน (ASIA STAR BACCIN)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท เอเชีย สตาร์แลป จำกัด	-	บริษัท เอเชีย สตาร์แลป จำกัด
114	กษ 0514 01 2 0053 62	บริษัท เอเชีย สตาร์แลป จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	ไบโอ ไทด์ (BIO TIDE)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท เอเชีย สตาร์แลป จำกัด	-	บริษัท เอเชีย สตาร์แลป จำกัด

ลำดับ	เลขที่ กษ	บริษัท	ดำเนินการ	ชื่อวัตถุอันตราย	ชื่อทางการค้า	วัตถุประสงค์	ชื่อผู้ผลิต	แหล่งผลิต	ผู้จัดจำหน่าย
115	กษ 0514 01 2 0054 62	บริษัท สยาม อะกริ ซัพพาย จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	อะควา เพรพ (Aqua Prep)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท สยาม อะกริ ซัพพาย จำกัด	-	บริษัท สยาม อะกริ ซัพพาย จำกัด
116	กษ 0514 01 2 0055 62	บริษัท ไว้ท์เครน (วี.88) อะควาเท็ค จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	ไบโอโทนิค (Bio Tonic)	ควบคุมเชื้อแบคทีเรียวิบริโอในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท ไว้ท์เครน (วี.88) อะควาเท็ค จำกัด	-	บริษัท ไว้ท์เครน (วี.88) อะควาเท็ค จำกัด
117	กษ 0514 01 2 0002 63	บริษัท ออลเวท จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	เซ็นเตอร์ แบค (CENTER BAC)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท ออลเวท จำกัด	-	บริษัท เกษตร เซ็นเตอร์ จำกัด
118	กษ 0514 01 2 0003 63	บริษัท ออลเวท จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	ออล-แบคไซม์ (ALL-BACTZYME)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท ออลเวท จำกัด	-	บริษัท ออลเวท จำกัด
119	กษ 0514 01 2 0004 63	บริษัท ออลเวท จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	ไทโอแบค (THIOBAC)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท ออลเวท จำกัด	-	บริษัท ออลเวท จำกัด
120	กษ 0514 01 2 0009 63	บริษัท ออลเวท จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	ไมตรินิล (MAITRINIL)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท ออลเวท จำกัด	-	บริษัท ออลเวท จำกัด
121	กษ 0514 01 2 0025 63	บริษัท มั่นคงอินเตอร์ฟีด จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	บี-แบค 2090 (B-BAC 2090)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท มั่นคงอินเตอร์ฟีด จำกัด	-	บริษัท มั่นคง อินเตอร์ฟีด จำกัด
122	กษ 0514 01 2 0026 63	บริษัท มั่นคงอินเตอร์ฟีด จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	บีเอสแอล 99 (BSL 99)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท มั่นคงอินเตอร์ฟีด จำกัด	-	บริษัท มั่นคง อินเตอร์ฟีด จำกัด
123	กษ 0514 01 2 0029 63	บริษัท เอเชีย สตาร์ เทรด จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	ไบโอ สตาร์ (Bio Star)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท เอเชีย สตาร์ เทรด จำกัด	-	บริษัท เอเชีย สตาร์ เทรด จำกัด
124	กษ 0514 01 2 0032 63	บริษัท ไว้ท์เครน (วี.88) อะควาเท็ค จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	ไบโออะควา (BioAqua)	ควบคุมเชื้อแบคทีเรียวิบริโอในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท ไว้ท์เครน (วี.88) อะควาเท็ค จำกัด	-	บริษัท ไว้ท์เครน (วี.88) อะควาเท็ค จำกัด

