บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ในปัจจุบันอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศไทยเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเพาะเลี้ยงกุ้ง ซึ่งในปัจจุบันมีการพัฒนาปรับปรุงเทคโนโลยีการเลี้ยงอย่างรวดเร็วและต่อเนื่องอยู่ตลอดเวลาเพื่อเพิ่มผลผลิตและลดต้นทุนการเลี้ยง ซึ่งในปี 2546 ผลผลิตกุ้งโดยรวมของประเทศเป็นกุ้งขาวถึง 50% ของปริมาณทั้งหมดและมีแนวโน้มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง แต่อย่างไรก็ตามในช่วง 10 ปีที่ผ่านมามีแนวโน้มการแพร่ระบาดของโรคสูงขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียและไวรัส ซึ่งทำความเสียหายแก่อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งของประเทศเป็นอย่างมาก โดยโรคระบาดที่พบมากในการเลี้ยงกุ้งของประเทศไทยได้แก่ โรคติดเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* spp. ซึ่งพบได้หลายชนิด เช่น *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus* เป็นต้น และโรคติดเชื้อไวรัส ซึ่งเชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดปัญหาสำคัญในการเพาะเลี้ยงกุ้งขาว คือ White Spot Syndrome Virus (WSSV), Tuara Syndrome Virus (TSV), และ Infectious Hydodermal and Hemotopoietic Necrosis Virus (IHHNV) แต่อย่างไรก็ดีการวิจัยครั้งนี้ได้ให้ความสำคัญกับการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชากรแบคทีเรียในทางเดินอาหารของกุ้งขาวที่มีผลจากการติดเชื้อไวรัสทอร่า เนื่องจากการเกิดโรคทอร่าในประเทศไทยส่วนใหญ่จะเป็นแบบไม่เฉียบพลันและการตรวจสอบเบื้องต้นของการทดลองในครั้งนี้พบว่า กุ้งที่ติดเชื้อไวรัสทอร่ามีแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. ในตับและตับอ่อนในปริมาณที่สูงกว่าปกติ ดังนั้นหากเข้าใจถึงลักษณะการเปลี่ยนแปลงและการควบคุมแบคทีเรียฉวยโอกาสในทางเดินอาหารก็จะเป็นประโยชน์ต่อเกษตรกรในการจัดการระบบการเลี้ยงกุ้งให้เหมาะสมในสภาวะติดเชื้อไวรัสทอร่าต่อไป แต่อย่างไรก็ตามเมื่อประสบปัญหาโรคระบาดเกษตรกรบางส่วนยังนิยมใช้ยาปฏิชีวนะในการควบคุมโรคซึ่งก่อให้เกิดปัญหาต่าง ๆ มากมาย ไม่ว่าจะเป็นการกีดกันสินค้า ปัญหาต่อสิ่งแวดล้อมรวมถึงการดื้อยาของเชื้อโรค ถึงแม้ว่าในปัจจุบันประเทศไทยได้มีการประกาศห้ามใช้ยาปฏิชีวนะหลายชนิดแล้วก็ตาม เช่น ยาในกลุ่มเฟนนิคอล และไนโตรฟูแรน เป็นต้น ดังนั้นจึงควรรณรงค์ให้เกษตรหันมาใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมแบคทีเรียก่อโรคและช่วยรักษาสมดุลของโครงสร้างประชากรแบคทีเรียในทางเดินอาหารกุ้ง

แนวทางในการพัฒนาจุลินทรีย์โปรไบโอติกเพื่อใช้ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในการเพาะเลี้ยงกุ้ง ในปัจจุบันจะเน้นการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากธรรมชาติแล้วทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรคของกุ้งในหลอดทดลอง จากนั้นจะทำการทดลองให้โปรไบโอติกที่แยกให้แก่กุ้งทดลองแล้วทำการเหนี่ยวนำโรคด้วยเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ หากกุ้งมีอัตราการรอดตายสูงก็จะสรุปว่าเชื้อแบคทีเรียชนิดนั้นเป็นโปรไบโอติก ซึ่งในปัจจุบันถือว่าเป็นแนวทางที่เหมาะสมในการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อโปรไบโอติกต่อการป้องกันโรคจากแบคทีเรียหรือการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้ง แต่อย่างไรก็ตามก็ยังไม่สามารถอธิบายถึงกระบวนการในการควบคุมแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหารของสัตว์ได้อย่างชัดเจน

ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้ จึงทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบเลือดและโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียในตับและตับอ่อนรวมถึงในลำไส้ส่วนต้นและส่วนปลายของกุ้งขาวที่ติดเชื้อไวรัสทอร่าในสภาพการเลี้ยงจริงในบ่อดิน เพื่อแสดงให้เห็นถึงผลกระทบของการติดเชื้อไวรัสทอร่าต่อองค์ประกอบเลือดและลักษณะการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างประชากร แบคทีเรียในทางเดินอาหารกุ้งโดยทำการจัดจำแนกกลุ่มแบคทีเรียที่พบในทางเดินอาหาร ของกุ้งที่ทำการศึกษาออกเป็น 7 กลุ่ม ซึ่งประกอบด้วย α-Proteobacteria, β-Proteobacteria, γ-Proteobacteria, *High G+C gram positive* (HGC), *Low G+C gram positive* (LGC), *Cytophaga-Flavobacterum –Bacteroides* (CFB) และ Other bacteria นอกจากนี้ยังทำการจัดจำแนกแบคทีเรียในกลุ่ม γ-Proteobacteria และ LGC ออกเป็นกลุ่มย่อย โดย γ-Proteobacteria จะทำการจัดจำแนกออกเป็น 3 กลุ่มย่อย ได้แก่ *Vibrio* spp., *Pseudomonas* spp., และ Other bacteria ในขณะที่ LGC จะทำการจัดจำแนกออกเป็น 5 กลุ่มย่อย ได้แก่ *Bacillus* spp., *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., และ Other bacteria ซึ่งการจัดกลุ่มแบคทีเรียทั้งหมดใช้เทคนิค FISH ในการจัดจำแนก โดยอาศัยหลักการการจัดกลุ่มแบคทีเรียตามสายวิวัฒนาการ นอกจากนี้ยังทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียรวมและแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. ในทางเดินอาหารทั้ง 3 ส่วนด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ หลังจากนั้นจะทำการทดสอบยืนยันผลการศึกษาที่ได้จากบ่อดิน โดยการให้เชื้อไวรัสทอร่า, เชื้อแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* AAHRC 01 และเชื้อไวรัสทอร่าร่วมกับเชื้อ *V. harveyi* AAHRC 01 แก่กุ้งขาวที่มีสุขภาพปกติในห้องปฏิบัติการ เพื่อทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบเลือดและโครงสร้างประชากรแบคทีเรียในทางเดินอาหาร รวมถึงการศึกษาประสิทธิภาพและการคงอยู่ของเชื้อโปรไบโอติก *L. plant*arum TISTR 050 ต่อการควบคุมเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. ในทางเดินอาหารกุ้งขาวภายใต้สภาวะปกติและการติดเชื้อไวรัสทอร่า

ตรวจเอกสาร

1. กุ้งขาว (Pacific white shrimp)

กุ้งขาว (*Penaeus vannamei*) เป็นกุ้งสายพันธุ์หลักของทวีปอเมริกา ในธรรมชาติพบได้ตั้งแต่ชายฝั่งของประเทศเม็กซิโกจนถึงชายฝั่งของประเทศเปรู ซึ่งเป็นเขตที่มีอุณหภูมิของน้ำประมาณ 26-28^{O}C และมีความเค็มประมาณ 35 ppt.

ข้อมูลโดยทั่วไปและอนุกรมวิธานของกุ้งขาว (Holthuis, 1980)

Phylum Arthopoda

Class Crustacean

Order Decapoda

Family Penaeidae

Genus *Penaeus*

Subgenus *Litopenaeus*

Species *vannamei*

ภาพที่ 1 ลักษณะโดยทั่วไปของกุ้งขาวระยะวัยรุ่น (juvenile)

ชื่อและลักษณะโดยทั่วไป

Litopenaeus vannamei หรือชื่อสามัญ คือ กุ้งขาว (white shrimp) รายงานครั้งแรกโดย Boone ในปี ค.ศ. 1931 ซึ่งมีลักษณะภายนอกคล้ายกับกุ้งแชบ๊วยหรือกุ้งตะกาด ลำตัวมี 6 – 8 ปล้อง หน้าอกใหญ่ ส่วนหัวมี 1 ปล้อง มีกรียาวประมาณ 0.8 เท่าของความยาวเปลือกหัว กรีสูง ปลายแคบ มีลักษณะเป็นสามเหลี่ยมสีแดงอมน้ำตาล กรีด้านบนมี 8 หยัก ด้านล่างมี 1-2 หยัก ส่วนบนของกรีมองเห็นได้ชัด เปลือกส่วนข้างมีสีขาวอมชมพูแดง ขามีสีขาว หนวดสีแดง 2 คู่ สั้นและยาว ส่วนหางมี 1 ปล้อง ปลายหางมีสีแดง แพนหางมี 4 ใบ และ 1 กรีหาง ขนาดโตเต็มที่โดยวัดจากกรีที่หัวสุดถึงปลายกรีด้านหางยาวประมาณ 9 นิ้ว น้ำหนักประมาณ 120 กรัม และ thelycum เป็นแบบเปิด (Wyban and Sweeney, 1991) กุ้งขาวเป็นกุ้งที่มีความสามารถปรับตัวเข้ากับสิ่งแวดล้อมได้อย่างรวดเร็ว โดยสามารถอาศัยอยู่ในความเค็มตั้งแต่ 0–35 ppt. ซึ่งความเค็มที่เหมาะสมในการลี้ยง คือ 10-30 ppt. อุณหภูมิ 24-32^{O}C ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 28-30^{O}C มีการเจริญเติบโตดีลอกคราบบ่อย ต้องการแร่ธาตุสูง โดยเฉพาะแมกนีเซียม และแคลเซียม กุ้งขาวจะมีการเคลื่อนที่ตลอดเวลา รวดเร็ว มีนิสัยก้าวร้าว ทำร้ายกุ้งตัวอื่น กินอาหารได้หลายชนิด และกินในทุกระดับความลึก ไม่หมกตัวในดินเลน (Brock and Main, 1994)

สรีรวิทยาของระบบย่อยอาหารกุ้ง

กุ้งมีกลไกในการหาอาหารและรู้ตำแหน่งของอาหาร โดยการรับรู้ด้วยการสัมผัสทางเคมี (chemosensory) โดยมีจุดรับรู้ที่หนวดและบริเวณข้างลำตัว จากนั้นกุ้งจะจับอาหารโดยใช้ระยางค์ที่ช่วยจับอาหาร (chelate appendices) และส่งผ่านไปยังส่วนของปาก ซึ่งมีการคัดแยกอาหาร โดยอาหารที่มีขนาดใหญ่จะถูกบดด้วยขากรรไกร (mandibles) แล้วชิ้นส่วนอาหารจะถูกส่งไปยังทางเดินอาหารส่วนหน้า ซึ่งเริ่มสู่กระบวนการย่อยต่อไป โดยกุ้งในกลุ่ม Penaeid มีการย่อยที่รวดเร็วและใช้เวลาในการย่อยอาหารประมาณ 4 – 6 ชั่วโมง ทั้งนี้ระยะเวลาที่อาหารเดินทางและผ่านกระบวนการย่อยจนถ่ายออกเป็นมูลนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของอาหาร ปริมาณอาหารที่กินและขนาดของกุ้ง (Kurmaly *et al.*, 1996. อ้างโดย ชุติมา และคณะ, 2546)

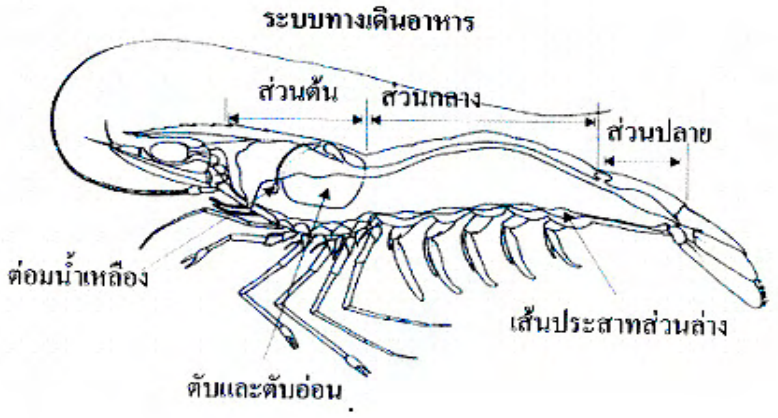
ทางเดินอาหารของกุ้ง

ทางเดินอาหารของครัสเตเซียรวมถึงกุ้งนั้น แบ่งออกเป็น 3 ส่วน ดังในภาพที่ 2ได้แก่

1. ทางเดินอาหารส่วนต้น (fore gut) ทำหน้าที่ในการบดและย่อยอาหาร ประกอบด้วยหลอดอาหารและกระเพาะอาหาร

2. ทางเดินอาหารส่วนกลาง (mid gut) ประกอบด้วยต่อมสร้างน้ำย่อย (hepatopancreas หรือ midgut gland) และลำไส้

3. ทางเดินอาหารส่วนหลัง (hind gut) เป็นท่อตรงโดยมีขนาดใหญ่ขึ้นบริเวณส่วนปลายท่อและเปิดที่ทวาร (anus)



ภาพที่ 2 ระบบทางเดินอาหารของกุ้งขาว

กลไกที่เกี่ยวข้องกับการย่อยอาหารของครัสเตเซียมีอยู่ 2 วิธีคือ การบีบตัวของลำไส้ (peristalsis) และการบดให้ละเอียด (triturition)

