บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ปัจจุบันอาชีพการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยเฉพาะการเลี้ยงกุ้งกุลาดำมีกระจายกันอยู่บริเวณแหล่งน้ำกร่อย ชายฝั่งทะเลและแหล่งน้ำจืด ประมาณกันว่ามีการเลี้ยงกุ้งทะเลไม่ต่ำกว่า 20,000 ฟาร์มในพื้นที่ไม่ต่ำกว่า 500,000 ไร่ของประเทศ (ยงยุทธ ปรีดาลัมบุตร, 2540) ซึ่งสามารถนำเงินตราเข้าสู่ประเทศได้ปีละหลายหมื่นล้านบาท นอกจากมูลค่าของตัวสัตว์น้ำเองแล้ว วงจรธุรกิจที่เกี่ยวข้อง เช่น การแปรรูปสัตว์น้ำ อาหารสัตว์ ยารักษาโรคสัตว์ ก็สามารถทำให้เกิดการจ้างงานและมีเงินหมุนเวียนปีละจำนวนมหาศาล

ในช่วง 10 ปีที่ผ่านมาผลผลิตกุ้งทั่วโลกกำลังมีแนวโน้มลดลง (Fast and Menasveta, 2000) ปัญหาหนึ่งที่เกิดขึ้นกับการเลี้ยงกุ้งกุลาดำคือการเกิดโรคระบาดในกุ้ง ซึ่งมีสาเหตุมาจากแบคทีเรียและไวรัส โดยผู้ประกอบการส่วนใหญ่จะแก้ไขปัญหาด้วยการใช้สารเคมีหรือใช้ยาปฏิชีวนะ ผลที่ตามมาคือมีสารตกค้างในตัวกุ้งและในธรรมชาติ ซึ่งส่งผลต่อผู้บริโภคและสิ่งมีชีวิตในน้ำ ทำให้สิ่งมีชีวิตดื้อยาปฏิชีวนะและสารเคมีมากขึ้น และเป็นปัญหาด้านสาธารณะสุขต่อไปได้ นอกจากนี้ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำเกษตรกรนิยมให้อาหารกุ้งทั้งในรูปอาหารเม็ดและอาหารสด หากให้มากเกินความต้องการของกุ้ง ทำให้มีอาหารเหลือและมีการย่อยสลายสารอาหารในบ่อและส่งผลให้คุณภาพน้ำเปลี่ยนไป มีการสะสมของอินทรีย์สารและอนินทรีย์สารซึ่งเป็นผลจากการย่อย เช่น ไนเตรท ไนไตรท์ ไฮโดรเจนซัลไฟด์ ซึ่งมีผลเสียทำให้ความต้านทานโรคของกุ้งลดลง ดังนั้นจะเห็นได้ว่าสิ่งแวดล้อมในบ่อเลี้ยงก็มีส่วนสำคัญที่จะทำให้กุ้งมีสุขภาพที่ดี สามารถทนต่อโรคได้ การแก้ปัญหาเพื่อควบคุมโรคติดเชื้อในกุ้งที่ดีที่สุดคือการป้องกัน การควบคุมสภาพแวดล้อมให้เหมาะสม หลีกเลี่ยงสาเหตุที่ทำให้กุ้งเกิดความเครียด เช่น ควบคุมคุณภาพน้ำและอาหารให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสม ปล่อยกุ้งในอัตราที่ไม่หนาแน่นเกินไป การป้องกันอีกแนวทางหนึ่งที่น่าสนใจ คือการนำเอาแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์เข้าไปแทนที่แบคทีเรียที่เป็นโรคเหล่านั้น การเติมแบคทีเรียที่มีประโยชน์ที่สามารถลดสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ที่มีผลเสียต่อการเจริญของกุ้งและช่วยเสริมภูมิต้านทานให้กับกุ้งได้ Xu-e และ Zhaoxing (1993) ได้ใช้แบคทีเรียสังเคราะห์แสงในการอนุบาลลูกกุ้งโดยผสมแบคทีเรียสังเคราะห์แสงกับอาหารสังเคราะห์ พบว่าลูกกุ้งมีการเจริญเติบโตและการ

พัฒนาที่ดีกว่าชุดควบคุม และช่วยปรับปรุงคุณภาพน้ำอีกด้วย การใช้แบคทีเรีย *Bacillus* sp. S11 ผสมในอาหารมีผลให้ภูมิต้านทานของกุ้งมากขึ้น (Rengpipat *et al.*, 2000)

ดังนั้นการทดลองครั้งจึงต้องการแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงเพื่อเป็นโปรไบโอติกแบคทีเรีย ทดสอบการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกที่อุณหภูมิสูง รวมทั้งการใช้สารอาหารที่มีราคาถูกและหาได้ในท้องถิ่น ศึกษาผลของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกต่อแบคทีเรียก่อโรคในกุ้ง ผลต่อระบบภูมิคุ้มกันและคุณภาพสีของกุ้งกุลาดำ เพื่อเป็นข้อมูลในการทดลองขั้นต่อไป

ตรวจเอกสาร

1. แบคทีเรียสังเคราะห์แสง

แบคทีเรียสังเคราะห์แสง แบ่งเป็น 2 กลุ่มตามเมแทบอลิซึม คือ anoxygenic photosynthetic bacteria และ oxygenic photosynthetic bacteria ความแตกต่างระหว่างแบคทีเรีย 2 กลุ่มนี้แสดงในตารางที่ 1 และเนื่องจากงานวิจัยนี้ต้องการนำแบคทีเรียสังเคราะห์แสงกลุ่มย่อย purple nonsulfur bacteria (วงศ์ *Rhodospillaceae*) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม anoxygenic photosynthetic bacteria มาใช้ประโยชน์ ดังนั้นจะศึกษารายละเอียดเฉพาะแบคทีเรียสังเคราะห์แสงกลุ่มนี้เท่านั้น

