บทที่ 4

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

วิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ค่าองค์ประกอบเลือดและโครงสร้างประชากรแบคทีเรียในทางเดินของกุ้งขาวปกติและติดเชื้อไวรัส ทอร่าในบ่อดิน

4.1.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบเลือด

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า ค่าองค์ประกอบเลือดของกุ้งขาวสุขภาพปกติและติดเชื้อไวรัสทอร่าในบ่อดินมีความแตกต่างกัน ซึ่งจากการตรวจสอบปริมาณเม็ดเลือดรวม (Total hemocyte count) พบว่าปริมาณเม็ดเลือดของกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสมีปริมาณต่ำกว่ากุ้งปกติอย่างชัดเจน แสดงให้เห็นว่าเชื้อไวรัสทอร่ามีผลทำให้ปริมาณเม็ดเลือดของกุ้งลดต่ำลง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Song และคณะ (2003) ที่พบว่า การเหนี่ยวนำโรคทอร่าในกุ้งขาวในห้องปฏิบัติการมีผลทำให้ค่าปริมาณเม็ดเลือดของกุ้งลดลงจาก 1.64 $x10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เหลือเพียง 0.34 $x10^7$ เซลล์/มล. ซึ่งการลดลงของปริมาณเม็ดเลือดกุ้งย่อมส่งผลต่อระดับภูมิคุ้มกันที่ต่ำลงของกุ้งด้วย ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณ Oxyhemocyanin ในน้ำเลือดกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสทอร่า พบว่าปริมาณของ Oxyhemocyanin ไม่มีการเปลี่ยนแปลงในขณะที่ปริมาณกลูโคส (Blood glucose) ในน้ำเลือดของกุ้งที่ติดเชื้อในบ่อดินมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งปกติ ทั้งนี้การที่ปริมาณกลูโกสของกุ้งติดเชื้อไวรัสมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นอาจจะแสดงให้เห็นว่ากุ้งจำเป็นที่จะต้องใช้พลังงานสูงขึ้นกว่าปกติในการปรับตัวและการผลิตโปรตีนต่าง ๆ ในการตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัส

4.1.2 การวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียในทางเดินอาหารกุ้งที่ในบ่อดินด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

จากการศึกษาปริมาณแบคทีเรียรวมและแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* spp. ในทางเดินอาหาร 3 ส่วน ได้แก่ ตับและตับอ่อน ลำไส้ส่วนต้น และลำไส้ส่วนปลาย ของกุ้งขาวสุขภาพปกติและติดเชื้อไวรัสทอร่าในบ่อดินด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งผลการศึกษาที่ได้แสดงให้เห็นว่า ปริมาณแบคทีเรียมีการกระจายตัวในช่วงกว้างทั้ง 3 ส่วนของระบบทางเดินอาหารและปริมาณแบคทีเรียรวมในตับและตับอ่อนของกุ้งปกติจากทั้ง 3 แหล่งเลี้ยงที่ทำการศึกษามีปริมาณไม่แตกต่างจากกุ้งติดเชื้อไวรัสทอร่ามากนัก แต่อย่างไรก็ตามการติดเชื้อไวรัสทอร่าก็มีแนวโน้มที่จะทำให้ปริมาณแบคทีเรียรวมในตับและตับอ่อนมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น ในขณะที่แบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อกุ้งติดเชื้อไวรัสทอร่า โดยในกุ้งปกติพบแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. ในปริมาณเพียง 0-1.26 log $CFUg^{-1}$ ในขณะที่พบในกุ้งติดเชื้อไวรัสทอร่าสูงถึง 5.73-7.53 log $CFUg^{-1}$ นอกจากนี้การศึกษาปริมาณแบคทีเรียรวมและแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* spp. ในลำไส้ทั้ง 2 ส่วน พบว่าการติดเชื้อไวรัสทอร่ามีผลทำให้ปริมาณแบคทีเรียรวมในลำไส้ทั้ง 2 ส่วนมีแนวโน้มเพิ่มเพิ่มสูงขึ้นจากที่พบในกุ้งปกติ แต่อย่างไรก็ตามการเพิ่มขึ้นของแบคทีเรียรวมก็ไม่สูงมากนักเมื่อเปรียบเทียบกับการเพิ่มขึ้นของแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. ที่พบว่ามีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อกุ้งติดเชื้อไวรัสทอร่า ซึ่งจากข้อมูลแบคทีเรียที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ แสดงให้เห็นว่าการติดเชื้อไวรัสทอร่ามีผลต่อการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* spp. ในทุกส่วนของทางเดินอาหารที่ทำการศึกษา ทั้งนี้อาจจะเนื่องจากเชื้อไวรัสทอร่ามีผลต่อการลดระดับภูมิคุ้มกันของกุ้ง (Song *et.al.*, 2003) จึงทำให้เชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. ซึ่งเป็นเชื้อฉวยโอกาสมีปริมาณสูงขึ้น นอกจากนี้การตรวจสอบปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. ในลำไส้ทั้ง 2 ส่วนของกุ้งที่มีสุขภาพปกติยังแสดงให้เห็นว่ามีแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. ในปริมาณไม่ถึง 1% ของแบคทีเรียที่เจริญได้ในอาหาร TSA ซึ่งแตกต่างจากรายงานของ Gomez-Gil และคณะ (1998) ที่รายงานว่าเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* เป็นกลุ่มหลักในทุกส่วนของระบบทางเดินอาหารของกุ้งขาว และรายงานว่าพบ *Vibrio* spp.ในตับและตับอ่อนมากถึง 4.30×10^4 $CFUg^{-1}$ (Min.1.11×10^2 $CFUg^{-1}$, Max. 2.67×10^5 $CFUg^{-1}$) ในขณะที่การทดลองครั้งนี้พบว่าแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. ไม่ใช่แบคทีเรียกลุ่มหลักในตับและตับอ่อนของกุ้งปกติ ทั้งนี้ความแตกต่างของผลการศึกษาอาจเนื่องจากสุขภาพของกุ้งตัวอย่างที่ใช้ในการตรวจสอบแตกต่างกัน