การบีบตัวของลำไส้เริ่มจากหลอดอาหาร (esophagus) ต่อไปที่ทางเดินอาหารส่วนกลาง (midgut) และทางเดินอาหารส่วนหลัง (hindgut) ตามลำดับ การบีบตัวของทางเดินอาหารเกิดขึ้น 3-5 ครั้งต่อนาที หรืออาจจะถูกกระตุ้นให้เกิดขึ้นได้ด้วยระบบประสาท บางครั้งมีการต่อต้านการบีบตัวของทางเดินอาหาร ซึ่งเกิดขึ้นในทางเดินอาหารส่วนกลาง เนื่องจากการดูดซึมสารอาหารจะเกิดขึ้นบริเวณทางเดินอาหารส่วนกลาง ภายหลังการย่อยแล้วการบีบตัวของลำไส้เพื่อไล่อาหารเกิดจากการหดตัวของกล้ามเนื้อตามยาวและไฟเบอร์ที่อยู่รอบๆ ลำไส้ต่อมาที่ช่องทวาร (anus) แรงกระตุ้นจะเกิดจากด้านหลังของประสาทซึ่งอยู่ด้านล่าง

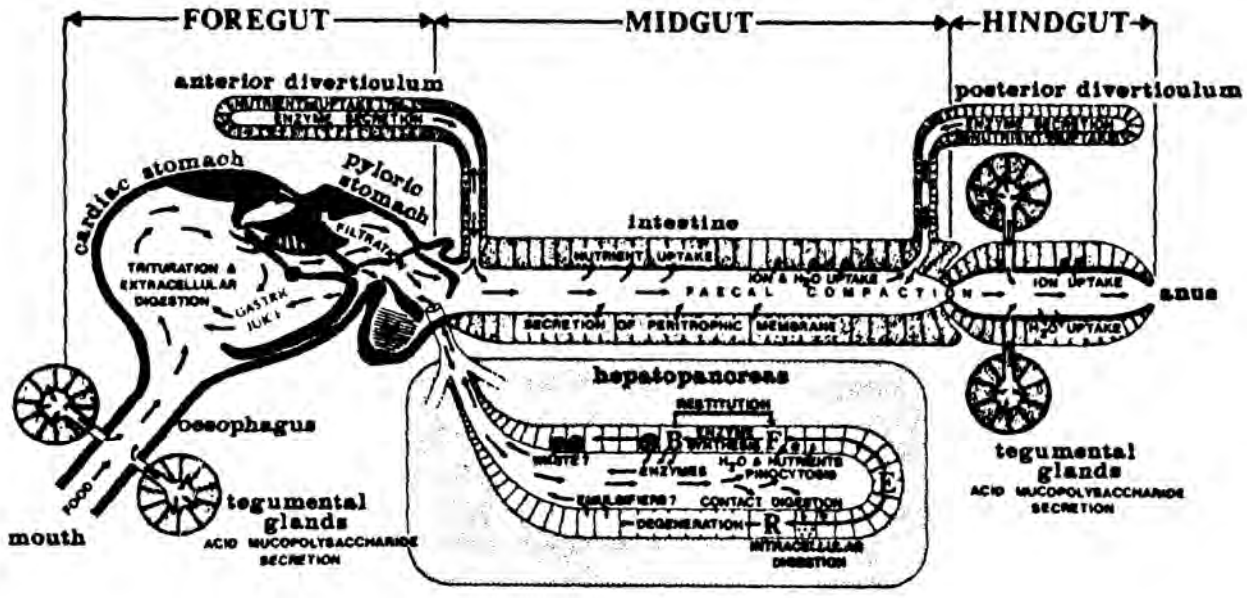
การบดอาหารให้ละเอียด (triturition) โดยแกสตริกมิล (gastric mill) ซึ่งมีลักษณะเป็นฟันที่โยกได้ 3 อันจนถึงแผ่นกระดูกชิ้นเล็ก ๆ)ossicle) โดยเฉพาะในส่วนของ cardiac stomach ซึ่งแกสตริกมิล ทำหน้าที่คล้าย ๆ ฟันบด อาหารที่ถูกบดจะผ่านเข้าไปที่อวัยวะสำหรับการกรอง การบดอาหารชิ้นใหญ่ ๆ จะเกิดที่กระเพาะอาหาร (stomach หรือ proventriculus) ส่วนอาหารที่บดเป็น

ชิ้นเล็ก ๆ แล้วจะถูกส่งเข้าไปในตับและตับอ่อน (hepatopancreas) ที่ปากท่อของตับและตับอ่อนจะมีตะแกรงไว้กรองอาหารที่มีขนาดเล็กเท่านั้นที่สามารถผ่านตะแกรงเข้าไปในท่อได้

การดูดซึมจะเกิดขึ้นภายในตับและตับอ่อนและในส่วนต้นของลำไส้ ซึ่งมีขนาดสั้น ๆ การดูดซึมจะเกิดขึ้นที่ต่อมสร้างน้ำย่อย และที่ส่วนต้นของลำไส้ซึ่งเป็นบริเวณที่มีไคติน ทำหน้าที่คล้ายเนื้อเยื่อแผ่นบางที่สารสามารถซึมผ่านได้บ้าง (semipermeable membrane) ตับและตับอ่อนจะทำหน้าที่ดูดซึมอย่างแท้จริงภายในเซลล์ที่มีไขมัน ตับและตับอ่อนมี iron lactate หรือ iron storage cell ทำหน้าที่ดูดซึมไขมันและสารอื่น ๆ (ประจวบ, 2537)

อวัยวะที่ช่วยในการย่อยอาหาร

องค์ประกอบของระบบย่อยอาหารของกุ้งกลุ่ม *Penaeus* แสดงในภาพที่ 3 โดยการย่อยและดูดซึมสารอาหารจะเกิดขึ้นในบริเวณทางเดินอาหารส่วนหน้าและส่วนกลางเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งโดยปกติทางเดินอาหารของครัสเตเชียจะเป็นท่อตรงทอดตามยาวของลำตัวจากปากซึ่งอยู่ด้านล่างของส่วนหัวยาวไปถึงทวารหนักที่บริเวณปล้องสุดท้ายของลำตัว ทางเดินอาหารส่วนหน้าและส่วนหลังเกิดจากชั้นของเอคโตเดิร์ม (ectoderm) และบุด้วยผิวด้านนอก (cuticles) ส่วนทางเดินอาหารส่วนกลาง เกิดจากชั้นของเอ็นโดเดิร์ม (endoderm)



ภาพที่ 3 อวัยวะที่ช่วยในการย่อยอาหาร

ที่มา : Gibson, 1982

ปาก (mouth)

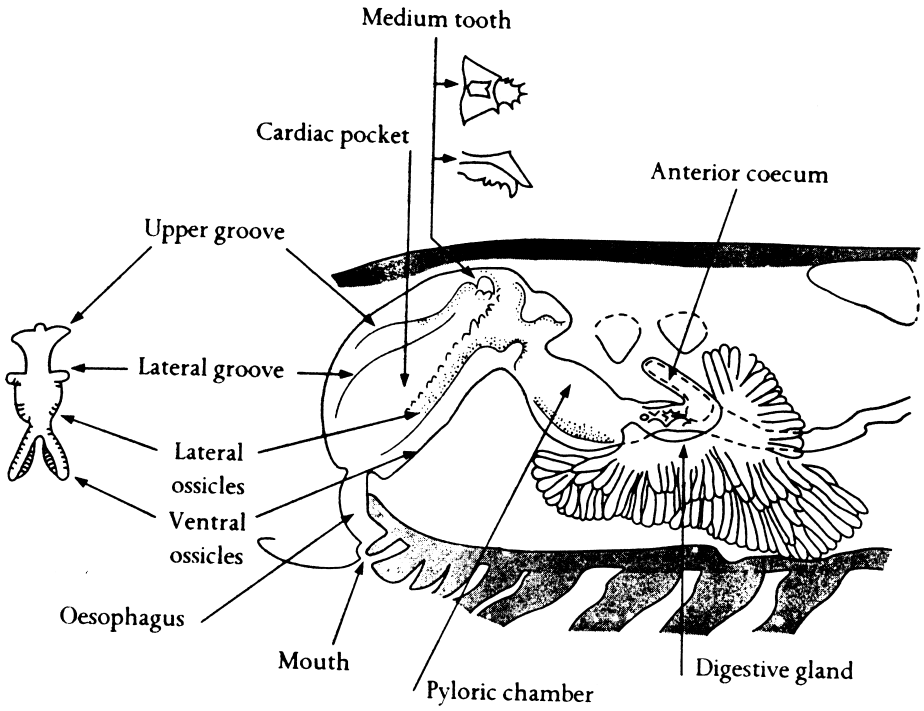
ครัสเตเซียส่วนมากมีลักษณะของปากที่คล้ายคลึงกันที่ดัดแปลงมาจากรยางค์ส่วนหัว ได้แก่ แมกซิลูลา (maxillula) แมกซิลา (maxilla) แมนดิเบิล (mandible) แมนดิลูลา (mandilula) และแมกซิลิเปด (maxilliped) เป็นส่วนสำคัญที่ใช้จับอาหาร ส่วน เลบรัม (labrum) และเลเบียม (labium) มีลักษณะเป็นแผ่นแข็ง ทำหน้าที่หลักในการกินอาหาร (ประจวบ, 2537)

หลอดอาหาร (esophagus)

หลอดอาหารมีลักษณะเป็นท่อตรงสั้น ๆ เชื่อมต่อระหว่างปากและกระเพาะอาหาร โดยผนังของหลอดอาหารประกอบด้วยเยื่อบุผนังเป็นเซลล์ผิวชนิดแท่ง (columnar epithelium) และมีชั้นของไคตินหนาอยู่ด้านบน ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่อยู่บริเวณรอบ ๆ หลอดอาหารมีต่อม tegumental gland เป็นจำนวนมากทำหน้าที่ในการสร้างสารช่วยในการหล่อลื่นชิ้นส่วนอาหารในทางเดินอาหาร (ประจวบ, 2537)

กระเพาะอาหาร (stomach หรือ proventriculus)

กระเพาะอาหารของกุ้งในกลุ่ม Penaeid มีน้ำหนักประมาณ 0.6% (w/w) ของน้ำหนักตัว (Chen, 1998) มีลักษณะยาวและแบ่งเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนหน้า (anterior-cardiac หรือ cardiac pocket) และส่วนหลัง (posterior pyloric หรือ pyloric chamber) โดยกระเพาะส่วนหน้ามีการพัฒนาที่ดี ซึ่งในตอนท้ายส่วนที่ต่อไปยังกระเพาะส่วนหลังมีแผ่นกระดูกที่มีลักษณะของแถวฟันเรียงอยู่ (ossicles) นอกจากนั้นยังมีกระดูกชิ้นเล็ก ๆ ที่เป็นโครงสร้างที่สำคัญของส่วนนี้ที่ทำหน้าที่คล้ายโรงโม่ (gastric mill) ในการบดอาหารให้ละเอียด (tritution) สำหรับในกระเพาะส่วนท้ายจะมีกระดูดชิ้นเล็ก ๆ อีก 1 ชุดที่มีขนาดเล็กกว่าและบางกว่า ทำหน้าที่กรองอาหารที่บดแล้วก่อนผ่านไปยังสำไส้ ดังนั้นกระเพาะอาหารจึงทำหน้าที่ 2 อย่าง คือ บดอาหารให้มีขนาดเล็กลงเพื่อเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวสำหรับการย่อยโดยน้ำย่อย และการกรองชิ้นส่วนอาหารเฉพาะขนาดเล็กที่สุด (เล็กกว่า 1 μM) ในลักษณะสารแขวนลอยเพื่อส่งต่อไปยังตับและตับอ่อน (hepatopancreas) ส่วนที่ย่อยไม่ได้จะถูกส่งต่อไปยังสำไส้เพื่อถ่ายออกที่ลำไส้ส่วนท้าย โดยมีลักษณะของปาก หลอดอาหาร กระเพาะอาหาร อวัยวะบดอาหาร (gastric mill) และต่อมสร้างน้ำย่อย (digestive gland หรือ hepatopancreas) ดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 ปาก หลอดอาหาร กระเพาะอาหาร อวัยวะบดอาหาร (gastric mill) และต่อมสร้างน้ำย่อย (digestive gland/hepatopancreas) ของกุ้งในกลุ่ม Penaeid
ที่มา : ชุติมา และคณะ, 2546

เฮพปาโตแพนเครียส (hepatopancreas) หรือ มิดกัท แกลนด์ (midgut gland) หรือตับและตับอ่อน

ตับและตับอ่อนเป็นอวัยวะช่วยย่อยอาหารที่สำคัญที่สุดในกุ้ง โดยมีน้ำหนักประมาณ 3.0 % (w/w) ของน้ำหนักตัว มีหน้าที่สำคัญ ได้แก่ การสร้างและหลั่งน้ำย่อย การดูดซึมสารอาหาร การสำรองแร่ธาตุและสารอาหาร กระบวนการเมแทบอลิซึมของไขมันและคาร์โบไฮเดรต และการส่งสารอาหารไปยังส่วนต่าง ๆ ของตัวกุ้งในช่วงเวลาที่มีการลอกคราบ โดยโครงสร้างของเซลล์ของตับและตับอ่อนมีความสัมพันธ์กับสภาวะโภชนาการของกุ้งทะเลและสามารถใช้เป็นดัชนีชี้วัดหรือประเมินคุณค่าทางอาหารของอาหารชนิดต่าง ๆ ได้ (ชุติมา และคณะ, 2546) ตับและตับอ่อนประกอบด้วย 2 ส่วน ในแต่ละส่วนประกอบด้วยพูของท่อตันเล็ก ๆ จำนวน 2 -3 พู ซึ่งกินพื้นที่ส่วนใหญ่ของหัว-อก (cephalothorax) โดยแต่ละพูมีทางเปิดที่บริเวณรอยต่อระหว่างกระเพาะส่วนหลังและสำไส้ หรืออาจจะเปิดสู่กระเพาะส่วนหลัง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของกุ้ง