แบคทีเรียกลุ่ม anoxygenic เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีขนาด 0.3-0.6 ไมโครเมตร เซลล์มีรูปร่างกลม รูปไข่ รูปโค้ง รูปแท่ง หรือรูปเกลียว การขยายพันธุ์ส่วนใหญ่โดยการแบ่งเซลล์ แบบ binary fission แต่มีบางสายพันธุ์ (species) ที่มีการขยายพันธุ์โดยการแตกหน่อ (budding) เซลล์มีสีม่วง-แดง แดง ส้ม-น้ำตาล น้ำตาล หรือสีเขียว มีรงควัตถุทั้งแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ และคาร์โรทินอยด์ การสังเคราะห์แสงจะแตกต่างกับสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน และพืชสีเขียว คือใช้แก๊สไฮโดรเจน สารประกอบซัลเฟอร์ในรูปรีดิวส์หรือสารอินทรีย์ เช่น มาเลท อะซิเตท ไพรูเวทเป็นตัวให้อิเล็กตรอน ดังนั้นจึงไม่สร้างออกซิเจนจากการสังเคราะห์แสง นอกจากนี้ยังสามารถตรึงแก๊สไนโตรเจนได้ เพราะมีเอนไซม์ชนิดที่เปลี่ยนแปลงมาจาก heme ประกอบด้วยธาตุเหล็กหนึ่งอะตอม เช่น ไซโตโครม (cytochrome) ยูบิควิโนน (ubiquinone) และเฟอริดอกซิน (ferridoxin) มีค่า G+C content อยู่ระหว่าง 45-73 โมลเปอร์เซนต์ (Staley *et al.*, 1989) Atlas (1997) แบ่ง anoxygenic photosynthetic bacteria เป็น 7 กลุ่มย่อย ตามคุณสมบัติและตำแหน่งของรงควัตถุ การสะสมสารซัลเฟอร์ การออกซิไดซ์ซัลไฟด์ และการเจริญในสภาพมีอากาศ หรือไร้อากาศ (ตารางที่ 2)

กลุ่มย่อยที่ 1 purple sulfur bacteria: sulfur globules inside cells แบคทีเรียนี้มีลักษณะเด่นคือ สะสมซัลเฟอร์ภายในเซลล์ อาจอยู่เดี่ยวๆ หรือเป็นกลุ่ม มีรูปร่างกลม รูปไข่ โค้ง และรูปเกลียว มีทั้งเคลื่อนที่ได้และเคลื่อนที่ไม่ได้ มีแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์เอและบี มีคาร์โรทินอยด์ชนิด spirilloxanthin, okenone และหรือ rhodopinal โคโลนีมีสีส้ม น้ำตาลถึงม่วง เมื่อเลี้ยงเซลล์ในสภาพไร้อากาศ มีแสงจะเจริญแบบ phototroph ถ้าอยู่ในสภาวะมีอากาศไร้แสงอาจเจริญแบบ chemoautotroph แบคทีเรียตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ได้โดยใช้วัฏจักรไรบูโลสไดฟอสเฟต (ribulose diphosphate) ตัวอย่างแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้แก่ *Amoebobacter*, *Chromatium*, *Lamprobacter*, *Lamprocystis*, *Thiocapsa*, *Thiocystis*, *Thiodicton*, *Thiopedia* และ *Thiospirillum*

ตารางที่ 1 สมบัติของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงตามเมแทบอลิซึม

taxonomic group	metabolism	photosynthetic pigment	electron donors	carbon source
purple bacteria	anoxygenic photosynthesis	bacteriochlorophyll *a* or *b*: carotenoids	H_2, H_2S, S	organic carbon or CO_2
green bacteria	anoxygenic photosynthesis	bacteriochlorophyll *c*, *d* or *e*, carotenoids	H_2, H_2S, S	CO_2
cyanobacteria	oxygenic photosynthesis	chlorophyll *a* phycobiliproteins	H_2O	CO_2
prochlorobacteria	oxygenic photosynthesis	chlorophyll *a*,*b*: ß -carotenes	H_2O	CO_2

ที่มา : Atlas (1997)

ตารางที่ 2 สมบัติของ anoxygenic photosynthethic bacteria

	Subgroup 1	Subgroup 2	Subgroup 3	Subgroup 4	Subgroup 5	Subgroup 6	Subgroup 7
	Purple sulfur bacteria:sulfur globules inside cells	Purple sulfur bacteria:sulfur globules outside cells	Purple nonsulfur bacteria	Bacteria with Bchl	Green sulfur bacteria	Multicellular filamentous Green bacteria	Aerobic chemotrophic bacteria with Bchl
Cell arrangement	Singly or in aggregates	Singly or in aggregates	Singly or in aggregates	Singly or in aggregates	Singly or in aggregates	Singly or in aggregates	Singly or in aggregates
Motility	Flagellar motility or non motile	Flagellar motility	Flagellar motility or non motile	Flagellar motility or non motile	Gliding motility or non motile	Gliding motility	Flagellar motility
Bacteriochlorophyll	Bchl *a* or *b*	Bchl *a* or *b*	Bchl *a* or *b*	Bchl *g*	Bchl *c*, *d* or *e*	Bchl *c*, *d* or *e*	Bchl *a*
Carotenoids	Group 1-4	Group 1	Group 1-4	Neurosporene	Group 5	Group 5	Group 1-4
Location of photosynthetic pigment	Internal membrane	Internal membrane	Internal membrane	Cytoplasmic membranes	Chlorosome	Chlorosome	-
Photosynthetic electron donor	Sulfide and sulfur	Sulfide and sulfur	Sulfide, thiosulfate, organic substance	Organic substance	Sulfide and sulfur	Organic substance	None
Sulfur globules	Sulfur deposited inside cells	Sulfur deposited outside cells	Sulfur sometimes deposited outside cells or not deposited	Sulfur not deposited	Sulfur deposited outside cell	Sulfur sometimes deposited outside cells or not deposited	Sulfur not deposited
Sulfide oxidized to	SO_4^{2-}	S^0, SO_4^{2-}	SO_4^{2-} or not oxidized	Not oxidized	SO_4^{2-}	S^0 or not oxidized	Not oxidized
Anaerobic growth	Phototrophic	Phototrophic	Phototrophic	Phototrophic	Phototrophic	Phototrophic	None
Aerobic growth	May be chemoautotrophic in dark	None	Chemotrophic	None	None	Chemotrophic	Chemotrophic (use acetate, pyruvate, butyrate, glutamate or glucose)

ที่มา : Atlas (1997)

กลุ่มย่อยที่ 2 purple sulfur bacteria: sulfur globules outside cells มีลักษณะเด่นคือ สะสมซัลเฟอร์ภายนอกเซลล์ เคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลา มีแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์เอหรือบี มีคาร์โรทินอยด์ชนิด normal spirilloxanthin ใช้ซัลไฟด์หรือซัลเฟอร์เป็นตัวให้อิเล็กตรอนในการสังเคราะห์แสง สามารถออกซิไดซ์ซัลไฟด์เป็นซัลเฟตและซัลเฟอร์ได้ ไม่สามารถเจริญในสภาวะมีอากาศ ตัวอย่างเช่น *Ectothiorhodospira*