4.1.3 การวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียในทางเดินอาหารกุ้งขาวทดลองด้วยวิธี FISH

ในการประยุกต์เทคนิค FISH เพื่อศึกษาโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารกุ้งที่เลี้ยงในบ่อดินได้แสดงให้เห็นถึงโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียในส่วนต่างๆของระบบทางเดินอาหารของกุ้งที่ได้ทำการแบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม นอกจากนี้นำ LGC group มาจัดกลุ่มย่อยออกเป็น 5 subgroup และ γ-Proteobacteria group มาจัดกลุ่มย่อยออกเป็น 3 subgroup โดยใช้ข้อมูลพื้นฐานจาก 16S และ 23S rRNA Phylogenetic tree ทำให้เข้าใจถึงโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารของกุ้งขาวที่มีสุขภาพปกติและเป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญในการเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารเมื่อสัตว์เจ้าบ้านอยู่ในสภาวะเครียดหรือได้รับสารปฏิชีวนะ (Knarreborg *et al*., 2002) ตลอดจนการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากเชื้อแบคทีเรียก่อโรค (Kimura *et al*., 1976; Swidsinski *et al*., 2005) แต่อย่างไรก็ตามโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารก็สามารถที่จะมีการเปลี่ยนแปลงได้จากสาเหตุหลาย ๆ ประการไม่ว่าจะเป็นการเปลี่ยนแปลงตามฤดูกาล (Al-Harbi and Uddin, 2004) รวมถึงการเปลี่ยนแปลงตามช่วงชีวิตของสัตว์เจ้าบ้าน อาหารและปัจจัยอื่นๆซึ่งอาจเป็นการเปลี่ยนแปลงที่ไม่ส่งผลเสียต่อสัตว์เจ้าบ้าน ซึ่งผลการศึกษาโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารของกุ้งขาวที่เลี้ยงในบ่อดินที่มีสุขภาพดีโดยเทคนิค FISH แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่า ในทุกส่วนของระบบทางเดินอาหารกุ้งขาวที่ทำการศึกษามีปริมาณสัดส่วนของ *Eubacteria* เป็นองค์ประกอบหลักของชุมชนจุลินทรีย์ โดยพบสูงถึง 77.58±3.68% ของปริมาณเซลล์ทั้งหมดที่พบในตับและตับอ่อน 80.06±2.69% ของปริมาณเซลล์ทั้งหมดในลำไส้ส่วนกลางและ77.58±3.68% ของปริมาณเซลล์ทั้งหมดในลำไส้ส่วนปลาย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Hart และคณะ (2002) ที่กล่าวว่าโดยส่วนใหญ่ของชุมชนจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์จะพบแบคทีเรียเป็นกลุ่มหลักและมีความหลากหลายสูง ในขณะที่โครงสร้างของชุมชนแบคทีเรียในแต่ละส่วนของระบบทางเดินอาหารของกุ้งขาวมีความแตกต่างกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อทำการเปรียบเทียบโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียของตับและตับอ่อนกับลำไส้ทั้งสองส่วน พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนทั้งในแง่ของกลุ่มแบคทีเรียหลักและปริมาณสัดส่วนของแบคทีเรียแต่ละกลุ่มเมื่อเทียบกับปริมาณ *Eubacteria* ทั้งหมด ทั้งนี้เนื่องจากสภาวะแวดล้อมในแต่ละส่วนของระบบทางเดินอาหารต่างกัน ไม่ว่าจะเป็นค่าความเป็นกรดด่าง สารอาหารรวมถึงเอนไซม์ต่างๆที่ใช้ในกระบวนการย่อยอาหารของกุ้ง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาความหลากหลายของชุมชนแบคทีเรียในลำไส้ไก่ของ Lu และคณะ (2003) ที่พบว่ามีความแตกต่างอย่างชัดเจนของแบคทีเรียกลุ่มเด่นระหว่างลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ของไก่ และสอดคล้องสัตว์ชนิดอื่นๆที่ได้ทำการศึกษาโดยใช้เทคนิคในการติดตาม rRNA เช่นการศึกษาของ Depalncke และคณะ (2000) ที่ทำการศึกษาในหนูและ Pryde และคณะ (1999) ทำการศึกษาในหมูรวมถึงในมนุษย์ (Suau *et al*., 1999;