ลำดับ	เลขที่ กษ	บริษัท	ดำเนินการ	ชื่อวัตถุอันตราย	ชื่อทางการค้า	วัตถุประสงค์	ชื่อผู้ผลิต	แหล่งผลิต	ผู้จัดจำหน่าย
125	กษ 0514 01 2 0033 63	บริษัท เจริญโภคภัณฑ์อาหาร จำกัด (มหาชน)	ผลิต	จุลินทรีย์	ไบโอติก (BIOTIC)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท เจริญโภคภัณฑ์อาหาร จำกัด (มหาชน)	-	บริษัท แอ็ดว้านซ์ฟาร์ม่า จำกัด
126	กษ 0514 01 2 0038 63	บริษัท ไว้ท์เครน (วี.88) อะควาเท็ค จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	ไบโอ ซีน (Bio Cean)	ควบคุมเชื้อแบคทีเรียวิบริโอในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท ไว้ท์เครน (วี.88) อะควาเท็ค จำกัด	-	บริษัท ไว้ท์เครน (วี.88) อะควาเท็ค จำกัด
127	กษ 0514 01 2 0039 63	บริษัท ไว้ท์เครน (วี.88) อะควาเท็ค จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	เพาเวอร์เฟรช (PowerFresh)	ควบคุมเชื้อแบคทีเรียวิบริโอในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท ไว้ท์เครน (วี.88) อะควาเท็ค จำกัด	-	บริษัท ไว้ท์เครน (วี.88) อะควาเท็ค จำกัด
128	ษ 0514 01 2 0001 64	บริษัท สยาม อะกริ ซัพพาย จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	อะควา ไพร์ม (Aqua Prime)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท สยาม อะกริ ซัพพาย จำกัด	-	บริษัท สยาม อะกริ ซัพพาย จำกัด
129	กษ 0514 01 2 0052 63	บริษัท แอ็ดว้านซ์ฟาร์ม่า จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	อีโคแบค (ECOBAC)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท แอ็ดว้านซ์ฟาร์ม่า จำกัด	-	บริษัท แอ็ดว้านซ์ฟาร์ม่า จำกัด
130	กษ 0514 01 2 0003 64	บริษัท มั่นคงอินเตอร์ฟีด จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	บลูแบค (BLUE BAC)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท มั่นคงอินเตอร์ฟีด จำกัด	-	บริษัท มั่นคงอินเตอร์ฟีด จำกัด
131	กษ 0514 01 2 0004 64	บริษัท มั่นคงอินเตอร์ฟีด จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	บีเอสแอล บลู (BSL BLUE)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท มั่นคงอินเตอร์ฟีด จำกัด	-	บริษัท มั่นคงอินเตอร์ฟีด จำกัด
132	กษ 0514 01 2 0005 64	บริษัท ซิสเคม แอครีคัล เจอร์รัล จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	ไอ-แบค (I-BAC)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท ซิสเคม แอครีคัล เจอร์รัล จำกัด	-	บริษัท ซิสเคม แอครีคัลเจอร์รัล จำกัด
133	กษ 0514 01 2 0037 64	บริษัท เอเพ็กซ์ รีเสิร์ช โปรดักส์ จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	วี-10 (V-10)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท เอเพ็กซ์ รีเสิร์ช โปรดักส์ จำกัด	-	บริษัท เอเพ็กซ์ รีเสิร์ช โปรดักส์ จำกัด

ลำดับ	เลขที่ กษ	บริษัท	ดำเนินการ	ชื่อวัตถุอันตราย	ชื่อทางการค้า	วัตถุประสงค์	ชื่อผู้ผลิต	แหล่งผลิต	ผู้จัดจำหน่าย
134	กษ 0514 01 2 0040 64	บริษัท เอเพ็กซ์ รีเสิร์ช โปรดักส์ จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	วีพี-ซายม์ (VP-ZYME)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท เอเพ็กซ์ รีเสิร์ช โปรดักส์ จำกัด	-	บริษัท เอเพ็กซ์ รีเสิร์ช โปรดักส์ จำกัด
135	กษ 0514 01 2 0041 64	บริษัท เวท ซุปพีเรีย คอนซัลแตนท์ จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	คอม-มิค (COM-MIC)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท เวท ซุปพีเรีย คอนซัลแตนท์ จำกัด	-	บริษัท เวท ซุปพีเรีย คอนซัลแตนท์ จำกัด