กลุ่มย่อยที่ 3 purple nonsulfur bacteria มีคุณสมบัติเด่นคือในสภาวะไร้อากาศมีแสงจะเจริญแบบ phototrophic และมักใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเจริญในสภาวะมีอากาศหรือมีอากาศเล็กน้อยและไร้แสงจะเจริญแบบ chemotrophic และใช้สารอินทรีย์เป็นตัวให้อิเล็กตรอนและเป็นแหล่งคาร์บอน บางพวกสามารถใช้ซัลไฟด์หรือไธโอซัลเฟตเป็นตัวให้อิเล็กตรอน มีแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ เอหรือบี คาร์โรทินอยด์กลุ่ม 1-4 (ตารางที่ 3) มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวหรืออยู่เป็นกลุ่ม อาจเคลื่อนที่หรือไม่เคลื่อนที่ ตัวอย่างแบคทีเรียกลุ่มนี้เช่น *Rhodobacter*, *Rhodocyclus*, *Rhodopseudomonas* และ *Rhodospirillum*

กลุ่มย่อยที่ 4 bacteria with bacteriochlorophyll เป็นแบคทีเรียที่มีแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ จีและคาร์โรทินอยด์ชนิด neurosporene เซลล์ของแบคทีเรียกลุ่มนี้จึงมีสีเขียวออกน้ำตาลอ่อน เซลล์เป็นรูปไข่หรือรูปท่อน ไม่สามารถเจริญในสภาพมีออกซิเจน ไม่ใช้ซัลไฟด์ จัดเป็น photoheterotrophic หมายถึงใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งให้อิเล็กตรอนเท่านั้น ตัวอย่างแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้แก่ *Heliobacillus*, *Heliobacterium*

กลุ่มย่อยที่ 5 green sulfur bacteria มีแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ ซี ดี หรือ อี เซลล์มีสีเขียวหรือสีน้ำตาล รูปร่างกลม รูปไข่ หรือท่อน เคลื่อนที่แบบคืบคลาน (gliding) หรือเคลื่อนที่ไม่ได้ มีคลอโรโซม (chlorosome) ซึ่งเป็นออร์แกแนลที่มีรงควัตถุที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์แสงอยู่ เมื่อเลี้ยงในสภาพไร้อากาศ-มีแสงเจริญแบบ phototroph โดยใช้ซัลไฟด์หรือซัลเฟอร์เป็นตัวให้อิเล็กตรอน มีการสะสมซัลเฟอร์ภายนอกเซลล์ ตัวอย่างแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้แก่ *Ancalochloris*, *Chlorobium*, *Chloroherpeton*, *Pelodictyon* และ *Prosthechloris*

กลุ่มย่อยที่ 6 multicellular filamentous green bacteria ต่างจากกลุ่มย่อยที่ 5 คือ สามารถเจริญในสภาพมีออกซิเจนแบบ chemotrophic เซลล์มีลักษณะเป็นเส้นสาย เคลื่อนที่แบบคืบคลาน ในการสังเคราะห์แสงใช้อินทรีย์สารเป็นตัวให้อิเล็กตรอน บางพวกสามารถออกซิไดซ์ซัลไฟด์เป็นซัลเฟอร์ได้ ไม่สะสมซัลเฟอร์หรือสะสมไว้นอกเซลล์ ได้แก่ *Chloroflexus*, *Choronema*, *Heliothrix* และ *Oscillochloris*

กลุ่มย่อยที่ 7 aerobic chemotrophic bacteria with bacteriochlorophyll แบคทีเรียนี้เจริญได้เฉพาะสภาพมีออกซิเจนแบบ chemotrophic เท่านั้น ไม่สามารถออกซิไดซ์ซัลไฟด์ได้ มีแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์เอและบี และมีคาร์โรทินอยด์ เคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลา ได้แก่ *Erythrobacter*

ตารางที่ 3 คาร์โรทินอยด์กลุ่มต่างๆที่พบในแบคทีเรียสังเคราะห์แสง

กลุ่มที่	ชนิด	สารประกอบหลัก
1	Normal spirilloxanthin series	lycopene; rhodopin; spirilloxanthin
2	Alternative spirilloxanthin series	spheroidene; chloroxanthin; spirilloxanthin
3	Okenone series	skenone
4	Rhodopinal series (variation of group 1)	lycopene; lycopenol; lycopenal; rhodopin; spirilloxanthin ; rhodopinal
5	Chlorobactene series	chlorobactene; isorenieratene; β-carotene; γ-carotene

ที่มา: Pfennig และ Trüper (1989)

2. แบคทีเรียสังเคราะห์แสงกับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

2.1 เป็นอาหารสัตว์น้ำ

แบคทีเรียกลุ่มนี้ได้รับความสนใจด้านแหล่งโปรตีนทดแทนในอาหารสัตว์น้ำ เช่น วรรณา วงศ์กรเชาวลิต (2528) ทดลองใช้ *Rhodopseudomonas sphaerodes* P47 ผสมกับอาหารปลาเพื่อเลี้ยงปลานิล พบว่ามีผลทำให้อัตราการอยู่รอดสูงขึ้น อัตราการเจริญเร็วขึ้นและเร่งระยะการตั้งไข่ นอกจากนี้ Xu-e และ Zhaoxing (1993) ได้ใช้แบคทีเรียสังเคราะห์แสงในการอนุบาลลูกกุ้งโดยผสมแบคทีเรียสังเคราะห์แสงกับอาหารสังเคราะห์ พบว่าลูกกุ้งมีการเจริญเติบโตและการพัฒนาที่ดีกว่าชุดควบคุม และช่วยปรับปรุงคุณภาพน้ำอีกด้วย สอดคล้องกับรายงานของ Li และคณะ (1993) ที่พบว่า purple nonsulfur bacteria มีโปรตีนร้อยละ 62 และที่สำคัญมีกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการเจริญครบถ้วน คือวิตามินบี 2, วิตามินบี 12, กรดโฟลิก และไบโอติน และเมื่อนำไปใช้เลี้ยงกุ้ง พบว่าสามารถเพิ่มอัตราการรอดของลูกกุ้งวัยอ่อน (post larvae) ได้ ร้อยละ 30 นอกจากนี้ยังเพิ่มความต้านทานโรคอีกด้วย ส่วน Zhexiong (1994) ได้ใช้แบคทีเรียสังเคราะห์แสงเป็นอาหารเสริมให้แก่กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) และพบว่าช่วยให้กุ้งวัยรุ่น (juvenile) มีการลอก