ลำไส้ (intestine)

ลำไส้ ในสัตว์กลุ่ม *Penaeid* จะมีลักษณะเป็นท่อที่มีเนื้อเยื่อบุชั้นใน โดยจะลักษณะเป็นท่อตามยาวตลอดแนวลำตัว โดยส่วนต้นของลำไส้จะต่อกับช่องเปิดของตับและตับอ่อน และมี

หน้าที่ในการดูดซึมอาหาร ในส่วนปลายของลำไส้ (rectum) จะเป็นกล้ามเนื้อที่จะปั๊มน้ำเข้าไปในลำไส้เพื่อช่วยในการขับถ่ายของเสีย ลำไส้เป็นแหล่งที่อยู่สำคัญของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร ซึ่งจากรายงานของ Hart และคณะ (2002) แสดงให้เห็นว่า พบแบคทีเรียจำนวนมากและมีความหลากหลายสูงในบริเวณลำไส้ของทั้งมนุษย์และสัตว์

2. โรคติดเชื้อไวรัสที่สำคัญในกุ้งของประเทศไทย

ปัญหาโรคติดเชื้อไวรัสเป็นปัญหาที่สำคัญและก่อให้เกิดความเสียหายแก่อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งของประเทศไทยเป็นอย่างมาก ซึ่งเชื้อไวรัสที่สำคัญในประเทศไทยได้แก่ YHV, IHHNV, WSSV, และ TSV โดยโรคหัวเหลืองซึ่งเกิดจากเชื้อ YHV โดยส่วนมากจะพบในกุ้งกุลาดำเป็นหลัก โรคตัวพิการซึ่งเกิดจากเชื้อไวรัส IHHNV จะไม่ทำให้กุ้งตายแต่จะทำให้กุ้งพิการ เจริญเติบโตช้าและขายไม่ได้ราคา โรคตัวแดงดวงขาวซึ่งเกิดจาก WSSV จะทำให้กุ้งที่ติดเชื้อไวรัส 80–100 % ตายภายใน 3-5 วัน ในขณะที่ลักษณะการเกิดโรคโรคทอร่าที่พบในประเทศไทยจะเป็นลักษณะการติดเชื้อเรื้อรัง โดยจะพบการเกิดโรคในช่วง 20-40 วันแรกของการเลี้ยงซึ่งกุ้งจะมีอัตราการตายประมาณ 20-30% และใน 1 รอบการเลี้ยงอาจจะมีการตายได้มากกว่า 1 ครั้งซึ่งลักษณะการตายของกุ้งเช่นนี้สร้างผลกระทบต่อเกษตรกรเป็นอย่างมากเนื่องจากเกษตรกรส่วนใหญ่จะนิยมเลี้ยงกุ้งต่อไปถึงแม้ว่าจะพบการติดเชื้อไวรัสทอร่าแล้วก็ตาม ทำให้มีการเลี้ยงกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสทอร่ามีโอกาสล้มเหลวมากยิ่งขึ้นเมื่อเข้าสู่ระยะปลายของการเลี้ยง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วง 50-70 วันของการเลี้ยงเนื่องจากในช่วงดังกล่าวมีการลงทุนที่สูงแต่ขนาดของกุ้งยังไม่สามารถขายได้อย่างคุ้มทุน ทำให้เกษตรกรประสบปัญหาขาดทุนสูง ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับระดับความรุนแรงของโรคทอร่า ซึ่งการติดเชื้อฉวยโอกาก็เป็นปัจจัยที่สำคัญประการหนึ่งต่อระดับความรุนแรงของโรคทอร่า

โรคทอร่า (Taura Syndrome)

โรคทอร่าหรือโรคตัวแดงมีสาเหตุจากเชื้อไวรัสชนิด Taura Syndrome Virus (TSV) ซึ่งเป็นโรคที่พบได้ในกุ้งสกุล *Penaeus* หลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกุ้งขาว รายงานการพบครั้งแรกที่ประเทศเอกวาดอร์ในปี 1992 (Lightner *et al*., 1996) สำหรับในทวีปเอเชียพบการระบาดครั้งแรกในปี 1999 (Tu *et al*., 1999., Flegel, 2006) ไวรัสทอร่าเป็น RNAไวรัสสายเดี่ยว (ssRNA) ไม่มีผนังหุ้ม (non-enveloped) รูปร่างหลายเหลี่ยม (icosahedron) มีเส้นผ่าศูนย์กลางอนุภาคประมาณ 32 นาโนเมตร จัดอยู่ในกลุ่ม Pisconavirus (Brock *et al*., 1997) โรคทอร่าใน

กุ้งขาวสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ระยะ ได้แก่ ระยะเฉียบพลัน (acute) ระยะคาบเกี่ยว (transition) และระยะเรื้อรัง (chronic) ซึ่งจะมีเฉพาะระยะเฉียบพลันและระยะคาบเกี่ยวเท่านั้นที่จะมีการแสดงอาการของโรค (Lightner, 1996) อาการของกุ้งขาวที่เป็นโรคในระยะเฉียบพลันจะมีลักษณะลำตัวแพนหางและขาว่ายน้ำจะมีสีแดง กุ้งอาจจะเปลือกนิ่ม ไม่มีอาหารในลำไส้ และจะมีการตายสูงในระหว่างการลอกคราบ ในระยะคาบเกี่ยวของการเกิดโรคจะใช้เวลาประมาณ 2-3 วัน จะพบเมลานินที่มีรูปร่างไม่แน่นอนกระจายอยู่ใต้เปลือกกุ้ง (ภาพที่ 5) กุ้งอาจจะมีเปลือกนิ่มและตัวสีแดง การกินอาหารเป็นปกติ (Hasson *et al*., 1995; Lightner, 1996) โดยบริเวณที่พบเมลานินจะเป็นการรวมกลุ่มของเม็ดเลือดในบริเวณเนื้อเยื่อ cuticle epithelium หลังจากการลอกคราบกุ้งสามารถที่จะกำจัดเนื้อเยื่อที่มีการรวมกลุ่มของเมลานินได้ กุ้งที่สามารถฟื้นตัวจากระยะคาบเกี่ยวได้ก็จะเข้าสู่ระยะเรื้อรัง โดยจะไม่มีการแสดงอาการของโรค การกินอาหารปกติ และสามารถเลี้ยงต่อจนสิ้นสุดการเลี้ยงได้ แต่อย่างไรก็ตามยังสามารถตรวจพบเชื้อไวรัส TSV จาก lymphoid organ ได้

ภาพที่ 5 กุ้งที่ติดเชื้อไวรัสทอร่า

ที่มา : www.disease-watch.com ณ. วันที่ 20/8/06

เชื้อไวรัสทอร่าทำให้เกิดความเสียหายแก่อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งในหลายประเทศโดยเฉพาะอย่างยิ่งในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งขาว จากการติดตามการแพร่ระบาดของโรคทอร่าในประเทศไทยพบว่า มีรายงานการเกิดโรคชนิดนี้ครั้งแรกในฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวช่วงเดือนเมษายน ปี 2546 ในพื้นที่จังหวัดนครปฐม และฉะเชิงเทรา ทำความเสียหายให้แก่เกษตรเป็นอย่างมาก (ชะลอ และ พรเลิศ, 2547) ซึ่งลักษณะของโรคทอร่าในกุ้งขาวที่เลี้ยงในประเทศไทยพบว่ามีความรุนแรงต่างกัน ซึ่งสามารถจำแนกความรุนแรงได้เป็น 2 ลักษณะ คือ

1. ระดับความรุนแรงต่ำกว่าเฉียบพลัน (subacute) ซึ่งส่วนใหญ่พบในกุ้งขาวอายุระหว่าง 20-40 วัน โรคทอร่าลักษณะนี้จะมีความรุนแรงไม่มากนักแต่ก็สามารถทำให้กุ้งตายได้เรื่อย ๆ ประมาณ 20-30 % โดยกุ้งที่เป็นโรคจะพบว่ามีอาการล่องตามกระแสน้ำและตายประปรายตามขอบบ่อ นอกจากนี้ยังพบกุ้งที่สภาพอ่อนแอไม่มีแรงดีดตัวในยอและมีสีตัวเป็นสีชมพูอ่อน

2. ระดับความรุนแรงแบบเฉียบพลัน (acute) กุ้งที่ป่วยเป็นโรคทอร่าประเภทนี้มักพบในบ่อที่มีการเลี้ยงอย่างหนาแน่น อายุประมาณ 50-80 วัน กุ้งที่ป่วยจะมีอาการตัวสีชมพูหรือสีแดง ตับและตับอ่อนมีสีเหลืองมากกว่าปกติ เหงือกบวม ว่ายน้ำในลักษณะล่องตามกระแสน้ำ ในระยะแรกจะพบกุ้งตายตามพื้นบ่อ หลังจากนั้นประมาณ 2 วันกุ้งที่ตายจะลอยขึ้นมาเต็มบ่อ และกุ้งบางส่วนที่รอดชีวิตจะพบแผลเมลานินที่มีรูปร่างไม่แน่นอนกระจายอยู่ใต้เปลือกกุ้ง ซึ่งโรคทอร่าประเภทเฉียบพลันจะก่อให้เกิดความเสียหายสูง โดยมีอัตราการตาย 70-80 %

ในการตรวจสอบเบื้องต้นของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้พบว่า เมื่อกุ้งขาวติดเชื้อไวรัสทอร่าและแสดงอาการของโรค เช่น มีลักษณะตัวสีชมพูหรือสีแดง มีแผลเมลานินบริเวณเนื้อเยื่อใต้เปลือก มีอาการล่องตามกระแสน้ำ รวมถึงการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเซลล์บริเวณแพนหาง จะพบว่าปริมาณของเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* ในตับและตับอ่อนเพิ่มสูงขึ้นกว่ากุ้งปกติเสมอ จึงเป็นที่น่าสังเกตว่าการติดเชื้อไวรัสทอร่าในกุ้งขาวน่าจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชากรแบคทีเรียในตับและตับอ่อนของกุ้ง

3. แบคทีเรียประจำถิ่นและโปรไบโอติก

3.1 แบคทีเรียประจำถิ่น

แบคทีเรียประจำถิ่นในลำไส้ (normal flora) คือ แบคทีเรียที่สามารถอยู่อาศัยและคงปริมาณในลำไส้ได้ช่วงชีวิตใดช่วงชีวิตหนึ่งของสัตว์เจ้าบ้าน โดยปกติสังคมแบคทีเรียประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหารจะประกอบขึ้นด้วยกลุ่มของจุลินทรีย์หลายชนิดอยู่รวมกันซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้จะเข้ามามีบทบาทในการควบคุมสมดุลต่าง ๆ ภายในลำไส้ เช่น การควบคุมปริมาณเชื้อ ก่อโรค การสร้างวิตามินที่เป็นประโยชน์แก่สัตว์เจ้าบ้าน การสร้างน้ำย่อยและการย่อยสลายกากอาหาร เป็นต้น ในการเพาะเลี้ยงกุ้งนั้น แบคทีเรียประจำถิ่นมีความจำเป็นอย่างมากต่อความสำเร็จของการเพาะเลี้ยง เนื่องจากหากสามารถที่จะควบคุมสมดุลของโครงสร้างประชากรแบคทีเรียภายในลำไส้ให้เหมาะสม ก็จะส่งผลดีต่อการเจริญเติบโตและสุขภาพโดยรวมของกุ้ง แต่หากกุ้งมีสุขภาพอ่อนแอ มีการติดเชื้อหรือเกิดความเครียดก็จะมีผลต่อระบบโครงสร้างของประชากรแบคทีเรียในลำไส้ ซึ่ง

แบคทีเรียประจำถิ่นที่พบในลำไส้ของกุ้งจะประกอบด้วยแบคทีเรียหลายกลุ่ม เช่น *Bacillus* spp., *Vibrio* spp., *Aeromona*s spp., *Pseudomonas* spp., *Lactobacillus* spp., และ *Cytophaga* spp. เป็นต้น

จากการศึกษาแบคทีเรียในทางเดินอาหารของตัวอย่างกุ้งสีน้ำตาล (*P. aztecus*) ที่มีสุขภาพปกติ โดย Dempsey และ Kitting (1987) ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ และทำการจำแนกกลุ่มของแบคทีเรียที่พบด้วยการทดสอบทางชีวเคมี พบว่าบริเวณทางเดินอาหารจะพบแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* spp., *Chromobacterium* spp., *Pseudomonas* spp., *Alcaligenes* spp., *Photobacterium* spp., *Cytophaga* spp., และ *Flavobacterium* spp.

Dempsey และ Rosson (1989) ได้ทำการศึกษาชนิดและจำนวนแบคทีเรียที่แยกได้จากทางเดินอาหารของกุ้งสีน้ำตาลโดยนับจำนวนแบคทีเรียรวมได้ $7.5x10^6$-$2.6x10^7$ CFU/g และสามารถจำแนกออกเป็น 5 กลุ่มใหญ่ ๆ ด้วยการทดสอบทางชีวเคมี ได้แก่ *Vibrio* spp., *Alcaligenes* spp., *Aeromonas* spp., *Chromobacterium* spp., และ *Pseudomonas* spp.