Wilson *et al*.,1999) แต่เมื่อนำโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียของลำไส้ส่วนกลางและส่วนปลายมาทำการเปรียบเทียบ พบว่ามีแบคทีเรียกลุ่มหลักเป็นกลุ่มเดียวกัน คือ LGC group รวมถึงสัดส่วนของกลุ่มแบคทีเรียอื่นๆไม่แตกต่างกันมากนัก ทั้งนี้อาจเนื่องจากสภาวะแวดล้อมและปัจจัยจำกัดในการเจริญของแบคทีเรียในลำไส้ทั้งสองส่วนไม่แตกต่างกันมากนัก ในขณะที่ตับและตับอ่อนจะพบแบคทีเรียกลุ่มเด่นเป็นกลุ่ม β-Proreobacteria และ γ-Proreobacteria นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียกลุ่ม LGC เป็นแบคทีเรียกลุ่มรองรวมถึงการศึกษาสัดส่วนย่อยของแบคทีเรียกลุ่ม γ-Proreobacteria และ LGC ที่แสดงให้เห็นว่า ในตับและตับอ่อนของกุ้งปกติพบแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. น้อยมาก โดยมีสัดส่วนเฉลี่ยไม่เกิน 1% และพบว่าแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp. เป็นแบคทีเรียกลุ่มเด่นในกลุ่มของ LGC

ในขณะที่การศึกษาโครงสร้างประชากรแบคทีเรียในทางเดินอาหารของกุ้งติดเชื้อไวรัสทอร่าแสดงให้เห็นว่า ในทุกส่วนของระบบทางเดินอาหารของกุ้งขาวที่ทำการศึกษามีปริมาณสัดส่วนของ *Eubacteria* เป็นองค์ประกอบหลักของชุมชนจุลินทรีย์เช่นเดียวกับการศึกษาในกุ้งปกติ แต่อย่างไรก็ตามโครงสร้างของชุมชนแบคทีเรียของส่วนต่างๆในทางเดินอาหารก็มีการเปลี่ยนแปลงไปจากโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียที่พบในกุ้งปกติ โดยพบว่า โครงสร้างประชากรแบคทีเรียในตับและตับอ่อนของกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสทอร่ามีสัดส่วนของแบคทีเรียในกลุ่ม γ-Proteobacteria เพิ่มสูงขึ้นอย่างชัดเจน โดยจากผลการศึกษาพบว่าเพิ่มสูงขึ้นกว่า 2.8 เท่าเมื่อเทียบกับกุ้งปกติ และนอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp.ซึ่งเป็นกลุ่มย่อยของ γ-Proteobacteria group มีปริมาณสัดส่วนเพิ่มสูงขึ้นกว่า 10 เท่าเมื่อเทียบกับกุ้งปกติ รวมถึงการศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชากรแบคทีเรียในลำไส้ทั้ง 2 ส่วนก็พบว่ามีแนวโน้มในการเปลี่ยนแปลงเช่นเดียวกับตับและตับอ่อนโดยพบว่า โครงสร้างประชากรแบคทีเรียในลำไส้ส่วนต้นของกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสทอร่ามีสัดส่วนของแบคทีเรียในกลุ่ม γ-Proteobacteria เพิ่มสูงขึ้นอย่างชัดเจน โดยจากผลการศึกษาพบว่าเพิ่มสูงขึ้นกว่า 41.02% เมื่อเทียบกับกุ้งปกติและกลายเป็นแบคทีเรียเด่นในลำไส้ นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. ซึ่งเป็นกลุ่มย่อยของ γ-Proteobacteria group มีปริมาณสัดส่วนเพิ่มสูงขึ้นกว่า 96.16% เมื่อเทียบกับกุ้งปกติ ในขณะที่แบคทีเรียกลุ่มอื่น ๆ มีปริมาณลดลงเมื่อเทียบกับกุ้งปกติ ซึ่งข้อมูลทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าการติดเชื้อไวรัสทอร่าในกุ้งขาวส่งผลต่อการการติดเชื้อฉวยโอกาสร่วม (secondary infected) ของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* spp. ในทางเดินอาหารทุกส่วนที่ทำการศึกษา รวมถึงการลดความหลากหลายของโครงสร้างประชากรแบคทีเรียโดยเฉพาะอย่างยิ่งในตับและตับอ่อนของกุ้งขาวอย่างชัดเจน