136	ษ 0514 01 2 0042 64	บริษัท เวท ซุปพีเรีย คอนซัลแตนท์ จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	ครอบซ่า (CROBZA)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท เวท ซุปพีเรีย คอนซัลแตนท์ จำกัด	-	บริษัท เวท ซุปพีเรีย คอนซัลแตนท์ จำกัด
137	กษ 0514 01 2 0043 64	บริษัท เวท ซุปพีเรีย คอนซัลแตนท์ จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	โปร แบค วัน (PRO BAC 1)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท เวท ซุปพีเรีย คอนซัลแตนท์ จำกัด	-	บริษัท เวท ซุปพีเรีย คอนซัลแตนท์ จำกัด
138	กษ 0514 01 2 0046 64	บริษัท อะเมซอน อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	อะเมซอน ไลท์(Amazon Light)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท อะเมซอน อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด	-	บริษัท อะเมซอน อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด
139	กษ 0514 01 2 0048 64	บริษัท เวท ซุปพีเรีย คอนซัลแตนท์ จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	แก๊ป-โปร พลัส (GAP-PRO PLUS)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท เวท ซุปพีเรีย คอนซัลแตนท์ จำกัด	-	บริษัท เวท ซุปพีเรีย คอนซัลแตนท์ จำกัด
140	กษ 0514 01 2 0049 64	บริษัท ซิสเคม แอครีคัล เจอร์รัล จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	เจน-เอ็น (GEN-N)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท ซิสเคม แอครีคัล เจอร์รัล จำกัด	-	บริษัท ซิสเคม แอครีคัลเจอร์รัล จำกัด
141	กษ 0514 01 2 0051 64	บริษัท เจริญโภคภัณฑ์อาหาร จำกัด (มหาชน)	ผลิต	จุลินทรีย์	ฟิกเซอร์ (FIXER)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท เจริญโภคภัณฑ์อาหาร จำกัด (มหาชน)	-	บริษัท แอ๊ดว้านซ์ ฟาร์ม่า จำกัด
142	กษ 0514 01 2 0052 64	บริษัท เจริญโภคภัณฑ์อาหาร จำกัด (มหาชน)	ผลิต	จุลินทรีย์	ไบโอทริม (BIOTRIM)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท เจริญโภคภัณฑ์อาหาร จำกัด (มหาชน)	-	บริษัท แอ๊ดว้านซ์ ฟาร์ม่า จำกัด
143	กษ 0514 01 2 0002 65	บริษัท ไบโอ กรีน อกรีเทค จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	ร็อคโค่ (ROCCO)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท ไบโอ กรีน อกรีเทค จำกัด	-	บริษัท ไบโอ กรีน อกรีเทค จำกัด

ลำดับ	เลขที่ กษ	บริษัท	ดำเนินการ	ชื่อวัตถุอันตราย	ชื่อทางการค้า	วัตถุประสงค์	ชื่อผู้ผลิต	แหล่งผลิต	ผู้จัดจำหน่าย
144	กษ 0514 01 2 0003 65	บริษัท ไบโอ กรีน อกรีเทค จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	โวโนแบค (VONOBAC)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท ไบโอ กรีน อกรีเทค จำกัด	-	บริษัท ไบโอ ฟีโนมีนา จำกัด
145	กษ 0514 01 2 0004 65	บริษัท ไบโอ กรีน อกรีเทค จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	ฟิต แบค (FITT BAC)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท ไบโอ กรีน อกรีเทค จำกัด	-	บริษัท ไบโอ กรีน อกรีเทค จำกัด
146	กษ 0514 01 2 0005 65	บริษัท ไบโอ กรีน อกรีเทค จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	ไดเทส (DITEST)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท ไบโอ กรีน อกรีเทค จำกัด	-	บริษัท ไบโอ กรีน อกรีเทค จำกัด