Yuthachai และคณะ (1990) ได้ทำการตรวจนับแบคทีเรียทั้งหมดที่แยกได้จากทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำพบว่ามีแบคทีเรียจำนวน $7.5x10^6$-$1.3x10^7$ CFU/g และสามารถแยกแบคทีเรียออกได้เป็น 9 สกุลใหญ่ด้วยการทดสอบทางชีวเคมี ได้แก่ *Aeromonas*, *Arizona*, *Enterobater*, *Klebsiella*, *Plesiomonas*, *Pseudomons*, *Serratia*, *Vibrio,* และ *Yersinia*

Oxley และคณะ (2002) ได้ทำการศึกษาแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารของกุ้งแชบ๊วย (*P. merguiensis*) ที่เลี้ยงในบ่อดินและจากธรรมชาติพบว่าไม่มีความแตกต่างขององค์ประกอบของโครงสร้างประชากรแบคทีเรียและพบเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่อยู่ในสกุล *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Photobacterium*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas,* และ*Vibrio* นอกจากนี้ยังพบว่ากลุ่ม *Vibrio* spp. เป็นแบคทีเรียกลุ่มหลักในระบบทางเดินอาหารของกุ้งแช่บ๊วย

3.2 โปรไบโอติก

โปรไบโอติก (Probiotic) มีรากศัพท์มาจากภาษากรีก หมายถึง “เพื่อชีวิต: For life” โปรไบโอติก เป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก เช่น แบคทีเรีย ยีสต์ ที่มีส่วนช่วยเสริมสร้างความแข็งแรงให้แก่เจ้าบ้านโดยการสร้างสารที่มีประโยชน์ เช่น เอนไซม์ วิตามิน รวมถึงการป้องกันการเพิ่มจำนวนของเชื้อก่อโรค ซึ่งในปัจจุบันมีนักวิทยาศาสตร์หลายท่านได้ให้ความหมายของโปรไบโอติกไว้ เช่น

Moriarty (1999) ให้ความหมายของโปรไบโอติกไว้ว่า “โปรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์มีชีวิตชนิดเดียวหรือหลายชนิดที่ส่งผลให้มนุษย์หรือสัตว์ได้ประโยชน์จากการเพิ่ม พื้นที่และปริมาณของโปรไบโอติกรวมถึงจุลินทรีย์เฉพาะถิ่นที่มีประโยชน์ชนิดอื่น ๆ ”

Fuller (1997) ให้ความหมายของโปรไบโอติกไว้ว่า “โปรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์มีชีวิตที่กินเข้าไปแล้วก่อประโยชน์แก่เจ้าบ้านโดยการเพิ่มความสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้

ซึ่งจะเห็นได้ว่าความหมายของโปรไบโอติกจะครอบคลุมถึงจุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่เข้าสู่ร่างกายของเจ้าบ้านแล้วทำให้เจ้าบ้านได้รับประโยชน์จากการควบคุมสมดุลของจุลินทรีย์ ต่าง ๆ ในสำไส้ ซึ่งส่งผลต่อสุขภาพที่ดีของเจ้าบ้านเป็นสำคัญ

มนุษย์มีการใช้โปรไบโอติกมานานหลายพันปี ซึ่งจะเห็นได้จากผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นจากภูมิปัญญาของคนจากทั่วทุกมุมโลก เช่น นมเปรี้ยว กิมจิ และของหมักดองต่าง ๆ เป็นต้น และในปัจจุบัน โปรไบโอติกได้เข้ามามีบทบาทอย่างมากต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ทั้งในแง่ของการกระตุ้นการเจริญเติบโต และการป้องกันโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับการป้องกันโรคที่เกิดจากแบคทีเรีย (Matteuzzi *et al*., 2004) เนื่องจากการประกาศห้ามใช้ยาปฏิชีวนะและประสิทธิภาพของโปรไบโอติกในการควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรค ซึ่ง FAO ได้ประกาศสนับสนุนการวิจัยพัฒนาและการส่งเสริมให้ใช้โปรไบโอติกกับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (FAO, 2002) เนื่องจากการใช้โปรไบโอติกจะไม่ก่อให้เกิดปัญหาสารตกค้างทั้งในสัตว์น้ำที่ใช้เป็นอาหารและในธรรมชาติ ซึ่งแบคทีเรียที่มีรายงานว่ามีศักยภาพเป็นโปรไบโอติกแสดงในตารางที่ 1

บทบาทสำคัญของโปรไบโอติกในร่างกายของเจ้าบ้าน

1) เพิ่มจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์และลดจุลินทรีย์ก่อโรค

2) กระตุ้นภูมิคุ้มกันของเจ้าบ้าน

3) สร้างเอนไซม์ สารอาหาร วิตามินที่ร่างกายของเจ้าบ้านสร้างไม่ได้ เช่น เอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดส , วิตามิน B_{12} เป็นต้น

4) สร้างสารปฏิชีวนะหรือเอนไซม์ในการป้องกันและควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรค

5) ลดพื้นที่การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรคในทางเดินอาหาร

6) สร้างสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของเจ้าบ้าน

การทำงานของโปรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

1) ส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำให้ดีขึ้น

2) ป้องกันและยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรค

3) ส่งเสริมการเจริญเติบโตและเพิ่มผลผลิตของสัตว์น้ำ

4) เพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายสารอินทรีย์ในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำ

5) ส่งเสริมการเจริญเติบโตของสาหร่ายที่มีประโยชน์ในบ่อเลี้ยง เช่น สาหร่ายสีน้ำตาล โดยการควบคุมความเป็นกรด-ด่าง, ปริมาณสารอาหาร รวมถึงแก๊สพิษในบ่อเลี้ยง

ตารางที่ 1 จุลินทรีย์ที่นำมาใช้เป็นโปรไบโอติกในมนุษย์และสัตว์

Microorganism	Species
Bacteria	
***Bacillus* spp.**	*B. coagulan, B. subtilis, B. licheniformis, B. toyoi, B. stearothermophilus*
***Bacteroides* spp.**	*B. amylophilus, B. capillosus, B. ruminocola, B. suis*
***Bifidobacterium* spp.**	*B. thermophilum, B. adolescentis, B. animalis, B. bifidum, B. infantis, B. longum*
***Lactobacillus* spp.**	*L. acidophilus, L. bifidus, L. brevis, L. bulgaricus, L. casei, L. rerterii, L. ellobiosus, L. coliniodes, L. curvatus, L. delbruekii, L. fermentum, L. lactis, L. plantarum, L. luminis, L. vitulinus*
***Leuconostoc* spp.**	*L. dextranicum, L. lactis, L. mesenteriodes*
***Pediococcus* spp.**	*P. acidophilus, P. halophilus, P. pentosaecus, P. cerevisiae, P. acidolacticii*
***Propionibacterium* spp.**	*P. freudenreichii, P. shermanii*
***Streptococcus* spp.**	*S. cremoris, S. diacetylactis, S. faecium, S. intermedius, S. thermophilus*
***Clostridium* spp.**	*C. butyricum*
***Enterococcus* spp.**	*Enterococcus* sp.
Yeast	
***Saccharomyces* spp.**	*S. cerevisiae*
***Candida* spp.**	*C. pentoiepessi (Torulopsis bovina)*
Fungi	
***Aspergillus* spp.**	*A. oryzae, A. niger*

ที่มา : ดัดแปลงจาก Holzapfel and Sehillinger, (2002); Fuller and Gibson, (1998)

6) เพิ่มปริมาณอาหารมีชีวิต เช่น แพลงก์ตอนสัตว์ ในบ่อเลี้ยง
7) ช่วยปรับสภาพและพื้นฟูสภาพแวดล้อมในบ่อเลี้ยงให้เหมาะสม
8) ลดปริมาณการเกิดก๊าซพิษในบ่อเลี้ยง เช่น แอมโมเนีย ไฮโดรเจนซัลไฟด์

ความต้องการโปรไบโอติกในสัตว์

ในสภาวะปกติซึ่งสภาวะแวดล้อมในการดำรงชีวิตไม่มีการเปลี่ยนแปลงมากนัก คนหรือสัตว์ก็จะไม่จำเป็นต้องเสริมโปรไบโอติกให้แก่ร่างกาย แต่ในสภาวะปัจจุบันการเพาะเลี้ยงสัตว์เชิงธุรกิจ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวในระบบพัฒนา (Intensive system) และพัฒนายิ่งยวด (Super intensive system) จะทำการเลี้ยงในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เป็นธรรมชาติ จึงจำเป็นต้องมีการดูแลสุขภาพของสัตว์อย่างระมัดระวัง ซึ่งมีข้อจำกัดมากมายเกี่ยวกับการบริโภคหรือการกินอาหารที่ไม่เป็นไปตามธรรมชาติ และมีโอกาสที่จะได้รับยาปฏิชีวนะจากการปนเปื้อนในอาหาร นอกจากนี้ความเครียดก็มีผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างชุมชนจุลินทรีย์ภายในลำไส้ทั้งสิ้น ดังนั้นการใช้โปรไบโอติกจึงมีจุดมุ่งหมายเพื่อให้มีการเสริมสร้างหรือซ่อมแซมฟื้นฟูส่วนที่บกพร่องต่าง ๆ เหล่านี้ให้กลับคืนสู่สภาพปกติและปกป้องควบคุมจุลินทรีย์อื่นๆ ที่ก่อโรคไม่ให้เพิ่มจำนวนหรือส่งผลกระทบต่อสัตว์เจ้าบ้าน

การใช้โปรไบโอติกมีจุดประสงค์ที่แตกต่างกับการใช้ยาปฏิชีวนะคือ การใช้โปรไบโอติกจะใช้เพื่อควบคุมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ก่อโรคไม่ให้มีปริมาณมากเกินไปอันก่อให้เกิดโทษต่อสัตว์เจ้าบ้าน รวมถึงการใช้เพื่อเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ เพื่อให้สัตว์เจ้าบ้านมีความต้านทานโรคเพิ่มขึ้น และใช้เป็น Growth promoter ได้ในวัยอ่อนทั้งในคนและสัตว์ ในด้านการเกษตรกรรม โปรไบโอติกได้รับการยกเว้นจากการระบุให้เป็นยารักษาโรค แต่สามารถใช้ในลักษณะการป้องกันและกระตุ้นให้สัตว์เจ้าบ้านมีความต้านทานโรคสูงขึ้น ในด้านความปลอดภัยของการใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกได้รับการยอมรับว่าไม่มีผลเสียทั้งทางตรงและทางอ้อมต่อสัตว์เจ้าบ้านและสิ่งแวดล้อม แต่ในปัจจุบันยังไม่สามารถยืนยันผลหรืออาการต่าง ๆ ทางคลินิกที่ชัดเจนต่อการออกฤทธิ์ของโปรไบโอติกว่ามีความสัมพันธ์กับขนาดและปริมาณการบริโภคหรือไม่ รวมถึงการรอดชีวิตและการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์เจ้าบ้าน

สำหรับการใช้ยาปฏิชีวนะในการควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรค ยาปฏิชีวนะสามารถที่จะทำลายแบคทีเรียก่อโรคได้โดยตรงรวมถึงสามารถเข้าถึงบริเวณที่มีการติดเชื้อได้อย่างรวดเร็ว โดยใช้สารปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์ได้จำเพาะซึ่งมีกลไกการออกฤทธิ์แน่นอนและชัดเจน แต่อย่างไรก็ตามการใช้ยาปฏิชีวนะก็มีผลต่อเชื้อจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในสภาวะแวดล้อมโดยมีผลทำให้ความไว

(sensitivity) ของเชื้อโรคต่อยาปฏิชีวนะมีการเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งอาจทำให้เชื้อบางชนิดไวต่อยาเพิ่มขึ้นหรือบางชนิดต้านทานยาได้สูงขึ้นและต้องเพิ่มปริมาณยาในการใช้รักษาเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ในด้านความปลอดภัยของผู้บริโภคการได้รับยาปฏิชีวนะอาจจะก่อให้เกิดอาการแพ้ได้ และยังพบว่ายาปฏิชีวนะยังมีความเป็นพิษต่อตับ ไต ระบบทางเดินอาหารและยังเป็นการรักษาที่ปลายเหตุ (ดัดแปลงจาก Fuller, 1989, 1992, 1997)

การประยุกต์ใช้โปรไบโอติกกับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

ในปัจจุบันได้มีงานวิจัยมากมายที่ทำการศึกษาถึงการใช้จุลินทรีย์ที่มีศักยภาพเป็นโปรไบโอติกในการเสริมอาหารหรือป้องกันแบคทีเรียก่อโรคทั้งในมนุษย์และสัตว์ ซึ่งในตารางที่ 1 ได้แสดงตัวอย่างแบคทีเรียที่มีรายงานการใช้เป็นโปรไบโอติกอย่างกว้างขวาง ซึ่งรวมถึงอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำก็ได้มีการส่งเสริมการใช้โปรไบโอติกในการควบคุมคุณภาพน้ำและแบคทีเรียก่อโรค ซึ่งการลดการใช้ยาปฏิชีวนะแล้วหันมาใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกเป็นการช่วยรักษาสภาพสิ่งแวดล้อมในบ่อเพาะเลี้ยง รวมถึงเป็นวิธีการป้องกันโรคสัตว์น้ำที่เกิดจากแบคทีเรีย โดยไม่ก่อให้เกิดผลกระทบต่อผู้บริโภค ซึ่งตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้โปรไบโอติกกับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ มีตัวอย่างดังต่อไปนี้

- Gullian และคณะ (2004) ได้ทำการแยกเชื้อจากตับอ่อนของกุ้งขาว (*Penaeus vannamai*) จนได้เชื้อหลายชนิดที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก เช่น *Vibrio* P62 , *Vibrio* P63 และ *Bacillus* P64 นอกจากนี้ *Bacillus* P64 ยังแสดงถึงการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว

- Chythanya และ Karunasager (2002) พบว่า แบคทีเรีย *Pseudomonas* I-2 สามารถยับยั้งโรคในกุ้งกุลาดำที่เกิดจากเชื้อ *Vibrio* spp. โดยทดสอบกับเชื้อ *V. harveyi, V. fluvialis, V. damsela, V. parahaemolyticus,* และ *V. vulnificus* โดยการสร้างสารประกอบโมเลกุลต่ำและยังไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของลูกกุ้งกุลาดำ (PL-18)

- Rengpipat และคณะ (1998) ได้ทำการแยกเชื้อจากบ่อเลี้ยงจนได้เชื้อ *Bacillus* S11 และใช้ในลักษณะต่าง ๆ กัน คือ เซลล์สด เซลล์สดในน้ำเกลือ และเซลล์แห้ง (lyophilized cell) ผสมอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำ โดยกุ้งกุลาดำที่กินอาหารผสมโปรไบโอติกมีอัตราการรอด 100% เมื่อได้รับการเหนี่ยวนำโรคด้วย *V. harveyi* ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีอัตราการรอดเพียง 26% และพบการเพิ่มขึ้นของระดับภูมิคุ้มกัน (phagocytic index) ของกุ้งกุลาดำเมื่อได้รับเชื้อโปรไบโอติก

4. เชื้อ *Lactobacillus plantarum*

Lactobacillus จัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียแลกติก (Lactic acid bacteria) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase) ไม่สร้างสปอร์ ไม่ต้องการอากาศในการเจริญ (Axelsson, 1993) มีความสามารถในการสร้างกรดจากน้ำตาลแบ่งเป็นชนิดที่สร้างกรดแลคติกอย่างเดียว หรือกรดแลกติกกับกรดอะซิติก กรดฟอร์มิก และเอธิลแอลกอฮอล์ (วิลาวัณย์, 2536) กลุ่มแบคทีเรียแลกติกแบ่งเป็น 2 พวก ได้แก่

1. โฮโมเฟอร์เมนเททีฟ (homofermentative) หมายถึง พวกที่หมักน้ำตาลกลูโคสแล้วให้กรดแลกติก ประมาณร้อยละ 90 ไม่ต้องการไทอะมีน (thiamine) ในการเจริญ ผลิตเอนไซม์อัลโดเลส (aldolase) และเอนไซม์เฮกโซสไอโซเมอเลส (haxose isomerase) แต่ไม่ผลิตเอนไซม์ฟอสโฟคีโตเลส (phosphoketolase) และใช้ Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) pathway ทำให้ได้กรดแลกติก 2 โมเลกุลต่อกลูโคส 1 โมเลกุล ได้แก่ *L. acidilactica* , *L. casei*, *L. plantarum*, *Pediococus cerevisiae* และ *Streptococcus lactis* เป็นต้น (Axelsson, 1993)

2. เฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ (heterofermentative) คือ พวกที่หมักน้ำตาลกลูโคสแล้วให้กรดอะซิติก เอธานอลและคาร์บอนไดออกไซด์ ใช้ไทอะมีนในการเจริญ สร้างเอนไซม์ ฟอสโฟคีโตเลส แต่ไม่สร้างเอนไซม์อัลโดเลส และเอนไซม์เฮกโซสไอโซเมอเรส และใช้ hexose monophosphate หรือ pentose phosphate pathway ได้แก่ *Leuconostoc mesenteroides*, *L. brevis* และ *L. fermentum* เป็นต้น (Axelsson, 1993)

แบคทีเรียกลุ่มแลกติกพบทั่วไปในลำไส้และกระเพาะของสัตว์ต่าง ๆ รวมถึงในผลิตภัณฑ์นมและผลิตภัณฑ์อาหารทะเล และพืชผิวน้ำบางชนิด โดยทั่วไปจะใช้ในการถนอมอาหาร เนย โยเกิร์ต (Lin *et al*., 1989) ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้มีการแยกแบคทีเรียแลกติกมาใช้ในการกำจัดโรค โดย Gildberg และคณะ (1997) ได้ศึกษาการรอดชีวิตและการเจริญของลูกปลาคอดที่จับได้จากมหาสมุทรแอตแลนติก โดยให้เชื้อแลกติกผสมกับอาหาร มีการชั่งน้ำหนัก และตรวจดูจำนวนเชื้อ *V. anguillarum* ซึ่งเป็นสาเหตุที่เกิดโรคและการตายของลูกปลาคอด พบว่า 12 วันหลังการให้อาหารในลูกปลาจะมีจำนวนเชื้อ *V. anguillarum* ลดลง อัตราการตายของลูกปลาคอดลดลงจาก 10% เป็น 2.5% และหลังจาก 16 วัน อัตราการตายของลูกปลาคอดจะคงที่ ในด้านการเจริญพบว่าลูกปลาคอดที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก *C. divergens* จะมีอัตราการเจริญเพิ่มจาก 2.35% เป็น 2.68% เมื่อเทียบกับลูกปลาที่ได้รับอาหารปกติ

Garcia-de-la-Banda และคณะ (1992) ได้ศึกษาอัตราการรอดตายของลูกปลาเทอร์บอท (*Scophthalmus maximus*)โดยการเติมแบคทีเรียแลคติก *Streptococcus lactis* และ

L. bulgaricus ในการเลี้ยงอาร์ทีเมียเพื่อเป็นอาหารของลูกปลาเทอร์บอท โดยพบว่าสามารถเพิ่มอัตราการรอดตายของปลาเทอร์บอท 66 % ซึ่งเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เติมแบคทีเรียแลคติกมีอัตราการรอดตายเพียง 34 % ซึ่งคล้ายคลึงกับ Gatesoupe (1994) ได้ปรับปรุงอัตราการรอดตายของลูกปลาเทอร์บอท โดยการเติมแบคทีเรียแลคติก ลงใน โรติเฟอร์ เพื่อเป็นอาหารของลูกปลาเทอร์บอท โดยพบว่าสามารถลดอัตราการตายเมื่อนำไปทดสอบการต้านทานเชื้อก่อโรค *Vibrio* sp. ในปลา เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

5. เชื้อ *Vibrio harveyi*

แบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* เป็นสาเหตุให้เกิดการตายของกุ้งในระดับตั้งแต่ค่อนข้างมากจนถึงระดับตาย 100% โดยเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่แยกได้มาจากกุ้งที่เป็นโรคมักจะพบเชื้อ *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. splendidus*, *V. vulnificus*, *V. damsela* และ *V. harveyi* (Lavilla-Pitego *et al*., 1990) อาการโดยทั่วไปของลูกกุ้งที่ติดเชื้อกลุ่ม *Vibrio* sp. จะเกิดการตายของเนื้อเยื่อบริเวณท่อตับ ต่อจากนั้นจะเกิด แกรนูลโลมาตัส (granulomatous) ล้อมรอบบริเวณท่อตับที่ถูกเชื้อโรคเข้าทำลาย อาการที่พบจากการติดเชื้อที่ตับอ่อน คือ บริเวณท่อตับจะพบเชื้อแบคทีเรียอยู่ในกรณีที่การติดเชื้อไม่รุนแรงจะพบเชื้อในปริมาณไม่มากนักและเกิดหนองขึ้นในบริเวณที่มีการตายของเซลล์ในท่อตับและพบการแทรกตัวของเม็ดเลือดที่บริเวณเนื้อเยื่อระหว่างท่อตับ ส่วนในกรณีที่ติดเชื้อรุนแรงจะพบว่ามีแบคทีเรีย *Vibrio* sp. จำนวนมากเข้าบุกรุกทำลายที่บริเวณ tubular lumen ซึ่งมีผลทำให้เกิด hepatopancreatic tubular necrosis ที่บริเวณ basal lamina ของท่อตับที่ถูกเชื้อโรคเข้าทำลายในท่อตับที่มีการติดเชื้อมาก ๆ จะมีการโอบล้อมโดยเม็ดเลือดรอบ ๆ basal lamina ภายในเนื้อเยื่อบริเวณที่มีการติดเชื้อจะแสดงอาการบวมน้ำ แอ่งเลือดมีขนาดใหญ่ เกิดการรวมตัวกันของ eosinophilic granular และ amorphous matter มีการแทรกซึมของเม็ดเลือดทั้งชนิดเซมิแกรนูลาร์เซลล์ (semigranular cell) และ แกรนูลาร์เซลล์ (granular cell) แต่โดยส่วนใหญ่จะเป็นเซมิแกรนูลาร์เซลล์ ที่มีบทบาทในการกำจัดเชื้อโรคที่บุกรุกเข้ามาโดยจะเกิดเป็น granulomatous lesion (Jiravanichpasisal *et al*., 1994)

แบคทีเรีย *V. harveyi* เป็นหนึ่งในหลาย ๆ สปีชีส์ของ *Vibrio* ที่ก่อให้เกิดการตายอย่างมากในกุ้ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระยะลูกกุ้งที่อยู่ในโรงเพาะฟัก ดารุณี และคณะ (2530) ศึกษาถึงสาเหตุการตายของลูกกุ้งแชบ๊วยในโรงเพาะฟัก พบว่าการตายของลูกกุ้งมักจะเกิดขึ้นทุกครั้งเมื่อสังเกตเห็นการเรืองแสงช่วงกลางคืนในน้ำทะเลและอยู่ตามซากลูกกุ้งและลูกกุ้งที่มีชีวิต (Karunasagar *et al*., 1994) หลังจากแยกเชื้อจากลูกกุ้งที่ตายพบว่ามีสาเหตุมาจากเชื้อ *V. harveyi*

มณเฑียร และคณะ (2533) พบว่าอาการที่เกิดจากการติดเชื้อ *V. harveyi* คือ ในระยะแรก ๆ ลูกกุ้งจะมีการเคลื่อนไหวช้าลง ลำตัวสีขาวขุ่น (Chen *et al*., 1992) และ Karunasagar และคณะ (1994) นำลูกกุ้งที่มีอาการใกล้ตายมาตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่ามีแบคทีเรียจำนวนมากอยู่ในแอ่งเลือดของลูกกุ้ง จากการศึกษาของ Lavilla-Pitogo และคณะ (1990) พบว่ามีเชื้อ *V. harveyi* อยู่ในแอ่งเลือดประมาณ 8.6×10^4 CFU ml^{-1} และพบเชื้อชนิดนี้อยู่กันอย่างหนาแน่นที่บริเวณทางเดินอาหาร ในลูกกุ้งที่มีอาการติดเชื้อมาก ๆ ลูกกุ้งจะเริ่มหยุดว่ายน้ำเพราะไม่มีแรงในการบีบตัวที่บริเวณ pre-anal ของทางเดินอาหารและจากการตรวจสอบลักษณะของลูกกุ้งที่ติดเชื้อ *V. harveyi* โดยใช้ scanning electron micrograph จะพบเชื้อชนิดนี้อยู่รวมตัวกันที่บริเวณปากและอวัยวะที่ช่วยในการกินและถ้าในกรณีที่มีการติดเชื้อรุนแรง เชื้อแบคทีเรียจะติดแน่นมีลักษณะเป็นแผ่นและเพิ่มจำนวนมากขึ้น ถึงแม้ว่าจะพบแบคทีเรียที่บริเวณภายนอกลำตัวของลูกกุ้งแต่ไม่พบลักษณะที่แสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้เจาะเข้าภายในบริเวณเปลือกเพื่อทำลายเนื้อเยื่อภายใน และจากการตัดตามขวางของบริเวณทางเดินอาหาร พบว่ามีเชื้อชนิดนี้อยู่ในบริเวณที่มีอนุภาคของอาหารอยู่ เมื่อตัดเนื้อเยื่อบริเวณเหงือกเพื่อนำมาตรวจสอบ พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียจำนวนมากเช่นกัน จึงคาดว่าการติดเชื้อ *V. harveyi* อาจจะสามารถผ่านทางเหงือกได้ ส่วนการศึกษาทางด้านพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกุ้งที่ติดเชื้อ *V. harveyi* โดย Jiravanichpasisal และคณะ (1994) พบว่าเชื้อแบคทีเรียจะเข้าทำลายในทุกส่วนของตัวกุ้งทั้งเนื้อเยื่อชั้นนอก เนื้อเยื่อชั้นกลาง และเนื้อเยื่อชั้นใน โดยสร้างเอนไซม์เข้าทำลายเนื้อเยื่อ ซึ่งเอนไซม์ที่สำคัญ ได้แก่ Zinc metalloprotease (Teo *et al*., 2003) , Haemolysin (Zhang *et al*., 2001) และ Serine- protease (Lee *et al*., 1999)

5. การจัดจำแนกแบคทีเรีย (Bacterial classification)

การจัดจำแนกแบคทีเรียได้มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องมามากกว่า 100 ปี บรรทัดฐานสำคัญที่ใช้ในการการจัดจำแนกแบคทีเรีย คือ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology ซึ่งเริ่มตีพิมพ์ครั้งแรกในปี 1923 โดย Professor David Bergey และผู้ร่วมจัดทำอีก 4 คน โดยเนื้อหาของ Bergey's manual ฉบับเริ่มต้นและฉบับที่ได้รับการปรับปรุงต่อมารวม 9 ฉบับ (Prescott *et al*., 2005) จะกล่าวถึงการจัดจำแนกแบคทีเรียโดยอาศัยลักษณะพื้นฐานของแบคทีเรีย เช่น ลักษณะทางสัณฐาน (morphology) โครงสร้าง (structure) สรีรวิทยา (physiology) และคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อจุลินทรีย์ (Prescott *et al*., 2005) โดยมีลักษณะการติดสีของเยื่อหุ้มเซลล์เป็นเกณฑ์เริ่มต้นในการแบ่งกลุ่มของแบคทีเรีย แต่ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาการวิธีการจัดจำแนกแบคทีเรียโดยอาศัยข้อมูลทางพันธุกรรมมาช่วยในการจัดกลุ่มแบคทีเรียและลดระดับความสำคัญ