4.2 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบเลือดและโครงสร้างประชากรแบคทีเรียในทางเดินของกุ้งขาวจากผลของ ไวรัสทอร่า, แบคทีเรียก่อโรค และโปรไปโอติก

4.2.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบเลือด

จากการวิเคราะห์ค่าองค์ประกอบเลือดของกุ้งขาวและโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียในแต่ละชุดการทดลองทั้ง 6 ชุดการทดลอง ใน 4 ระยะเวลาตามที่กำหนด โดยทำการวิเคราะห์ปริมาณเม็ดเลือดรวม (total hemocyte count), ค่า Oxyhemocyanin, อัตราส่วนระหว่างปริมาณ Oxyhemocyanin กับปริมาณโปรตีนรวมในน้ำเลือด และปริมาณกลูโคส (blood glucose)ในน้ำเลือด รวมถึงปริมาณที่สนใจในทางเดินอาหารของกุ้งด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ นอกจากนี้ยังทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียในตับและตับอ่อน รวมถึงในลำไส้ของกุ้งขาวทุกชุดการทดลองด้วนเทคนิค FISH เพื่ออธิบายถึงลักษณะการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียพบว่า

การติดเชื้อไวรัสทอร่า, แบคทีเรีย *V. harveyi* AAHRC 01, และการติดเชื้อไวรัสทอร่าร่วมกับแบคทีเรีย *V. harveyi* AAHRC 01 มีผลต่อการลดลงของปริมารเม็ดเลือดรวมเช่นเดียวกัน ซึ่งข้อมูลดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาในบ่อดินที่พบว่ากุ้งติดเชื้อไวรัสทอร่าซินโดรมมีปริมาณเม็ดเลือดที่ต่ำกว่ากุ้งปกติแต่อย่างไรก็ตามในชุดการทดลองที่ได้รับเชื้อ *L. plantarum* TISTR 050 ร่วมกับเชื้อไวรัสทอร่าหรือ *V. harveyi* AAHRC 01 ที่ยังคงมีปริมาณเม็ดเลือดที่ใกล้เคียงกับชุดควบคุม ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Gullian และคณะ (2004) ที่พบว่าโปรไปโอติกสายพันธุ์ *Bacillus* P64 และ *Vibrio* P62 สามารถช่วยต้านทานการเกิดโรคจากเชื้อ *V. alginolyticus* และช่วยในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวได้ แต่ในวันที่ 5 หลังเหนี่ยวนำโรคปริมาณเม็ดเลือดของชุดการทดลองที่ได้รับ *L. plantarum* TISTR 050 ก็มีแนวโน้มลดลงทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการลดลงของสัดส่วน *L. plantarum* TISTR 050 ในทางเดินอาหารของกุ้งทดลอง นอกจากนี้ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่าลักษณะการตอบสนองของเม็ดเลือดกุ้งต่อเชื้อไวรัสทอร่ามีความแตกต่างจากเชื้อ *V. harveyi* หากสังเกตในวันที่ 1 หลังเหนี่ยวนำโรคจะพบว่าปริมาณเม็ดเลือดของชุดการทดลองที่ได้รับเชื้อ *V. harveyi* เพียงชนิดเดียวนั้นมีปริมาณเม็ดเลือดที่สูงขึ้นในขณะที่ชุดการทดลองที่ได้รับเชื้อไวรัสจะมีปริมาณต่ำลง ทั้งนี้เนื่องจากโดยปกติของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้งจะใช้เม็ดเลือดในการเข้าทำลายสิ่งแปลกปลอม เช่น เชื้อแบคทีเรียจึงทำให้ปริมาณเม็ดเลือดสูงขึ้น ในขณะที่การติดเชื้อไวรัสมีผลต่ออวัยวะสร้างเม็ดเลือดของกุ้งจึงทำให้กุ้งผลิตเม็ดเลือดได้น้อยลง ซึ่งผลให้ระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งลดต่ำลง จากการตรวจสอบปริมาณ Oxyhemocyanin, ปริมาณโปรตีนรวม, และสัดส่วนของ Oxyhemocyanin ต่อปริมาณโปรตีนรวมในชุดการทดลองต่างๆ แสดงให้เห็นว่า