147	กษ 0514 01 2 0006 65	บริษัท ไบโอ กรีน อกรีเทค จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	ไวโอแคร (VIOKARE)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท ไบโอ กรีน อกรีเทค จำกัด	-	บริษัท ไบโอ กรีน อกรีเทค จำกัด
148	กษ 0514 01 2 0007 65	บริษัท ไบโอ กรีน อกรีเทค จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	เทค พลัส (TECH PLUS)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท ไบโอ กรีน อกรีเทค จำกัด	-	บริษัท ไบโอ กรีน อกรีเทค จำกัด
149	กษ 0514 01 2 0008 65	บริษัท ไบโอ กรีน อกรีเทค จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	นูก้าแบค (NUGABAC)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท ไบโอ กรีน อกรีเทค จำกัด	-	บริษัท ไบโอ กรีน อกรีเทค จำกัด
150	กษ 0514 01 2 0014 65	บริษัท ไทยยูเนี่ยน ฟีดมิลล์ จำกัด (มหาชน)	ผลิต	จุลินทรีย์	อะว๊านต์-ไฟท์เตอร์ (Avant-Fighter)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท ไทยยูเนี่ยน ฟีดมิลล์ จำกัด (มหาชน)	-	บริษัท ไทยยูเนี่ยน ฟีดมิลล์ จำกัด (มหาชน)
151	กษ 0514 01 2 0015 65	บริษัท เอ.เอส.พี. อาหารสัตว์ จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	แบคเตอร์ พี (BACTER P)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท เอ.เอส.พี. อาหารสัตว์ จำกัด	-	บริษัท เอ.เอส.พี. อาหารสัตว์ จำกัด
152	กษ 0514 01 2 0016 65	บริษัท เอ.เอส.พี. อาหารสัตว์ จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	วอเตอร์ แบค (Water bac)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท เอ.เอส.พี. อาหารสัตว์ จำกัด	-	บริษัท เอ.เอส.พี. อาหารสัตว์ จำกัด
153	กษ 0514 01 2 0017 65	บริษัท เอ.เอส.พี. อาหารสัตว์ จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	ซัน แบคเตอร์ (Sun bactter)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท เอ.เอส.พี. อาหารสัตว์ จำกัด	-	บริษัท เอ.เอส.พี. อาหารสัตว์ จำกัด

ลำดับ	เลขที่ กษ	บริษัท	ดำเนินการ	ชื่อวัตถุอันตราย	ชื่อทางการค้า	วัตถุประสงค์	ชื่อผู้ผลิต	แหล่งผลิต	ผู้จัดจำหน่าย
154	กษ 0514 01 2 0018 65	บริษัท เอ.เอส.พี. อาหารสัตว์ จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	แบคซิน 999 (BACCIN 999)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท เอ.เอส.พี. อาหารสัตว์ จำกัด	-	บริษัท เอ.เอส.พี. อาหารสัตว์ จำกัด
155	กษ 0514 01 2 0019 65	บริษัท มั่นคงอินเตอร์ฟีด จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	ฟ้าใส (FAH SAI)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท มั่นคงอินเตอร์ฟีด จำกัด	-	บริษัท มั่นคงอินเตอร์ฟีด จำกัด
156	กษ 0514 01 2 0020 65	บริษัท มาริโอ ไบโอ โปรดักส์ จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	ท็อป บาซิลลัส (TOP Bacillus)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท มาริโอ ไบโอ โปรดักส์ จำกัด	-	บริษัท มาริโอ ไบโอ โปรดักส จำกัด
157	กษ 0514 01 2 0021 65	บริษัท มาริโอ ไบโอ โปรดักส์ จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	แบคเตอร์ โกล์ด (BACTER GOLD)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท มาริโอ ไบโอ โปรดักส์ จำกัด	-	บริษัท เฟิร์มมิ่ง ริช อะโกรเทค จำกัด