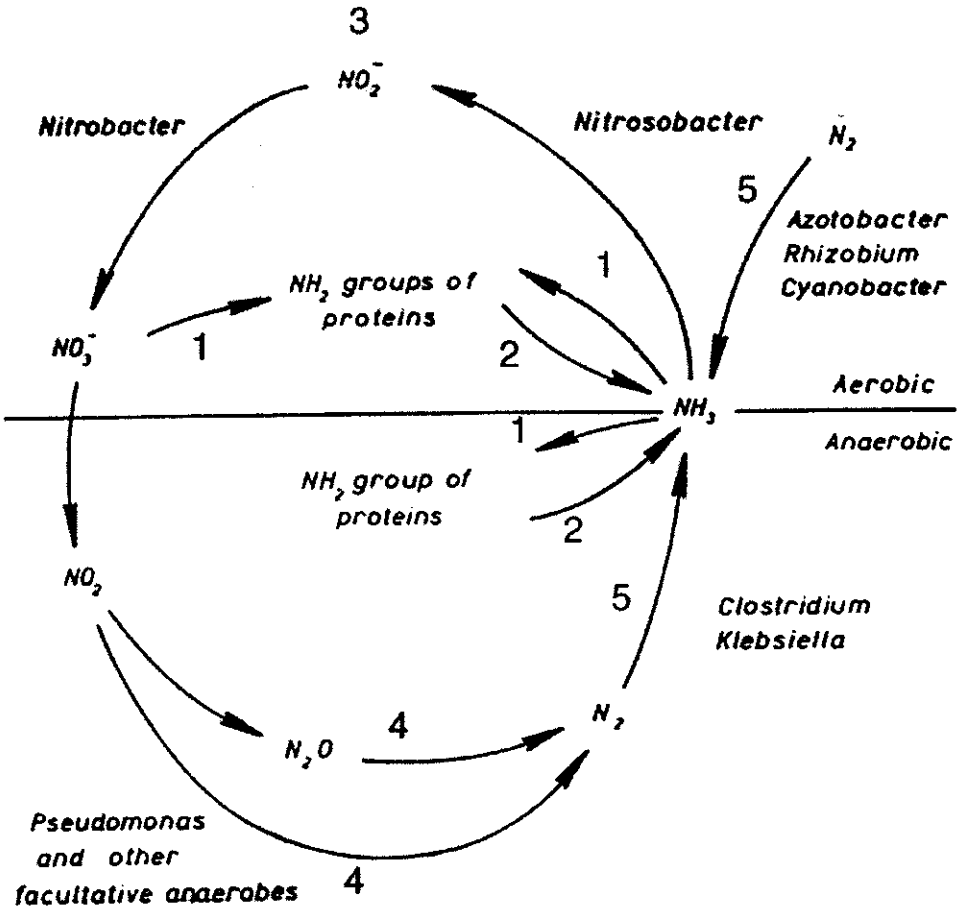
คราบ(molting) และการสร้างไข่ (seed rearing) เร็วขึ้น D-Souza และ Dias (1989) ได้ใช้แบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่แยกได้จากระบบบำบัดน้ำเสียผสมอาหารเพื่อใช้ในการเลี้ยงปลานิล (*Tilapia mossambica*) พบว่า ได้ผลผลิตสูงกว่าชุดควบคุม และเมื่อผสมแบคทีเรียสังเคราะห์แสงกลุ่ม *Rhodobacter capsulatus* ปริมาณ 0.01 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเพื่อเลี้ยงปลาเรนโบว์เทราต์ (*Oncorhynchus mykiss*) พบว่าการเกิดสี และอัตราการเจริญดีกว่าชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารปกติและอาหารที่ผสมคาร์โรทินอยด์สังเคราะห์ (Pradal, 1992; 1994) Zhijum และคณะ (1996) ใช้แบคทีเรียสังเคราะห์แสงผสมอาหารเพื่อเลี้ยงตะพาบน้ำ (soft shell turtle) เปรียบเทียบกับอาหารปกติและอาหารสด พบว่ากลุ่มที่กินอาหารผสมแบคทีเรียสังเคราะห์แสงมีอัตราการเจริญดีที่สุด Yufeng และคณะ (1993) ใช้แบคทีเรียสังเคราะห์แสงในการเลี้ยงหอยมุก (fish clam) พบว่าสามารถเพิ่มผลผลิตได้ 11.99 เปอร์เซ็นต์ ต่อไร่

2.2 แบคทีเรียสังเคราะห์แสงกับการปรับปรุงคุณภาพน้ำ

ไนโตรเจนเป็นแก๊สเฉื่อยที่มีปริมาณมากที่สุดในอากาศคือ 78.08 เปอร์เซ็นต์ จึงพบได้มากทั้งในน้ำจืดและน้ำเค็ม ซึ่งความสามารถในการละลายน้ำของไนโตรเจน ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและความดันบรรยากาศ (Boyd, 1990) ไนโตรเจนในน้ำสามารถเปลี่ยนแปลงเป็นสารประกอบอื่นซึ่งเป็นพิษต่อสัตว์น้ำ เช่น แอมโมเนีย (NH_3) และไนไตรท์ (NO_2^-) กระบวนการเปลี่ยนแปลงไนโตรเจนที่เกิดขึ้นในชั้นน้ำ หรือในตะกอนดินนั้น เกิดจากกิจกรรมของแบคทีเรียหลายชนิด เช่น แบคทีเรียที่ผลิตแอมโมเนีย (ammonifying bacteria) แบคทีเรียไนตริฟายเออร์ (nitrifier bacteria) และแบคทีเรียดีไนตริฟายเออร์ (denitrifier bacteria) (มั่นสิน ตัณฑุลเวศม์ และ ไพพรรณ พรประภา, 2538) แบคทีเรียสังเคราะห์แสงบางสายพันธุ์ จัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับวัฏจักรไนโตรเจนด้วย

2.2.1 วัฏจักรไนโตรเจน (nitrogen cycle) ไนโตรเจนเป็นธาตุที่จำเป็นและสำคัญมากในสิ่งมีชีวิต เนื่องจากเป็นองค์ประกอบของกรดอะมิโน, โปรตีนและนิวคลีโอไทด์ ไนโตรเจนที่พบในรูปต่างๆ มีการเปลี่ยนแปลงรูปตามขั้นตอนต่างๆดังนี้ (ภาพที่ 1)