ปริมาณ Oxyhemocyanin และปริมาณโปรตีนรวมในน้ำเลือดกุ้งไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ในทุกชุดการทดลองตลอดระยะเวลาการทดลอง แต่อย่างไรก็ตามอัตราส่วน ระว่าง Oxyhemocyanin และปริมาณโปรตีนรวมในน้ำเลือดกุ้งก็มีการเปลี่ยนแปลง โดยพบว่าในวันที่ 1 หลังการเหนี่ยวนำเชื้อชุดการทดลองที่ได้รับเชื้อไวรัสทอร่าและไวรัสทอร่าร่วมกับเชื้อ *V. harveyi* AAHRC 01 มีอัตราส่วนระว่างOxyhemocyanin และปริมาณโปรตีนรวมในน้ำเลือดที่ลดลง ซึ่ง Oxyhemocyanin เป็นโปรตีนที่สำคัญ ชนิดหนึ่งในน้ำเลือดของกุ้งเนื่องจากมีหน้าที่ในการขนส่งออกซิเจนไปเลี้ยงเซลล์ในส่วนต่างๆของกุ้งในลักษณะเดียวกับ Haemoglobin

ในขณะที่การตรวจสอบปริมาณกลูโกสในน้ำเลือดพบว่า การติดเชื้อไวรัสหรือแบคทีเรียมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของระดับกลูโกสในน้ำเลือดกุ้ง ถึงแม้ว่าจะมีการเสริมโปรไบโอติกก็ตาม แต่อย่างไรก็ดีการเพิ่มขึ้นของระดับกลูโกสก็แสดงให้เห็นว่าการเกิดโรค กุ้งอาจจะจำเป็นที่จะต้องใช้พลังงานในการปรับสภาพร่างกายที่สูงกว่าปกติ นอกจากนี้ยังพบว่าในวันที่ 5 หลังการเหนี่ยวนำโรคในชุดการทดลองที่ได้รับเชื้อ *V. harveyi* AAHRC 01 ร่วมกับ *L. plantarum* TISTR 050 พบว่ากลูโกสมีปริมาณไม่แตกต่างจากชุดควบคุมซึ่งอาจจะเกิดจากการปรับตัวของกุ้งให้เข้ากับสภาวะการของสุขภาพกุ้ง

4.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียในทางเดินอาหารกุ้งทดลองด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

จากการติดตามผลของเชื้อไวรัสทอร่า, *V. harveyi* AAHRC 01, และ *L. plantarum* TISTR 050 ต่อการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างประชากรแบคทีเรียในทางเดินอาหารของกุ้งทดลองด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ พบว่าในส่วนของตับและตับอ่อนของกุ้งก่อนการเหนี่ยวนำโรคและชุดควบคุมตลอดระยะเวลาการทดลองไม่พบเชื้อ *Vibrio* spp. แต่ในชุดการทดลองที่มีการเหนี่ยวนำโรคโดยปราศจากการเสริมโปรไบโอติกพบว่า มีการเพิ่มขึ้นของแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. อย่างชัดเจนตลอดระยะเวลาการทดลอง ในขณะที่ชุดทดลองที่มีการเหนี่ยวนำโรคร่วมกับการให้โปรไบโอติกแทบจะไม่มีการเพิ่มขึ้นของแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. ยกเว้นในช่วงปลายของการทดลองที่พบการเพิ่มขึ้นของ *Vibrio* spp. แต่อย่างไรก็ตามหากเปรียบเทียบกับข้อมูลปริมาณแบคทีเรีย *L. plantarum* ก็จะพบว่าปริมาณ *L. plantarum* มีแนวโน้มที่จะลดลงตลอดการทดลองและในช่วงวันที่ 5 หลังการเหนี่ยวนำโรคไม่พบ *L. plantarum* ในตับและตับอ่อน ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่ *L. plantarum* ในชุมชนแบคทีเรียมีปริมาณที่น้อยเกินกว่าจะควบคุมเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ แต่อย่างไรก็ตามผลการทดลองก็แสดงให้เห็นว่า *L. plantarum* สามารถที่อยู่ในตับและตับอ่อนของกุ้งได้เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 24 hr. แต่อย่างไรก็ดีการตรวจสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้ออย่าง