ของการจำแนกแบคทีเรียจากความแตกต่างภายนอก (Phenotype) โดย The Second Edition of Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2000) ได้นำเอาข้อมูลทาง rRNA, DNA และโปรตีน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง 16S rRNA มาเป็นข้อมูลสำคัญในการจัดจำแนกแบคทีเรีย (Prescott *et al*., 2005) ซึ่งสามารถจำแนกแบคทีเรียออกได้เป็น 2 กลุ่ม (Domain) คือ *Archaea* และ*Eubacteria* โดยกลุ่ม *Eubacteria* ประกอบด้วย 22 ไฟลัม (Phylum) (ภาพที่ 6) ซึ่งแบคทีเรียตัวอย่างในไฟลัมสำคัญแสดงในภาพที่ 7

ไฟลัม *Proteobacteria* เป็นไฟลัมที่มีสมาชิกมากที่สุดซึ่งประกอบไปด้วยแบคทีเรียกว่า 1,300 ชนิดใน 400 สกุล (genera) ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 5 คลาส (class) ได้แก่ α-Proteobacteria, β-Proteobacteria, γ-Proteobacteria, δ-Proteobacteria และ ε-Proteobacteria ในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำโดยเฉพาะอย่างยิ่งการเพาะเลี้ยงกุ้ง γ-Proteobacteria เป็นกลุ่มที่มีความสำคัญมากกลุ่มหนึ่ง เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้มีศักยภาพในการก่อโรคในกุ้ง โดยเฉพาะแบคทีเรียในจีนัส *Vibrio* spp. โดยโรคสำคัญที่พบในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งที่เกิดจากเชื้อในกลุ่ม *Vibrio* spp. ได้แก่ โรคเรืองแสงซึ่งเกิดจากเชื้อ *Vibrio harveyi*, นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อในกลุ่ม *Vibrio* spp. อีกหลายชนิดที่สามารถก่อโรคในกุ้งได้ เช่น *V. paraheamolyticus*, *V. anguillarum* และ *V. damsela* เป็นต้น ในปัจจุบัน The Second Edition of Bergey's Manual of Systematic Bacteriology ได้ออกตีพิมพ์เพียง 2 volume จากทั้งหมด 5 volume โดยในปัจจุบันยังไม่มีข้อมูลรายละเอียดในส่วนของไฟลัม *Femicutes* ซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่ม *Low G+C Gram Positive Bacteria* (LGC), ไฟลัม *Actinobacteria* ซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่ม *High G+C Gram Positive Bacteria* (HGC) ซึ่งตีพิมพ์ใน volume ที่ 3 และ4 ตามลำดับ ใน volume ที่ 5 จะแสดงรายละเอียดของแบคทีเรียกลุ่ม *Plantomycetes*, *Spirochaetes*, *Fibrobacteres*, *Bacteriodetes* และ *Fusobacteria* ซึ่งคาดว่าทั้งหมดจะตีพิมพ์ภายในปี 2007 (Prescott *et al*., 2005)

ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำนอกจากแบคทีเรียในกลุ่ม γ-Proteobacteria ที่มีแบคทีเรียในกลุ่มหลายชนิดเป็นแบคทีเรียก่อโรคแล้ว ยังมีแบคทีเรียในกลุ่ม LGC เป็นกลุ่มที่น่าสนใจอีกกลุ่มหนึ่ง เนื่องจากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าแบคทีเรียบางชนิดในกลุ่ม LGC มีศักยภาพเป็นโปรไบโอติกในสัตว์น้ำได้ เช่น *L. plantarum* สามารถควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อ *V. harveyi* ได้ในหลอดทดลอง รวมถึงสามารถควบคุมการเพิ่มปริมาณของเชื้อ *V. harveyi* ในลำไส้ของกุ้งขาวได้ (บุญกอบ, 2549) รวมถึงเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ เช่น *B. subtilis*, *B. coagulan*, *L. brevis*, *L. casei*, *Enterococcus* sp. เป็นต้น (Fuller and Gibson, 1998)

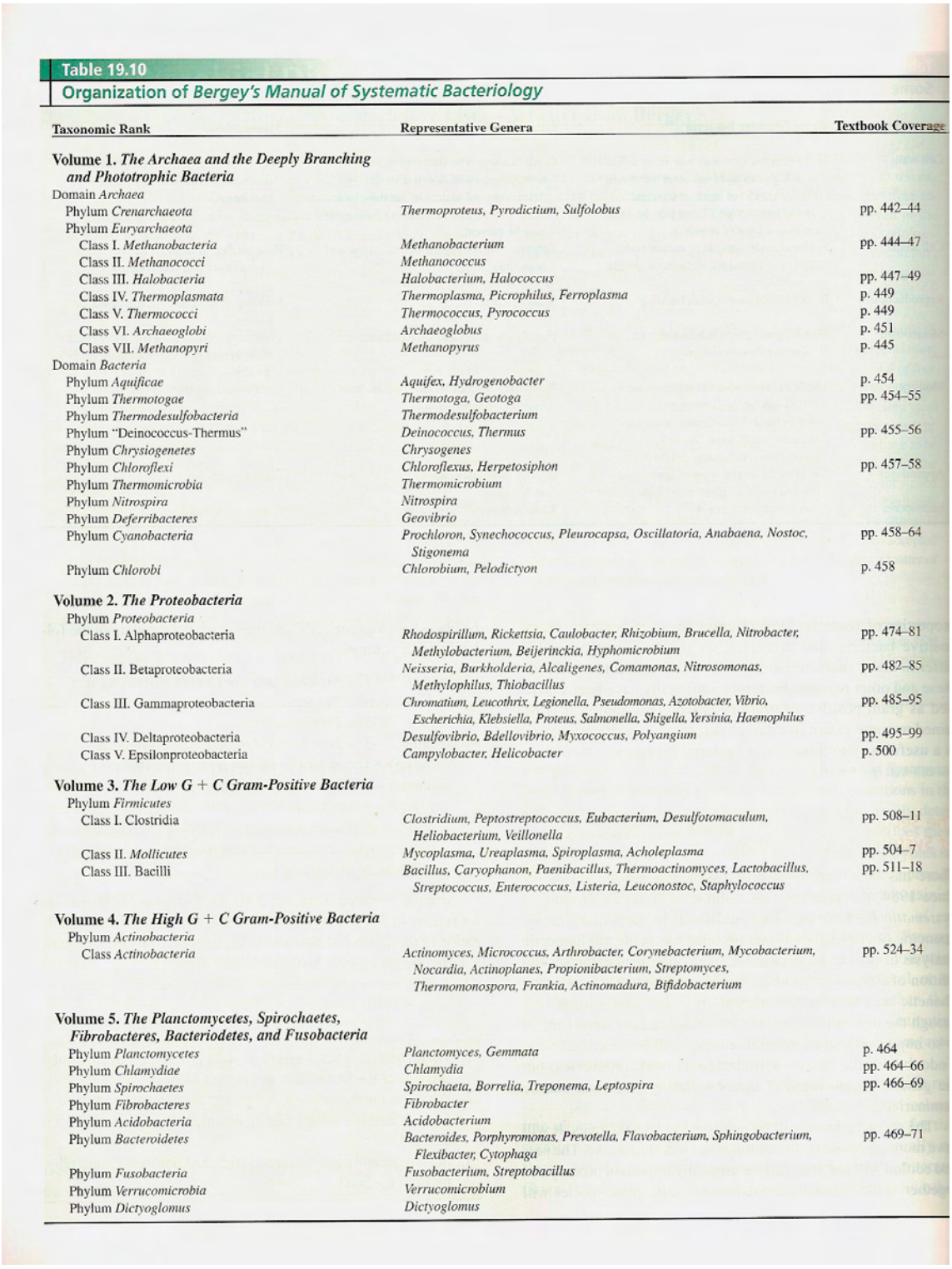
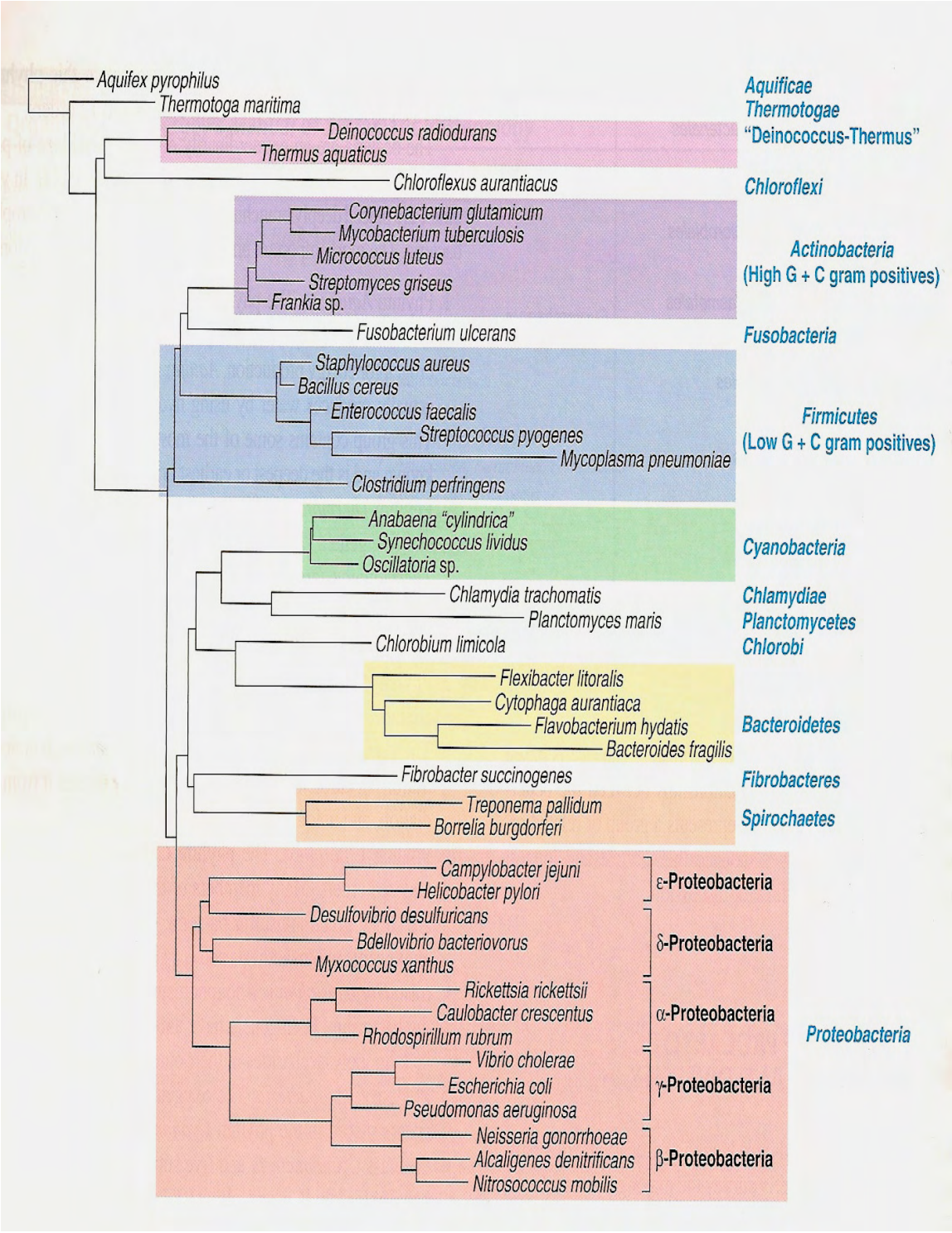


Table 19.10
Organization of *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*