1) immobilization of inorganic nitrogen เป็นขั้นตอนการเปลี่ยนสารอนินทรีย์ไนโตรเจนเป็นสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจน เช่นรูปของหมู่อะมิโน ($-NH_2$) ในโปรตีน สารอนินทรีย์ไนโตรเจน ซึ่งพืช สัตว์ สาหร่ายและแบคทีเรียนำไปใช้ได้ เช่น แอมโมเนียมอิออน (NH_4^+) ไนเตรท (NO_3^-) นอกจากนี้มีสิ่งมีชีวิตบางชนิดสามารถใช้แก๊สไนโตรเจนเป็นแหล่งไนโตรเจนได้



ภาพที่ 1 :วัฏจักรไนโตรเจน (1-5* คือขั้นตอนต่างๆ)

ที่มา: Barnes และ Wilson (1978)

*1 immobilization of inorganic nitrogen

2 ammonification

3 nitrification

4 denitrification

5 nitrogen fixation

2) ammonification เป็นขั้นตอนการเปลี่ยนสารประกอบไนโตรเจน เช่น โปรตีน เปลี่ยนเป็นแอมโมเนียมอิออน โดยการย่อยสลายซากสิ่งมีชีวิตและของเสีย โดยจุลินทรีย์ที่นำโปรตีนมาใช้มีเอนไซม์ที่สำคัญคือ โปรติเอส (protease) ย่อยโปรตีนให้อยู่ในรูปเปปไทด์ ส่วนเอนไซม์อีกชนิดคือ เปปติเดส (peptidase) จะสร้างกรดอะมิโนจากเปปไทด์

3) nitrification เป็นการเปลี่ยนแอมโมเนียมอิออนเป็นไนเตรท โดยจุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจน ซึ่งจะประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ การออกซิไดซ์แอมโมเนียมอิออนเป็นไนไตรท์ และการเปลี่ยนไนไตรท์เป็นไนเตรท แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องคือ *Nitrosomonas* และ *Nitrobacter* ตามลำดับ อย่างไรก็ตามกระบวนการ nitrification ค่อนข้างจะไวต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อม คือ มีช่วงพีเอชที่เหมาะสมแคบมาก (พีเอช 8.5) ถ้ามีความเข้มข้นของแอมโมเนียมอิออนสูงก็จะยับยั้งการเจริญของ *Nitrosomonas* นอกจากนี้ไนไตรท์ ยังเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย

4) denitrification เป็นการเปลี่ยนไนเตรทหรือไนไตรท์เป็นแก๊สไนโตรเจน เช่น ไนตรัสออกไซด์ (N_2O) หรือ แก๊สไนโตรเจน โดยจุลินทรีย์กลุ่มเฮเทโรโทรปิก เกิดขึ้นในสภาพไร้อากาศ โดยมีไนเตรทหรือไนไตรท์ทำหน้าที่รับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายในกระบวนการหายใจแบบไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic respiration) จะตรงกันข้ามกับกระบวนการ nitrification ซึ่งมีแอมโมเนียมอิออนเป็นตัวให้อิเล็กตรอน และออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน ส่วน denitrification มีสารอินทรีย์เป็นตัวให้อิเล็กตรอน และไนเตรทหรือไนไตรท์เป็นตัวรับอิเล็กตรอน ใช้ประโยชน์ในการกำจัดไนโตรเจนออกจากน้ำเสียได้แบคทีเรียในกลุ่มนี้ได้แก่ *Paracoccus denitrifican*, *Rhodopseudomonas palustris* เป็นต้น

5) nitrogen fixation เป็นการเปลี่ยนแก๊สไนโตรเจนเป็นสารประกอบอื่นๆ ที่สิ่งมีชีวิตสามารถนำไปใช้ได้ เช่นในรูปแอมโมเนียมอิออน ซึ่งจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องคือ *Azotobacter Rhizobium*, *Klebseilla* และ *Clostridium* (Barnes and Wilson, 1978)

2.2.2 การหายใจโดยไม่ใช้ออกซิเจน

แบคทีเรียบางชนิดปกติสร้างพลังงานจากการหายใจแบบใช้แก๊สออกซิเจน แต่เมื่ออยู่ในสภาพที่ไม่มีแก๊สออกซิเจนและมีไนเตรทอยู่ก็สามารถเจริญเติบโตได้เช่นกัน โดยไนเตรทจะถูกใช้เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายของลูกโซ่หายใจแทนแก๊สออกซิเจน เซลล์จะต้องมีเอนไซม์พิเศษคือ respiratory nitrate reductase (สุพจน์ ใช้เทียมวงศ์, 2529) ซึ่งจะเร่งปฏิกริยาคู่ควบการรีดักชันของไนเตรทกับการออกซิเดชันของไซโตโครม ผลที่ได้จากการรีดักชันของไนเตรทคือ ไนไตรท์ซึ่งจะสะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่เนื่องจากไนไตรท์เป็นพิษต่อแบคทีเรียหลายชนิด ดังนั้นจึงอาจถูกรีดิวส์ต่อไปเป็นแก๊สซึ่งไม่มีพิษได้เช่น ไนตริกออกไซด์ (NO), ไนตรัสออกไซด์ และแก๊สไนโตรเจน กระบวน

การทั้งหมดจึงถูกเรียกว่า denitrfication (Lee *et al.*, 2000) อย่างไรก็ตามพลังงานในรูป adenosine triphosphate (ATP) ที่ได้จะน้อยกว่าการหายใจโดยใช้ออกซิเจน สมการการหายใจโดยใช้ไนเตรทรับอิเล็กตรอนเป็นดังนี้

$$C_6H_{12}O_6+12NO^-_3 \longrightarrow 6CO_2+6H_2O+12NO^-_2$$

แบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่มีบทบาทในการปรับปรุงคุณภาพน้ำนั้นจะเป็นจุลินทรีย์ที่อยู่ในกลุ่มเฮเทโรโทรปิก คือเมื่อเจริญในสภาวะที่มีอากาศก็จะใช้แก๊สออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย แต่ถ้าอยู่ในสภาพไร้อากาศจะเกิดกระบวนการหายใจโดยไม่ใช้ออกซิเจน โดยมีไนเตรทเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย (Barnes and Wilson, 1978)