เดียวยังไม่สามารถที่จะยืนยันถึงการมีอยู่ของ *L. plantarum* ได้อย่างชัดเจน เนื่องจากการตรวจสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำการนับแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS และมีลักษณะโคโลนีใกล้เคียงกับเชื้อ *L. plantarum* TISTR 050 เท่านั้น ดังนั้นการทดลองครั้งนี้ได้มีการยืนยันผลการมีอยู่ของเชื้อ *L. plantarum* ด้วยโพรบที่จำเพาะโดยเทคนิค FISH ในการทดลองต่อไป

ในการศึกษาปริมาณแบคทีเรียในลำไส้ของกุ้งทดลอง พบว่าปริมาณแบคทีเรียรวมในชุดการทดลองที่มีการเหนี่ยวนำโรคโดยไม่ให้โปรไบโอติกมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตลอดการทดลอง ในขณะที่ชุดควบคุมและชุดการทดลองมีการเหนี่ยวนำโรคร่วมกับการให้โปรไบโอติกพบว่าปริมาณแบคทีเรียรวมไม่มีการเพิ่มขึ้นมากนัก ยกเว้นในวันที่ 5 หลังการเหนี่ยวนำโรค ในขณะที่การตรวจแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. พบว่า ชุดการทดลองที่มีการเสริมโปรไบโอติกมีปริมาณแบคทีเรียที่ต่ำกว่าชุดการทดลองที่มีการเหนี่ยวนำโรคโดยไม่ให้โปรไบโอติกอย่างชัดเจน โดยเฉพาะวันที่ 3 หลังการเหนี่ยวนำโรค ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโปรไบโอติก *L. plantarum* สามารถที่จะควบคุมการเพิ่มของแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. ได้ทั้งสภาวะที่มีการติดเชื้อ *Vibrio* spp. เพียงชนิดเดียวรวมถึงการติดเชื้อ *Vibrio* spp. ร่วมกับ ไวรัสทอร่า นอกจากนี้ผลการทดลองยังได้ยืนยันผลของการติดเชื้อไวรัสทอร่าต่อการเพิ่มขึ้นของเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. ในทางเดินอาหารของกุ้ง นอกจากนี้ยังพบว่า *L. plantarum* สามารถที่จะคงอยู่ในลำไส้ของกุ้งได้เป็นเวลาอย่างน้อย 3 วันหลังจากการหยุดให้เชื้อโปรไบโอติดแก่กุ้งทดลอง แต่อย่างไรก็ตามจากผลการตรวจสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS พบว่ามีโคโลนีที่มีลักษณะใกล้เคียงกับ *L. plantarum* ในชุดการทดลองที่ไม่ได้รับเชื้อ *L. plantarum* ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องให้เทคนิคในการติดตาม rRNA ในการยืนยันถึงการมีอยู่ของเชื้อ *L. plantarum* ในชุดการทดลองต่าง ๆ ต่อไป

4.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียในทางเดินอาหารกุ้งทดลองด้วยวิธี FISH

จากผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียในทางเดินอาหารของกุ้งทดลองจากผล เชื้อไวรัสทอร่า, *V. harveyi* AAHRC 01, และ *L. plantarum* TISTR 050 แสดงให้เห็นว่า ในตับและตับอ่อนของกุ้งทดลองที่ได้รับ *L. plantarum* TISTR 050 มีปริมาณของแบคทีเรียในกลุ่ม LGC ในสัดส่วนที่สูงกว่าชุดการทดลองที่ไม่ได้รับอย่างชัดเจน เมื่อทำการตรวจสอบแบคทีเรียในกลุ่ม *Lactobacillus* spp. ซึ่งเป็นสมาชิกใน LGC group พบว่ามีปริมาณที่สูงกว่าชุดการทดลองอื่นๆเช่นเดียวกัน รวมถึงการตรวจสอบการคงอยู่ของแบคทีเรีย *L. plantarum* ที่พบว่ามีอยู่ในเฉพาะชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมโปรไบโอติกเท่านั้น ซึ่งข้อมูลทั้งหมดเป็นการยืนยันถึงการคงอยู่ของเชื้อ *L. plantarum* ในชุมชนแบคทีเรียที่มีการเสริมโปรไบโอติกอย่างชัดเจน แต่อย่างไรก็ตามสัดส่วนของแบคทีเรียในกลุ่ม LGC ต่อ *Eubacteria* , *Lactobacillus* spp. ต่อ LGC group รวมถึงสัด

ส่วนของ *L. plantarum* ต่อปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacillus* spp. ทั้งหมดก็มีแนวโน้มลดลงตลอดระยะเวลาการทดลอง ซึ่งแสดงให้เห็นว่า *L. plantarum* อาจจะไม่สามารถคงปริมาณหรือเพิ่มจำนวนในทางเดินอาหารของกุ้งได้ แต่อย่างไรก็ตามผลการทดลองครั้งนี้ก็ได้พิสูจน์ให้เห็นว่า *L. plantarum* สามารถที่จะอยู่ในตัวและตับอ่อนของกุ้งได้ไม่น้อยกว่า 1วัน รวมถึงมีประสิทธิภาพในการควบคุมแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. แต่การควบคุมแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. จะเห็นได้ว่าปริมาณเชื้อ *L. plantarum* ในตับและตับอ่อนลดปริมาณจนไม่สามารถตรวจพบได้ตั้งแต่วันที่ 3 หลังการเหนี่ยวนำโรค แต่อย่างไรก็ดีสัดส่วนของแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. ก็ไม่ได้สูงขึ้นในทันที ซึ่งจากผลการทดลองแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าในวันที่ 3 หลังการเหนี่ยวนำโรค สัดส่วนของแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. ในชุดการทดลองที่มีการเสริมโปรไบโอติกมีสัดส่วนที่ต่ำกว่าชุดการทดลองที่ไม่ได้เสริมโปรไบโอติกอย่างชัดเจน ทั้งนี้อาจจะเกิดจากการคงอยู่ extracellular products ที่เชื้อ *L. plantarum* ผลิต หรือ อาจจะเกิดจากการปล่อย extracellular products จากเชื้อ *L. plantarum* ที่มีชีวิตในลำไส้เข้าสู่ในตับและตับอ่อน ทั้งนี้เนื่องจากรายงานของ บุญกอบ และ คณะ (2548) ได้รายงานว่า *L. plantarum* มีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *V. harveyi* และ*V. parahaemolyticus* ด้วยวิธีการซึมผ่านวุ้น (agar well diffusion) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า extracellular products ของ*L. plantarum* มีผลต่อการยับยั้งเชื้อ *V. harveyi* และ *V. parahaemolyticus* ซึ่งสอดคล้องกับรายงาน Van Reenen และคณะ (1998) ได้แยก *L. plantarum* 423 จาก Sorghum beer สามารถผลิตแบคเทอริโอซิน ชนิด plantaricin 423 ซึ่งสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียและเชื้อก่อโรคหลายชนิด เช่น *Bacillus cereus*, *Clostridium spongenes*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria* spp. และ *Staphylococcus* spp. และได้กล่าวถึงคุณลักษณะของ plantaricin 423 คือ สามารถคงสภาพที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส แต่สูญเสียกิจกรรม 50 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที และ 75 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที อยู่ในช่วง pH 1.0 ถึง 10.0 สูญเสียกิจกรรมเมื่อมี pepsin, papain, α-chymotrypsin, trypsin และ proteinase K และมีขนาดประมาณ 3-5 kDa เป็นต้น รวมถึงการทดลองของ Ogunbanwo และคณะ (2003) ได้ทดลองแยก *L. plantarum* F1 และ *L. brevis* OG1 จากอาหารหมัก Nigerian ซึ่งผลิตสารแบคเทอริโอซินที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรค เชื้อที่ทำให้อาหารเน่าเสีย และแบคทีเรียแลกติกอีกหลายชนิด รวมถึงการกล่าวถึงคุณลักษณะของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อทั้ง 2 ชนิด คือ แบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *L. brevis* OG1 สามารถคงสภาพต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที อยู่ในช่วง pH 2.0-8.0 ส่วนแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *L. plantarum* F1 สามารถคงสภาพต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที อยู่ในช่วงเวลา pH 2.0-6.0 ซึ่งข้อมูลทั้งหมดแสดงให้เห็นว่า แบคเทอริโอซินของ *L. plantarum* มีผลในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆได้ แต่อย่างไรก็ดี แบคเทอริ