Taxonomic Rank	Representative Genera	Textbook Coverage
Volume 1. *The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria*		
Domain *Archaea*		
Phylum *Crenarchaeota*	*Thermoproteus, Pyrodictium, Sulfolobus*	pp. 442–44
Phylum *Euryarchaeota*		
Class I. *Methanobacteria*	*Methanobacterium*	pp. 444–47
Class II. *Methanococci*	*Methanococcus*	
Class III. *Halobacteria*	*Halobacterium, Halococcus*	pp. 447–49
Class IV. *Thermoplasmata*	*Thermoplasma, Picrophilus, Ferroplasma*	p. 449
Class V. *Thermococci*	*Thermococcus, Pyrococcus*	p. 449
Class VI. *Archaeoglobi*	*Archaeoglobus*	p. 451
Class VII. *Methanopyri*	*Methanopyrus*	p. 445
Domain *Bacteria*		
Phylum *Aquificae*	*Aquifex, Hydrogenobacter*	p. 454
Phylum *Thermotogae*	*Thermotoga, Geotoga*	pp. 454–55
Phylum *Thermodesulfobacteria*	*Thermodesulfobacterium*	
Phylum "Deinococcus-Thermus"	*Deinococcus, Thermus*	pp. 455–56
Phylum *Chrysiogenetes*	*Chrysogenes*	
Phylum *Chloroflexi*	*Chloroflexus, Herpetosiphon*	pp. 457–58
Phylum *Thermomicrobia*	*Thermomicrobium*	
Phylum *Nitrospira*	*Nitrospira*	
Phylum *Deferribacteres*	*Geovibrio*	
Phylum *Cyanobacteria*	*Prochloron, Synechococcus, Pleurocapsa, Oscillatoria, Anabaena, Nostoc, Stigonema*	pp. 458–64
Phylum *Chlorobi*	*Chlorobium, Pelodictyon*	p. 458
Volume 2. *The Proteobacteria*		
Phylum *Proteobacteria*		
Class I. Alphaproteobacteria	*Rhodospirillum, Rickettsia, Caulobacter, Rhizobium, Brucella, Nitrobacter, Methylobacterium, Beijerinckia, Hyphomicrobium*	pp. 474–81
Class II. Betaproteobacteria	*Neisseria, Burkholderia, Alcaligenes, Comamonas, Nitrosomonas, Methylophilus, Thiobacillus*	pp. 482–85
Class III. Gammaproteobacteria	*Chromatium, Leucothrix, Legionella, Pseudomonas, Azotobacter, Vibrio, Escherichia, Klebsiella, Proteus, Salmonella, Shigella, Yersinia, Haemophilus*	pp. 485–95
Class IV. Deltaproteobacteria	*Desulfovibrio, Bdellovibrio, Myxococcus, Polyangium*	pp. 495–99
Class V. Epsilonproteobacteria	*Campylobacter, Helicobacter*	p. 500
Volume 3. *The Low G + C Gram-Positive Bacteria*		
Phylum *Firmicutes*		
Class I. Clostridia	*Clostridium, Peptostreptococcus, Eubacterium, Desulfotomaculum, Heliobacterium, Veillonella*	pp. 508–11
Class II. *Mollicutes*	*Mycoplasma, Ureaplasma, Spiroplasma, Acholeplasma*	pp. 504–7
Class III. Bacilli	*Bacillus, Caryophanon, Paenibacillus, Thermoactinomyces, Lactobacillus, Streptococcus, Enterococcus, Listeria, Leuconostoc, Staphylococcus*	pp. 511–18
Volume 4. *The High G + C Gram-Positive Bacteria*		
Phylum *Actinobacteria*		
Class *Actinobacteria*	*Actinomyces, Micrococcus, Arthrobacter, Corynebacterium, Mycobacterium, Nocardia, Actinoplanes, Propionibacterium, Streptomyces, Thermomonospora, Frankia, Actinomadura, Bifidobacterium*	pp. 524–34
Volume 5. *The Planctomycetes, Spirochaetes, Fibrobacteres, Bacteriodetes, and Fusobacteria*		
Phylum *Planctomycetes*	*Planctomyces, Gemmata*	p. 464
Phylum *Chlamydiae*	*Chlamydia*	pp. 464–66
Phylum *Spirochaetes*	*Spirochaeta, Borrelia, Treponema, Leptospira*	pp. 466–69
Phylum *Fibrobacteres*	*Fibrobacter*	
Phylum *Acidobacteria*	*Acidobacterium*	
Phylum *Bacteroidetes*	*Bacteroides, Porphyromonas, Prevotella, Flavobacterium, Sphingobacterium, Flexibacter, Cytophaga*	pp. 469–71
Phylum *Fusobacteria*	*Fusobacterium, Streptobacillus*	
Phylum *Verrucomicrobia*	*Verrucomicrobium*	
Phylum *Dictyoglomus*	*Dictyoglomus*	

ภาพที่ 6 แสดงการจัดหมวดหมู่แบคทีเรียตาม The Second Edition of Bergey's Manual of Systematic Bacteriology

ที่มา : Prescott และคณะ (2005)



ภาพที่ 7 แสดงตัวอย่างแบคทีเรียที่เป็นสมาชิกในไฟลัมสำคัญ

ที่มา : Prescott และคณะ (2005)

6. การศึกษาโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียโดยเทคนิคที่ไม่อาศัยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย (Culture-independent analyses of bacterial community structure)

ในการศึกษาโครงสร้างชุมชนจุลินทรีย์ในระบบนิเวศที่สนใจ โดยปกติแล้วสามารถศึกษาได้สองลักษณะ คือเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ ซึ่งการศึกษาในเชิงคุณภาพจะแสดงให้เห็นถึงชนิดหรือกลุ่มของจุลินทรีย์ที่สนใจในระบบนิเวศ ซึ่งในปัจจุบันสามารถใช้เทคนิคต่างๆในการอธิบายได้อย่างชัดเจน ในขณะที่การศึกษาในเชิงปริมาณจะแสดงถึงปริมาณของแบคทีเรียแต่ละกลุ่มที่อาศัยอยู่ในระบบนิเวศซึ่งในปัจจุบันยังไม่สามารถระบุถึงปริมาณและการเปลี่ยนแปลงของปริมาณจุลินทรีย์ในระบบได้อย่างชัดเจน แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาทางชีวโมเลกุล เช่นวิธีการนับจุลินทรีย์โดยตรง (direct count) จากแหล่งที่อาศัยหรือเทคนิค 16S rRNA ก็สามารถตอบถึงสัดส่วนและการเปลี่ยนแปลงของสังคมจุลินทรีย์ในระบบที่สนใจได้ ซึ่งเทคนิคที่ใช้ในการศึกษาโครงสร้างชุมชนจุลินทรีย์สามารถแบ่งออกเป็น 2 ลักษณะ คือ เทคนิคที่อาศัยการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ (culture-depedent method) และเทคนิคที่ไม่อาศัยการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ (culture-independent method) ซึ่งในปัจจุบันการใช้เทคนิคที่ต้องอาศัยการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ ได้รับการพิสูจน์ถึงข้อจำกัดและการเบี่ยงเบนข้อเท็จจริงของโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์ในระบบนิเวศในหลาย ๆ ด้าน ไม่ว่าจะเป็นข้อจำกัดในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียซึ่ง Amann และคณะ (1995) ได้รายงานว่าแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์มีปริมาณไม่ถึง 1% ของแบคทีเรียทั้งหมดที่มีในระบบนิเวศ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการพบแบคทีเรียในกลุ่ม unculture bacteria ในปัจจุบันที่มีรายงานการค้นพบมากยิ่งขึ้น รวมถึงรายงานการวิจัยบางฉบับได้กล่าวถึงความสำคัญของแบคทีเรียกลุ่ม unculture bacteria ในการรักษาสมดุลของระบบนิเวศหรือเป็นสิ่งมีชีวิตสำคัญในการดำรงไว้ซึ่งการทำงานของระบบนิเวศ ดังเช่นการศึกษาของ Burrel และคณะ (1998) ที่แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของ unculture bacteria ในถังหมัก nitrite-oxidizing bacteria

ในปัจจุบันการศึกษาชุมชนแบคทีเรียด้วยเทคนิคที่ไม่ต้องอาศัยการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แต่อาศัยการทำงานของเครื่องหมายชีวภาพ (biomarker) เพื่อทำการจัดจำแนกกลุ่มจุลินทรีย์ในระดับโมเลกุลได้รับการยอมรับมากยิ่งขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้ 16S rRNA ของแบคทีเรีย โดยทั่วไปเครื่องหมายทางชีวโมเลกุลที่ใช้ควรมีลักษณะสำคัญ คือ สามารถสร้างความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตแต่ละกลุ่มอย่างชัดเจน ไม่ซับซ้อน และสามารถใช้ตรวจสอบจุลินทรีย์ได้โดยตรงจากตัวอย่างที่ทำการศึกษา ในกรณีที่เชื้อจุลินทรีย์ที่ทำการศึกษาไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ เครื่องหมายที่ใช้ควรที่จะบอกถึงรายละเอียดของสายวิวัฒนาการของจุลินทรีย์นั้นเพื่อที่จะสามารถนำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลอื่นได้ ซึ่งในปัจจุบันได้มีการนำเอาเครื่องหมายทางชีว

โมเลกุลมาใช้ในการศึกษาจุลินทรีย์หลายวิธีด้วยกัน เช่น DNA/DNA หรือ DNA/RNA hybridization, การวิเคราะห์องค์ประกอบของผนังเซลล์ หรือการหาความแตกต่างของลำดับเบสบนสาย rRNA เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามในธรรมชาติของระบบนิเวศจุลินทรีย์ในทุกระบบนิเวศจะประกอบขึ้นด้วยจุลินทรีย์หลายกลุ่ม ไม่ว่าจะเป็นแบคทีเรีย รา ยีสต์ หรือสาหร่ายขนาดเล็ก ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องทราบถึงปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในระบบนิเวศที่ทำการศึกษาเพื่อที่จะจำแนกกลุ่มที่ต้องการทำการศึกษาได้อย่างถูกต้อง ซึ่งการทราบถึงปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในระบบนิเวศก็สามารถทำได้โดยการประยุกต์ใช้สีย้อมเรืองแสง DAPI (4′,6′-diamido-2-phenylindole) ในการตรวจสอบปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในระบบนิเวศที่ทำการศึกษา (Madigan and Martinko, 2006)

7. การใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลในการติดตามแบคทีเรียที่สนใจ

ปัจจุบันได้มีการนำเอาเทคนิคทางชีวโมเลกุลเข้ามาช่วยในการติดตามชนิดหรือกลุ่มของแบคทีเรียที่สนใจในตัวอย่างชนิดต่าง ๆ ไม่ว่าจะเป็น ดิน น้ำ หรือ ในอวัยวะต่าง ๆ ของพืชและสัตว์ ซึ่งเทคนิคต่าง ๆ ทางชีวโมเลกุลมีข้อได้เปรียบมากกว่าเทคนิคทางจุลชีววิทยาซึ่งใช้อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์หลายประการไม่ว่าจะเป็นด้านความรวดเร็วในการตรวจสอบหรือความสามารถในการติดตามแบคทีเรียบางชนิดที่อาหารเลี้ยงเชื้อไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ เช่น เชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม Unculture bacteria ดังที่ได้กล่าวมาแล้วขั้นต้น ซึ่งเทคนิคทางชีวโมเลกุลที่มีการนำมาประยุกต์ใช้ในการติดตามตรวจสอบแบคทีเรีย ได้แก่ เทคนิคในกลุ่มของการตรวจสอบการเข้ากันของ DNA/RNA, DNA/DNA (DNA/RNA, DNA/DNA reassociation), การวิเคราะห์ผนังเซลล์แบคทีเรีย, เทคนิคในกลุ่มของอิเลคโตรโฟลีซิสแบบหนึ่งหรือสองทิศทางของโปรตีน, การวิเคราะห์ไขมันหรือกรดไขมัน, และการติดตาม rRNA เป็นต้น (Amann *et al*., 1995)

การติดตาม rRNA (rRNA approach) และยีนที่อยู่บน rDNA ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อม (Zoetendal *et al*., 2004) โดยมีข้อมูลพื้นฐานของลำดับเบส 16S rRNA มากกว่า 289,000 ลำดับในขณะที่ 23S rRNA มีข้อมูลมากกว่า 11,000 ลำดับใน Gen Bank (www.ncbi.nlm.nih.gov ณ. วันที่ 17/09/06) และเพิ่มมากขึ้นตลอดเวลา นอกจากนี้ยังมีฐานข้อมูลของ rRNA จากแหล่งอื่นๆ เช่น EBI (European Bioinformatics Institute: www.ebi.ac.uk) และ Ribosomal Database Project (www.rdp.msu.edu) เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการอ้างอิง ซึ่งโดยปกติลำดับเบสบนสาย rRNA จะมีส่วนที่ความจำเพาะในแต่ละกลุ่มของสิ่งมีชีวิตและมีความแปรผันของลำดับเบสน้อยมากเมื่อเทียบกับลำดับเบสตำแหน่งอื่นๆบนสาย DNA ซึ่งทำให้การแยกกลุ่มของสิ่งมีชีวิตโดยใช้ลำดับเบสบนสาย rRNA ได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวาง

ในส่วนของแบคทีเรียจะนิยมใช้ 23S rRNA และ 16S rRNA (Sghir *et al*., 2000.; Hinrikson *et al*., 2000) ซึ่งเทคนิคที่ใช้ในการศึกษาโครงสร้างประชากรแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมมีด้วยกันหลายเทคนิค เช่น

เทคนิค 16S rRNA sequencing ที่ทำการศึกษาโดยอาศัยการ clone ชิ้นยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมเข้าสู่เวคเตอร์แล้วทำการเพิ่มจำนวนในเชื้อแบคทีเรียจากนั้นจะนำสาย DNA ที่ได้ไปตรวจสอบลำดับเบสและเปรียบเทียบกับข้อมูลพื้นฐานเพื่อจำแนกชนิดหรือกลุ่มแบคทีเรีย

Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) และเทคนิค Thermal Gradient Gel Electrophoresis (TGGE) เป็นเทคนิคที่อาศัยหลักการที่ว่าชิ้น DNA ที่มีขนาดเท่ากันจะสามารถแยกออกจากกันได้โดยอาศัยลำดับเบสที่ต่างกัน ซึ่ง DGGE จะทำการแยกสาย DNA ซึ่งเป็นสายเกลียวคู่ด้วยสารเคมี (ยูเรียหรือฟอร์มาไมด์) ในขณะที่ TGGE จะทำการแยกสาย DNA ด้วยความร้อน โดยทั่วไปทั้งสองเทคนิคจะใช้ลำดับเบสของ 16S rRNA ประมาณ 200-500 เบสที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีเบส GC ยาว 40 เบสที่ปลาย 5′ ของไพรเมอร์เพียงเส้นเดียว (สุรินทร์, 2547) เมื่อทำการแยกสาย DNA ที่ได้บน polyacrylamide gel ที่มีความเข้มข้นของสารที่ทำให้ DNA เสียสภาพเพิ่มขึ้นมากขึ้นเรื่อย ๆ ก็จะทำให้สาย DNA แยกออกจากกันแต่ไม่ทำให้ DNA ทั้งสองสายแยกออกจากกันอย่างสมบูรณ์ จึงทำให้ความเร็วในการเคลื่อนที่ของสาย DNA ที่มีขนาดเท่ากันบน polyacrylamide gel แตกต่างกัน แต่อย่างไรก็ตามการใช้ความยาวของเบสไม่เกิน 500 เบส ก็อาจจะไม่เพียงพอต่อการจำแนกชนิดของแบคทีเรียอย่างละเอียดและเป็นการยากที่จะอธิบายถึงสมมุติฐานสำคัญของเทคนิคที่ว่า “one band-one species” เพราะแบนด์ที่เกิดขึ้นอาจจะเกิดจากชิ้นยีนเดียวกันหรือต่างชิ้นยีนก็ได้ นอกจากนี้สิ่งมีชีวิตชนิดเดียวก็อาจจะพบการเกิดแบนด์ได้มากกว่าหนึ่งแบนด์ (Schramm and Amann, 2000)

Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) เป็นการประยุกต์ใช้เทคนิค RFLP ในการศึกษาโครงสร้างชุมชนแบคทีเรีย โดยการเพิ่มจำนวน 16S rRNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์เส้นหนึ่งที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง จากนั้นนำ PCR product ไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วแยกด้วย gel eletrophoresis ซึ่งอาศัยเครื่อง Automated sequencer ในการอ่านปริมาณสารเรืองแสงที่ติดอยู่บนชิ้น DNA ที่ถูกตัด

Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการตรวจหาโพลีมอร์ฟิซึมของ DNA ที่มีการเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR โดยชิ้นส่วน DNA ที่ได้อาจจะมีลำดับเบสบางลำดับไม่เหมือนกัน ซึ่งเป็นที่มาของหลักการ SSCP ที่ว่า DNA สายเดี่ยวในธรรมชาติ (non-denaturing condition) จะมีการขดหรือพันกันภายในโมเลกุล เกิดเป็นโครงสร้างจำเพาะที่ขึ้น

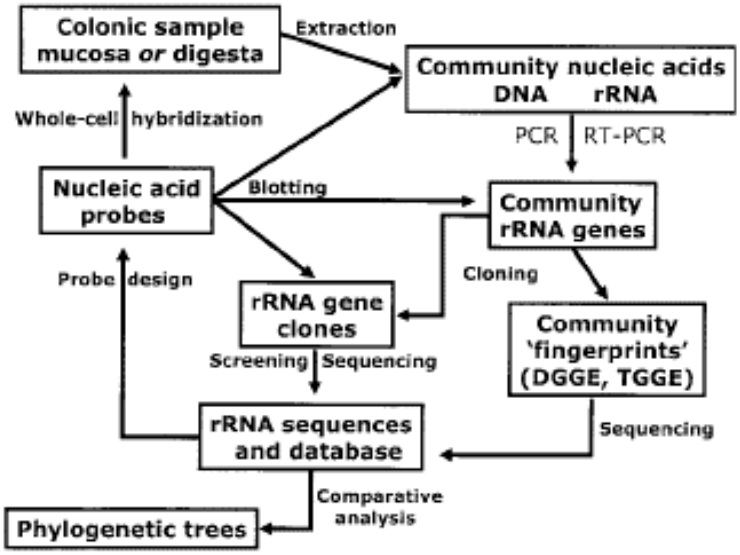
อยู่กับลำดับเบสภายในสาย DNA นั้น ๆ หรือมี conformation ที่จำเพาะซึ่งโมเลกุลของ DNA ที่มีเบสต่างกันแม้เพียงเบสเดียวก็จะเกิดโครงสร้างที่แตกต่างกัน ซึ่งจะส่งผลต่อการเคลื่อนในระหว่างการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสบน non-denaturing polyacrylamide gel ที่แตกต่างกัน ความไวของการตรวจสอบด้วยเทคนิค SSCP จะขึ้นอยู่กับความยาวของสาย DNA ที่ต้องการตรวจสอบ เนื่องจากเป็นการตรวจสอบความแตกต่างของ DNA ที่มีความละเอียดสูง โดยสามารถเห็นความแตกต่างได้แม้ DNA ในสายต่างกันเพียง 1 เบส ดังนั้นถ้าสาย DNA มีความยาวมากโอกาสตรวจพบน้อย ยิ่งสาย DNA มีความยาวมากขึ้นเท่าไร ความไวในการตรวจพบ SSCP ก็ยิ่งน้อยลง ขนาดความยาวของสาย DNA ที่เหมาะสมสำหรับตรวจหาโพลีมอร์ฟิซึม ด้วยวิธีนี้ คือ ไม่เกิน 200 นิวคลีโอไทด์ ในการศึกษาโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียด้วยวิธี SSCP นั้นจะทำการติดฉลากไพร์เมอร์ข้างหนึ่งด้วยสารเรืองแสง จากนั้นจะทำการเพิ่มจำนวน DNA และตรวจหาโพลีมอร์ฟิซึมตามวิธี SSCP จากนั้นนำผลผลิตที่ได้ไปตรวจสอบแบนด์ที่ได้ด้วยการตรวจสอบการเรืองแสง หรือทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Automated sequencer ในการอ่านปริมาณสารเรืองแสงที่ติดอยู่บนชิ้น DNA

ซึ่งข้อจำกัดต่าง ๆ ของเทคนิคในการศึกษาแสดงในตารางที่ 2 และแนวทางในการใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลในการศึกษาโครงสร้างประชากรแบคทีเรียแสดงในภาพที่ 8

ตารางที่ 2 แสดงเทคนิคที่ใช้ในการศึกษาโครงสร้างประชากรแบคทีเรียและข้อจำกัดต่าง ๆ

เทคนิค	ลักษณะการใช้งาน	ข้อจำกัดของเทคนิค
อาหารเลี้ยงเชื้อ	การแยกและเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์	ช้าและไม่ครอบคลุม
16S rRNA sequencing	จำแนกชนิดตามสายวิวัฒนาการ	ยุ่งยากและต้องใช้เทคนิค PCR
DGGE/TGGE	ติดตามการเปลี่ยนแปลงและวิเคราะห์เปรียบเทียบโครงสร้างประชากร	ใช้เทคนิค PCR และ semi-quantitative ในการวิเคราะห์ clone
T-RFLP	ติดตามการเปลี่ยนแปลงและวิเคราะห์เปรียบเทียบโครงสร้างประชากรอย่างละเอียด	ใช้เทคนิค PCR และ semi-quantitative ในการวิเคราะห์ clone
SSCP	ติดตามการเปลี่ยนแปลงและวิเคราะห์เปรียบเทียบโครงสร้างประชากร	ใช้เทคนิค PCR และ semi-quantitative ในการวิเคราะห์ clone
FISH	ติดตามและจำแนกชนิดแบคทีเรีย	ข้อมูลพื้นฐานของ rRNA และยุ่งยากในการทำโพรบ
Dot- blot hybridization	ติดตามความสัมพันธ์ของความชุกชุมของแบคทีเรีย	ข้อมูลพื้นฐานของ rRNA และยุ่งยากในการทำโพรบ
Quantitative PCR	ติดตามความสัมพันธ์ของความชุกชุมของแบคทีเรีย	ยุ่งยากและหลายขั้นตอนในการตรวจสอบ
Diversity microarrays	ติดตามความสัมพันธ์ของความชุกชุมของแบคทีเรีย	เพิ่งเริ่มต้นในการพัฒนาและราคาแพง
Non-16S rRNA profiling	ติดตามการเปลี่ยนแปลงและวิเคราะห์เปรียบเทียบโครงสร้างประชากร	ต้องอาศัยข้อมูล 16S rRNA ประกอบ

ที่มา : Zoetensal และคณะ (2004)



ภาพที่ 8 แสดงแนวทางในการใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลในการศึกษาโครงสร้างประชากรแบคทีเรีย ที่มา : Zoetendal และคณะ (2004)

Fluorescent *In Situ* Hybridization (FISH)

FISH เป็นเทคนิคทางชีวโมเลกุลที่มีการพัฒนาขึ้นในช่วง 2 ทศวรรษที่ผ่านมาในกลุ่มของเทคนิค *in situ* hybridization โดยมีจุดประสงค์เพื่อตรวจสอบตำแหน่งของการเรียงตัวของ nucleic acid ที่สนใจทั้งใน DNA และ RNA ของเซลล์ต่าง ๆ โดยที่โครงสร้างของเซลล์ยังไม่ถูกทำลาย ทั้งยังสามารถตรวจสอบได้อย่างรวดเร็ว และมีความจำเพาะเจาะจงในการตรวจสูง ในการตรวจหาสัญญาณ (signal detection) ของเทคนิค FISH จะใช้สารอกัมมันตรังสี (non-radioisotope) ได้แก่ fluorochromes, chemiluminescense, enzyme และ metallic compounds เป็นต้น ซึ่งในการใช้สารอกัมมันตรังสีในการตรวจสอบจะเพิ่มความสะดวก รวดเร็ว และปลอดภัยให้กับบุคลากร

FISH อาศัยหลักการของการจับของ DNA คู่สมระหว่าง primer หรือส่วนของ DNA และ/หรือ RNA สายเดียวที่ถูกติดฉลาก (Labeled single-stranded fragment of DNA or RNA) ที่เรียกว่า “labeled probe” (Schramm and Amann, 2000) โดยการเรียงตัวของ nucleotide อย่างเป็นคู่สม (complementary) กับ target DNA หรือ target RNA ที่เป็น conserve sequence ของสิ่งที่สนใจ (conserve sequence คือลำดับของ sequence ที่เหมือนกันในทุก ๆ เซลล์ของสิ่งมีชีวิตกลุ่มเดียวกัน) และตรวจสอบผ่านกล้องจุลทรรศน์อิพิฟลูออเรสเซนต์ (epifluorescent microscope) หรือ กล้องจุลทรรศน์ conforcal laser scaning โดยดูการเรืองแสงของสารเรืองแสงที่ติดกับโพรบ ซึ่งสารเรืองแสงมีคุณสมบัติในการเรืองแสงได้เมื่อถูกกระตุ้นด้วยความยาวคลื่นแสงที่เหมาะสม เช่น FITC, rhodamine หรือ Cy3 เป็นต้น นอกจากนี้อาจมีการเชื่อมต่อโพรบกับยีนที่สามารถเรืองแสงได้เอง

เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงที่มีความยาวคลื่นเหมาะสม เช่น QueenGene™ และ GreenStar™ เป็นต้น (Harmsen *et al.*, 2002.; Welch *et al*., 2002) ทั้งนี้ระดับความไวของเทคนิค FISH จะขึ้นอยู่กับปริมาณชุดของตำแหน่ง DNA หรือ RNA เป้าหมาย ซึ่งโดยปกติจะมีปริมาณ 10 – 20 ชุดต่อเซลล์ ปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคนิค FISH ในการติดตาม DNA หรือ RNA ที่สนใจทั้งในแง่การติดตามความผิดปกติและการพัฒนาการของ DNA , การตรวจสอบสัดส่วนของแบคทีเรียกลุ่มต่าง ๆ ในสิ่งแวดล้อม แบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์ (Artz *et al.*, 2003) ตลอดจนโปรไบโอติกของมนุษย์และสัตว์ (Jensen *et al.*, 1999) เพราะฉะนั้น การนำเอาเทคนิคดังกล่าวมาประยุกต์ใช้ในการติดตามการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชากรแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารของกุ้งอาจช่วยในการสร้างองค์ความรู้และตอบคำถามที่เกี่ยวข้องกับการเจริญและพัฒนาการของโปรไบโอติกรวมถึงการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชากรแบคทีเรียในร่างกายสัตว์น้ำได้ดีและชัดเจนมากยิ่งขึ้น แต่อย่างไรก็ตามเทคนิค FISH ก็มีข้อจำกัดในการตรวจสอบชุมชนแบคทีเรีย ไม่ว่าจะเป็นการครอบคลุมกลุ่มแบคทีเรียที่เป็นสมาชิกในกลุ่มแบคทีเรียที่ทำการศึกษา เนื่องจากการพัฒนาของโพรบจะอ้างอิงจากข้อมูลพื้นฐานของ 16S rRNA ที่มีอยู่ในช่วงเวลาที่ทำการพัฒนา แต่เมื่อเวลาผ่านไปข้อมูลของ 16S rRNA เพิ่มขึ้น โพรบที่พัฒนามาก่อนอาจจะไม่ครอบคลุมกลุ่มที่ต้องการทั้งหมด นอกจากนี้ยังมีข้อจำกัดในด้านอื่น ๆ เช่น การที่แบคทีเรียอยู่ในสภาวะพักตัวหรือใกล้ตายก็อาจจะตรวจสอบไม่ได้เนื่องจากมีปริมาณของ 16S rRNA ในเซลล์ต่ำ เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามเทคนิค FISH ก็นับว่าเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูงเทคนิคหนึ่งในการศึกษาชุมชนแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมในปัจจุบัน

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. การประยุกต์ใช้เทคนิค fluorescent *in situ* Hybridization (FISH) ในการศึกษาโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารของกุ้งขาวที่เลี้ยงในบ่อดิน
2. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบเลือดและโครงสร้างประชากรแบคทีเรียในทางเดินอาหารของกุ้งขาวที่เลี้ยงในบ่อดินจากการติดเชื้อไวรัสทอร่า
3. ศึกษาเปรียบเทียบลักษณะการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียในทางเดินอาหารของกุ้งขาวจากการเหนี่ยวนำโรคด้วยเชื้อไวรัสทอร่า แบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* AAHRC 01 และ เชื้อไวรัสทอร่าร่วมกับแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* AAHRC 01 ภายใต้สภาวะควบคุมในห้องปฏิบัติการ
4. ศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของโปรไบโอติก *L. plantarun* TISTR 050 ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* spp. ภายใต้สภาวะปกติและติดเชื้อไวรัสทอร่า