2.2.3 การใช้ไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน

แบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่ใช้ไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนได้มีหลายสายพันธุ์ เช่น *Rhodobacillus capsulatus* (Martines-Lague *et al.*, 1991), *Rhodopseudomonas aciophila* (Herbert *et al.*, 1978), *Chromatium vinosum* และ *Thiocapsa rosepersicina* (Bast, 1977) แต่จะมีอัตราการเจริญต่ำกว่าเมื่อใช้แอมโมเนีย ปริมาณมวลเซลล์จะขึ้นอยู่กับสัดส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนกับไนเตรท Dunstan และคณะ (1982) พบว่าถ้าเลี้ยง *Rhodopseudomonas. palustris* และ *Rhodobacter sphaeroides* ในอาหารที่มีไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนจะเจริญได้ช้ามาก และความสามารถในการเปลี่ยนไนตรัสออกไซด์ เป็นไนโตรเจนจะไม่สัมพันธ์กับการเกิด denitrification Koch และ Klemme (1994) รายงานการแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงชนิด purple photosynthetic bacteria ทั้งหมด 20 สายพันธุ์ พบว่ามีเพียง 7 สายพันธุ์เท่านั้นที่เกิดไนเตรทรีดักชันได้ Kim และคณะ (1999) แยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ *Rps. palustris* ซึ่งเป็น strong denitrifying photosynthetic bacteria จากตะกอนดินในระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เมื่อศึกษาการเจริญในสภาพไร้อากาศ พบว่าพีเอช, อุณหภูมิ และความเข้มแสงที่เหมาะสมคือ 5.5, 31 องศาเซลเซียส และ 5000 ลักซ์ ตามลำดับ มีอัตราการเปลี่ยนสารอินทรีย์เป็นเซลล์และอัตราการผลิตแก๊สไนโตรเจนเท่ากับ 0.095 ต่อชั่วโมง และ 0.2 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงตามลำดับ โดยไนเตรทรีดักชันเกิดในช่วง late-log ของการเจริญ และแบคทีเรียสังเคราะห์แสงกลุ่ม *Rhodobacter sphaeroides* ที่แยกได้จากทะเลสาบ Nakaumi ในประเทศญี่ปุ่นสามารถเกิด denitrification ได้เช่นกัน (Jianwei and Hirayama, 1991)

3. คุณภาพน้ำที่มีความสำคัญต่อการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

ปฏิกริยาทางชีวเคมีภายในร่างกายของสัตว์น้ำจะเปลี่ยนแปลงตามสภาวะภายนอก ดังนั้น สภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม จะเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้สัตว์น้ำเกิดการติดเชื้อรุนแรงมากขึ้น (กิจการ ศุภมาตย์และคณะ, 2543) คุณภาพน้ำจึงมีความสำคัญต่อการเลี้ยงกุ้งกุลาดำอย่างยิ่ง

3.1 พีเอช (pH) โดยทั่วไปน้ำในบ่อกุ้งมีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 7.5-8.0 ส่วนพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญของกุ้งคือ 6.0-9.0 และถ้าพีเอชของน้ำอยู่ในช่วง 4.0-6.0 หรือช่วง 9.0-11.0 จะมีผลให้ กุ้งโตช้า พีเอชต่ำกว่า 4.0 หรือสูงกว่า 11.0 จะมีผลให้อัตราการตายของกุ้งมากขึ้น (Boyd, 1989) กุ้งน้ำจืด *Paratya curvirostris* จะตายทันทีที่พีเอชของน้ำเท่ากับ 9.71 และที่พีเอช 3.7 กุ้งกุลาดำวัยรุ่นจะตายภายใน 96 ชั่วโมง (Allan and Maguire, 1992) อัตราการเจริญและการลอกคราบของกุ้งกุลาดำ และ กุ้ง *Penaeus occidentalis* ลดลงเมื่อเลี้ยงในน้ำทะเลที่มีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 6.4-7.9 นาน 36-56 วัน (Wickins, 1984) พีเอชของน้ำมีผลต่อความเข้มข้นของแอมโมเนีย (Colt and Amstrong, 1981 อ้างโดย Allan and Maguire, 1992) โลหะหนักและพีเอชต่ำจะทำให้สารพิษเหล่านี้มีความเข้มข้นมากขึ้น (Boyd, 1989)

3.2 อัลคาไลนิตี้ (alkalinity) หรือ ความเป็นด่าง หมายถึงปริมาณความเข้มข้นของไฮดรอกไซด์อิออน (OH^-), คาร์บอเนตอิออน (CO_3^{2-}) และไบคาร์บอเนตอิออน (HCO_3^-) แหล่งน้ำโดยทั่วไปมีคาร์บอเนตอิออน และไบคาร์บอเนตอิออน เป็นตัวหลัก ส่วนไฮดรอกไซด์อิออนจะพบน้อยมาก ค่าอัลคาไลนิตี้ที่เหมาะสมกับการเลี้ยงกุ้งยังไม่สามารถระบุได้แน่ชัด อย่างไรก็ตามค่าที่ให้ผลการเลี้ยงที่ดี และ พีเอชในรอบวันเปลี่ยนแปลงไม่เกิน 0.5 จะอยู่ระหว่าง 80-150 มิลลิกรัมต่อลิตร (ยงยุทธ ปรีดาลัมพบุตร, 2540) Boyd และ Daniels (1993) รายงานว่าในการเลี้ยงกุ้งค่าอัลคาไลนิตี้ต้องไม่ต่ำกว่า 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และถ้ามีค่าต่ำกว่านี้ให้เติมสารประกอบพวกแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)

3.3 ออกซิเจนละลาย (dissolved oxygen, DO) ปริมาณออกซิเจนละลาย มีความสำคัญต่อชีวิตและความเป็นอยู่ของกุ้งออกซิเจนในบ่ออาจได้มาจากบรรยากาศและกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืช (Boyd,1990) ตามปกติกุ้งขนาดเล็กต้องการออกซิเจนมากกว่ากุ้งขนาดใหญ่ กุ้งที่มีขนาด 0.1-0.5 กรัม จะใช้ออกซิเจนชั่วโมงละประมาณ 1-2 มิลลิกรัม ส่วนกุ้งขนาด 10.0-20.0 กรัม จะใช้ประมาณ 0.3 มิลลิกรัมต่อชั่วโมง และถ้าอยู่ในช่วงลอกคราบจะใช้ออกซิเจนมากกว่าปกติ (Boyd, 1989) และถ้าในน้ำมีค่าออกซิเจนละลายต่ำกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตร จะทำให้กุ้งกุลาดำและกุ้งขาว (*Penaeus vannamei*) มีอัตราการเจริญลดลง (Seidman and Lawrence, 1986 อ้างโดย กิจการ ศุภมาตย์ และคณะ, 2543) จากตารางที่ 4 ปริมาณออกซิเจนละลายที่เหมาะแก่การเจริญของกุ้งคือ ช่วง 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ถึงค่าอิ่มตัว