158	กษ 0514 01 2 0022 65	บริษัท มาริโอ ไบโอ โปรดักส์ จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	แบคเตอร์ สตาร์ (Bacter star)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท มาริโอ ไบโอ โปรดักส์ จำกัด	-	บริษัท มาสเตอร์เทค โปรดักส์ จำกัด
159	กษ 0514 01 2 0023 65	บริษัท มาริโอ ไบโอ โปรดักส์ จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	มาริโอ โปร (Mario Pro)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท มาริโอ ไบโอ โปรดักส์ จำกัด	-	บริษัท มาริโอ ไบโอ โปรดักส์ จำกัด
160	กษ 0514 01 2 0024 65	บริษัท มาริโอ ไบโอ โปรดักส์ จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	พี-แบคโปร (P-BacPro)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท มาริโอ ไบโอ โปรดักส์ จำกัด	-	ห้างหุ้นส่วนจำกัด พรีเมี่ยม โกลด์ โปรดักส์
161	กษ 0514 01 2 0038 65	บริษัท ไว้ท์เครน (วี.88) อะควาเท็ค จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	ไบโอพอน พลัส (BioPond Plus)	ควบคุมปริมาณแอมโมเนียในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท ไว้ท์เครน (วี.88) อะควาเท็ค จำกัด	-	บริษัท ไว้ท์เครน (วี.88) อะควาเท็ค จำกัด
162	กษ 0514 01 2 0039 65	บริษัท ไว้ท์เครน (วี.88) อะควาเท็ค จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	ไบโอไทม์ (BioTime)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท ไว้ท์เครน (วี.88) อะควาเท็ค จำกัด	-	บริษัท ไว้ท์เครน (วี.88) อะควาเท็ค จำกัด
163	กษ 0514 01 2 0040 65	บริษัท ไว้ท์เครน (วี.88) อะควาเท็ค จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	ไบโอเวย์ (BioWay)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท ไว้ท์เครน (วี.88) อะควาเท็ค จำกัด	-	บริษัท ไว้ท์เครน (วี.88) อะควาเท็ค จำกัด

ลำดับ	เลขที่ กษ	บริษัท	ดำเนินการ	ชื่อวัตถุอันตราย	ชื่อทางการค้า	วัตถุประสงค์	ชื่อผู้ผลิต	แหล่งผลิต	ผู้จัดจำหน่าย
164	กษ 0514 01 2 0041 65	บริษัท ไว้ท์เครน (วี.88) อะควาเท็ค จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	อะควาแคร์ (AquaCare)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท ไว้ท์เครน (วี.88) อะควาเท็ค จำกัด	-	บริษัท ไว้ท์เครน (วี.88) อะควาเท็ค จำกัด
165	กษ 0514 01 2 0042 65	บริษัท ไว้ท์เครน (วี.88) อะควาเท็ค จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	ไบโออะควา ชนิดเม็ด (BioAqua Tablet)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท ไว้ท์เครน (วี.88) อะควาเท็ค จำกัด	-	บริษัท ไว้ท์เครน (วี.88) อะควาเท็ค จำกัด
166	กษ 0514 01 2 0043 65	วิสาหกิจชุมชนผู้เลี้ยงกุ้งฉะเชิงเทรา	ผลิต	จุลินทรีย์	เอ็ม-40 (M-40)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	วิสาหกิจชุมชนผู้เลี้ยงกุ้งฉะเชิงเทรา	-	วิสาหกิจชุมชนผู้เลี้ยงกุ้งฉะเชิงเทรา
167	กษ 0514 01 2 0001 66	บริษัท โกรเบสท์ คอร์โพเรชั่น จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	โกร-โปร ทู (Gro-Pro II)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท โกรเบสท์ คอร์โพเรชั่น จำกัด	-	บริษัท โกรเบสท์ คอร์โพเรชั่น จำกัด
168	กษ 0514 01 2 0004 66	บริษัท ซิตโต้ (ประเทศไทย) จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	บาซิลลัส 1070	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท ซิตโต้ (ประเทศไทย) จำกัด	-	บริษัท ซิตโต้ (ประเทศไทย) จำกัด