โอซินก็สามารถโดยทำลายด้วย เอนไซม์ หลายชนิดในทางเดินอาหารกุ้ง ในการติดตามการเปลี่ยนแปลงชุมชนแบคทีเรียที่เป็นสมาชิกในกลุ่ม γ-Proteobacteria พบว่าในชุดการการทดลองที่มีการเหนี่ยวนำโรคด้วยเชื้อไวรัสทอร่า, เชื้อไวรัสทอร่าร่วมกับ *V. harveyi*, และ *V. harveyi* มีการเปลี่ยนแปลงในลักษณะเดียวกัน โดยพบการเพิ่มขึ้นของแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. อย่างชัดเจน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อไวรัสทอร่ามีผลต่อการส่งเสริมให้แบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. มีสัดส่วนที่เพิ่มสูงขึ้นในตับและตับอ่อนของกุ้ง ในขณะที่ชุดการทดลองที่ได้รับโปรไบโอติกมีสัดส่วนของ *Vibrio* spp. ต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า *L. plantarum* มีประสิทธิภาพในการควบคุม *Vibrio* spp. ในตับและตับอ่อนของกุ้ง

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียในลำไส้ของกุ้งทุกชุดการทดลองแสดงให้เห็นว่า ชุดการทดลองที่มีการเหนี่ยวนำโรคโดยไม่มีการเสริมให้โปรไบโอติก พบว่ามีแบคทีเรีย กลุ่ม γ-Proteobacteria เพิ่มสูงขึ้นตลอดการทดลอง ซึ่งเมื่อทำการวิเคราะห์กลุ่มแบคทีเรียที่เป็นสมาชิกของ γ-Proteobacteria group พบว่า *Vibrio* spp. มีการเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเช่นเดียวกับในตับและตับอ่อน ในขณะที่สัดส่วนของแบคทีเรียที่เป็นสมาชิกใน LGC group ไม่มีการเปลี่ยนแปลงจากผลของการเหนี่ยวนำโรค แต่อย่างไรก็ตามการเพิ่มขึ้นของสัดส่วน γ-Proteobacteria group ก็ส่งผลให้แบคทีเรียกลุ่มอื่นมีสัดส่วนที่ลดลง ในการติดตามการเปลี่ยนแปลงชุมชนแบคทีเรียของชุดการทดลองที่มีการเหนี่ยวนำโรคร่วมด้วยกับการให้โปรไบโอติก พบว่ามีสัดส่วนของแบคทีเรียในกลุ่ม LGC มากกว่ากลุ่มที่ไม่ได้ให้โปรไบโอติก รวมถึงแบคทีเรียในกลุ่ม *Lactobacillus* spp. ที่เป็นสมาชิกใน LGC group ก็มีปริมาณที่สูงกว่าชุดการทดลองที่ไม่ได้รับโปรไบโอติก นอกจากนี้ยังพบว่ามีเพียงแต่ชุดการทดลองที่ได้รับโปรไบโอติกเท่านั้นที่ตรวจพบ *L. plantarum* ในการติดตามโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียพบว่า สัดส่วนของ γ-Proteobacteria group ไม่มีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งแตกต่างจากชุดการทดลองที่มีการเหนี่ยวนำโรคโดยไม่ได้ให้โปรไบโอติก นอกจากนี้ยังพบว่า แบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* spp. ไม่ได้มีสัดส่วนสูงขึ้นจากปกติ ซึ่งข้อมูลทั้งหมดแสดงให้เห็นว่า *L. plantarum* TISTR 050 สามารถที่จะควบคุมการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียจากการเหนี่ยวนำโรคด้วย เชื้อไวรัสทอร่า, แบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* AAHRC 01, และเชื้อทอร่าร่วมกับแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* AAHRC 01 แต่อย่างไรก็ตามเชื้อ *L. plantarum* TISTR 050 ก็ยังมีข้อจำกัดในการคงอยู่ในระบบทางเดินอาหารของกุ้งที่สามารถคงอยู่ได้ในระยะเวลาอันสั้น