ตารางที่ 4 ผลของปริมาณออกซิเจนละลายต่อการเจริญของกุ้ง

ออกซิเจนละลาย	ผลต่อกุ้ง
น้อยกว่า 1 มิลลิกรัมต่อลิตร	ตาย
1-5 มิลลิกรัมต่อลิตร	เจริญช้า
5 มิลลิกรัมต่อลิตร - ค่าอิ่มตัว	เจริญได้ดีมาก
มากกว่าค่าอิ่มตัว	อันตราย

ที่มา: Boyd (1989)

3.4 ความเค็ม เป็นปัจจัยที่สำคัญในการเลี้ยงกุ้ง น้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งส่วนใหญ่มีความเค็มอยู่ในช่วง 5-38 ส่วนในพันส่วน (ppt) แม้ว่ากุ้งกุลาดำสามารถมีชีวิตอยู่ได้ในช่วงความเค็ม 0.2-70 ส่วนในพันส่วนก็ตาม แต่กุ้งจะโตช้าเมื่อน้ำมีความเค็มสูงกว่า 25 ส่วนในพันส่วน กุ้งกุลาดำจะโตได้ดีเมื่อมีความเค็มอยู่ในช่วง 10-20 ส่วนในพันส่วน และสามารถทนอยู่ในน้ำจืดได้นาน 1 เดือน (Boyd, 1989) กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในน้ำทะเลที่มีความเค็มต่างกันคือ 15 และ 30 ส่วนในพันส่วน มีอัตราการเจริญไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (Chien and Liao, 1987 อ้างโดย Allan and Maguire, 1992) ที่ความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน กุ้งขาวอินเดีย *Penaeus indicus* และ กุ้งขาว *P. vannamei* สามารถเจริญได้ดี (Gopalakrishnan, 1995; Tirado *et al.*, 1996) ส่วน Chen และ Lin (1998) รายงานว่ากุ้งน้ำจืด *Penaeus chinensis* สามารถเจริญได้ในน้ำที่มีความเค็ม 20 ส่วนในพันส่วน อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส แต่ไม่สามารถเจริญได้ในน้ำที่มีความเค็ม 10 ส่วนในพันส่วน อุณหภูมิ 12 องศาเซลเซียส

3.5 ไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) ก๊าซชนิดนี้เป็นพิษต่อกุ้ง และ มักเกิดขึ้นหลังจากที่เก็บน้ำไว้นานๆ Shigueno (1975 อ้างโดย บรรจง เทียนส่งรัศมี, 2530) รายงานว่ากุ้งญี่ปุ่นจะเสียการทรงตัวเมื่อในน้ำมีไฮโดรเจนซัลไฟด์ประมาณ 0.1-2.0 มิลลิกรัมต่อน้ำหนึ่งลิตร และกุ้งจะตายทันทีถ้าในน้ำมีไฮโดรเจนซัลไฟด์ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และถ้าพื้นบ่อมีการปนเปื้อนของไฮโดรเจนซัลไฟด์จะทำให้กุ้งขาวอินเดียกินอาหารได้น้อยลง (Gopakumar and Kuttyamma, 1997) Ju-Chan และ Matsuda (1994) รายงานว่าความเข้มข้นของไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่ทำให้กุ้งขาว *Metapenaeus monoceros* ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (Lethal concentration, LC_{50}) ภายใน 24 ชั่วโมง จะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับอายุของกุ้งได้แก่ ระยะซูเอีย (zoea), ระยะไมซีส (mysis) และ กุ้งวัยรุ่น มีค่า LC_{50} เท่ากับ 8.7, 11.4 และ 18.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

3.6 แอมโมเนียรวม แอมโมเนียเกิดจากการสลายตัวของสารอินทรีย์ เช่น เศษอาหารกุ้งและสิ่งขับถ่ายจากกุ้ง แหล่งน้ำธรรมชาติมีแอมโมเนียประมาณ 0-0.4 ส่วนในล้านส่วน (ยงยุทธ ปรีดาลัมพบุตร, 2540) ในฟาร์มที่มีการจัดการไม่ถูกต้องแอมโมเนียจะสูงขึ้นและถ้าสูงถึง 1.5 ส่วนในล้านส่วน จะทำให้กุ้งป่วยและไม่กินอาหาร แอมโมเนียในน้ำมีอยู่ทั้งแบบที่มีพิษในรูปของแอมโม- เนีย และรูปแอมโมเนียมอิออน ซึ่งไม่เป็นพิษเพราะไม่สามารถซึมผ่านผนังเซลล์ได้ (Boyd, 1990; Pillary, 1992) ความสมดุลย์ของแอมโมเนียทั้ง 2 รูป ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและพีเอช ถ้าอุณหภูมิสูงและพีเอชสูง จะอยู่ในรูปแอมโมเนีย เช่นที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และพีเอช 8 จะอยู่ในรูปแอมโมเนียประมาณร้อยละ 10 ของแอมโมเนียรวม (ยงยุทธ ปรีดาลัมพบุตร, 2540) Chen และ Kou (1992) รายงานว่าถ้าแอมโมเนียในน้ำมีความเข้มข้นสูงถึง 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้ตัวอ่อนของกุ้งญี่ปุ่น *Penaeus japonica* มีอัตราการเจริญลดลง และความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้กุ้ง grass shrimp (*Palaemonetes pugio*) ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (Hall *et al.*, 1978) สำหรับกุ้งน้ำจืด ถ้าแอมโมเนียในน้ำมีความเข้มข้นสูงกว่า 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร จะทำให้อัตราการเจริญลดลง (Wickins, 1976 อ้างโดยบรรจง เทียนส่งรัศมี, 2530) และถ้ามีแอมโมเนียอยู่ในช่วง 0.1-2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สัตว์น้ำจะตายภายใน 24 –72 ชั่วโมง (Boyd, 1989) Ostrensy และ Wasielesky Jr. (1995) รายงานว่า ความเข้มข้นของแอมโมเนียที่ทำให้กุ้งเซ้าท์เปาโล (Sao Paulo shrimp, *Penaues paulensis*) ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นอยู่กับเวลาและอายุของกุ้ง ในระยะซูเอีย (zoea) และระยะหลังตัวอ่อน (postlarvae) มีค่า LC_{50} ที่ 24 ชั่วโมง เท่ากับ 102.30 และ 24.19 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนค่า LC_{50} ที่ 96 ชั่วโมง เท่ากับ 9.39 และ 5.49 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