169	กษ 0514 01 2 0005 66	บริษัท ซิตโต้ (ประเทศไทย) จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	ไดเจส 2	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท ซิตโต้ (ประเทศไทย) จำกัด	-	บริษัท ซิตโต้ (ประเทศไทย) จำกัด
170	DOFH2660530	บริษัท เอเชีย สตาร์ เทรด จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	ร็อคเก็ต พลัส (ROCKET PLUS)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท เอเชีย สตาร์ เทรด จำกัด	-	บริษัท ซาโกร (ประเทศไทย) จำกัด
171	DOFH2660531	บริษัท เอเอเอ อกริเทค แอนด์ อควาคัลเจอร์ (ประเทศไทย) จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	การ์นูแบค (Granubac)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท เอเอเอ อกริเทค แอนด์ อควาคัลเจอร์ (ประเทศไทย) จำกัด	-	บริษัท เอเอเอ อกริเทค แอนด์ อควาคัลเจอร์ (ประเทศไทย) จำกัด
172	DOFH2660532	บริษัท เอเอเอ อกริเทค แอนด์ อควาคัลเจอร์ (ประเทศไทย) จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	แอโรซาย (Arozyme)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท เอเอเอ อกริเทค แอนด์ อควาคัลเจอร์ (ประเทศไทย) จำกัด	-	บริษัท เอเอเอ อกริเทค แอนด์ อควาคัลเจอร์ (ประเทศไทย) จำกัด

ลำดับ	เลขที่ กษ	บริษัท	ดำเนินการ	ชื่อวัตถุอันตราย	ชื่อทางการค้า	วัตถุประสงค์	ชื่อผู้ผลิต	แหล่งผลิต	ผู้จัดจำหน่าย
173	DOFH2660533	บริษัท เอเอเอ อกริเทค แอนด์ อควาคัลเจอร์ (ประเทศไทย) จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	อควาพอนด์ (Aquapond)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท เอเอเอ อกริเทค แอนด์ อควาคัลเจอร์ (ประเทศไทย) จำกัด	-	บริษัท เอเอเอ อกริเทค แอนด์ อควาคัลเจอร์ (ประเทศไทย) จำกัด
174	DOFH2660541	บริษัท บี.ที. ไบโอเทค 2010 จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	โอเรียนท์โปร (ORIENT PRO)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท บี.ที. ไบโอเทค 2010 จำกัด	-	บริษัท โอเรียนท์ ฟาร์มาเค็ม จำกัด
175	DOFH2660542	บริษัท บี.ที. ไบโอเทค 2010 จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	บูสเตอร์ (BOOSTER)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท บี.ที. ไบโอเทค 2010 จำกัด	-	บริษัท โอเรียนท์ ฟาร์มาเค็ม จำกัด
176	DOFH2660543	บริษัท บี.ที. ไบโอเทค 2010 จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	เพาเวอร์แบค (POWERBACT)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท บี.ที. ไบโอเทค 2010 จำกัด	-	บริษัท โอเรียนท์ ฟาร์มาเค็ม จำกัด
177	DOFH2660544	บริษัท บี.ที. ไบโอเทค 2010 จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	เพสท์แบค (PESTBACT)	ลดตะกอนสารอินทรีย์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท บี.ที. ไบโอเทค 2010 จำกัด	-	บริษัท โอเรียนท์ ฟาร์มาเค็ม จำกัด
178	DOFH2660559	บริษัท แอ๊ดว้านซ์ฟาร์ม่า จำกัด	ผลิต	จุลินทรีย์	ไบโอ-แมกซ์ (Bio-Max)	ลดตะกอนสารอินทรีย์และไฮโดรเจนซัลไฟด์ในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	บริษัท แอ๊ดว้านซ์ฟาร์ม่า จำกัด	-	บริษัท แอ๊ดว้านซ์ฟาร์ม่า จำกัด

ศูนย์ศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบน อันเนื่องมาจากพระราชดำริ
ตำบลคลองขุด อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี
โทร. 039-433216-8 โทรสาร 039-433209
www4.fisheries.go.th/cf-kung_krabaen ,E-mail : kkbrdsc@hotmail.com