3.7 ไนไตรท์ ส่วนใหญ่ไนไตรท์จะละลายอยู่ในน้ำเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ยกเว้นในสภาพที่แหล่งน้ำนั้นขาดหรือมีออกซิเจนต่ำ ไนไตรท์มีพิษต่อสัตว์น้ำโดยมีผลทำให้ฮีโมโกลบิน (hemoglobin) เปลี่ยนเป็น เมทธิโมโกลบิน (methemoglobin) มีผลให้เม็ดเลือดมีสีซาแก่หรือสีเข้มขึ้น ทำให้ไม่สามารถนำออกซิเจนไปเลี้ยงเซลล์ได้ จึงมีผลสัตว์น้ำตายในที่สุด (Tucker and Lloyd, 1985 อ้างโดย สมหมาย เชี่ยววารีสัจจะ, 2539) แหล่งน้ำชายฝั่งโดยทั่วไปมีไนไตรท์อยู่ระหว่าง 0.000-0.009 มิลลิกรัมต่อลิตร Shuying และ Donglaing (1994) รายงานว่า เมื่อเลี้ยงกุ้ง *Penaeus penicilaatus* ที่มีขนาดต่างกัน ในน้ำที่มีความเค็ม 32 ส่วนในพันส่วน พีเอช 8.20 และอุณหภูมิของน้ำเท่ากับ 28 องศาเซลเซียส กุ้งแต่ละขนาดจะทนต่อไนไตรท์ได้ไม่เท่ากัน โดยค่าที่ปลอดภัยที่สุด ที่กุ้งทุกขนาดสามารถเจริญได้คือ 160 มิลลิกรัมต่อลิตร Tirado และคณะ (1996) รายงานว่าน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งขาว *Penaeus vannamei* ในระบบปิด มีค่าความเข้มข้นเฉลี่ยของไนไตรท์ต่ำกว่า

0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าความเข้มข้นของไนเตรท 68 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นค่าที่ไม่เป็นอันตรายต่อกุ้ง

3.8 ไนเตรท ปริมาณไนเตรทในแหล่งน้ำทั่วไปจะเป็นผลขั้นสุดท้ายของกระบวนการออกซิเดชันสารอินทรีย์ ไนเตรทไม่เป็นพิษต่อสัตว์น้ำ กุ้งยังมีการเจริญได้ตามปกติ แม้ว่าในน้ำจะมีไนเตรทสูงถึง 300 มิลลิกรัมต่อลิตร (Wickins, 1976 อ้างโดย บรรจง เทียนส่งรัศมี, 2530) Musig และคณะ (1995) ศึกษาคุณภาพน้ำทิ้งจากการเลี้ยงกุ้งกุลาดำพบว่า มีความเข้มข้นของไนเตรทต่ำมากคือ อยู่ในช่วง 0-0.0263 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่มีการตกค้างของไนไตรท์ในความเข้มข้นที่ค่อนข้างสูงคือ 0.4094 มิลลิกรัมต่อลิตร

4. ปัญหาโรคเรืองแสงในกุ้ง

4.1 แบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคเรืองแสง

แบคทีเรีย *Vibrio harveyi* เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคเรืองแสงในกุ้งกุลาดำ (มณเฑียร ส่งเสริม และคณะ, 2533) และในลูกกุ้งแชบ๊วย (*Penaeus merguiensis*) ในประเทศไทย (ดารุณี แซ่อุ่ย และคณะ, 2530) เชื้อชนิดนี้ยังก่อให้เกิดความเสียหายต่อกุ้งในโรงเพาะฟักในประเทศอินโดนีเซีย (Sunaryanto and Marium, 1986 อ้างโดย Karanasagar *et al.*, 1994), ฟิลิปปินส์ (Lavilla-Pitogo *et al.*, 1990), ไต้หวัน (Chen *et al.*, 1992), อินเดีย (Karanasagar *et al.*, 1994), เวเนซุเอลา (Alvarez *et al.*, 1998) และออสเตรเลีย (Pizzutto and Hirst, 1995 อ้างโดย Saulnier *et al.*, 2000) โดยเชื้อ *V. harveyi* ก่อให้เกิดความเสียหายต่อลูกกุ้งในโรงเพาะฟักในระยะตัวอ่อน, หลังตัวอ่อน (Lightner, 1988), ระยะซูเอีย (Prayitno and Latchford, 1995) และกุ้งขนาดใหญ่ที่เลี้ยงอยู่ในบ่อเลี้ยง (Nash *et al.*, 1992 อ้างโดย Jiravanichpaisal *et al.*, 1994) ผลจากการแยกเชื้อจากกุ้งกุลาดำในระยะลูกกุ้งและกุ้งโต 82 ตัวพบว่า มีเชื้อ *V. harveyi* อยู่ด้วย (Jiravanichpaisal *et al.*, 1995 อ้างโดย สาวิตรี ศิลาเกษ, 2541) และจากการแยกเชื้อสกุล *Vibrio* sp. จากลูกกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในประเทศไทยของ Ruangpan และคณะ (1995a) พบว่ามีเชื้อ *V. harveyi* อยู่ด้วย ส่วน Le-Groumellec และคณะ (1995) ได้แยกเชื้อจากลูกกุ้งในโรงเพาะฟักในประเทศไทยและประเทศเอควาดอร์ และจำแนกชนิดของเชื้อโดยใช้คุณสมบัติทางซีวเคมี พบว่าเชื้อ *V. harveyi* เป็นสาเหตุทำให้เกิดการตายจำนวนมากของลูกกุ้งในโรงเพาะฟัก และสายพันธุ์ของเชื้อ *V. harveyi* ที่พบในประเทศไทยเป็นชนิดที่มีความรุนแรงมากกว่าสายพันธุ์ที่พบในประเทศเอควาดอร์ จากการทดลองตรวจสอบปริมาณเชื้อในน้ำที่เลี้ยงกุ้งอย่างหนาแน่น โดย Ruangpan และคณะ (1995b) พบเชื้อกลุ่ม *Vibrio* sp. หลายชนิดในความเข้มข้นระดับ 10^3-10^5 โคโลนี/มิลลิลิตร ในการทดลองของ Chen และคณะ (1992) พบว่า *V. harveyi* จำนวน 1.3×10^6 โคโลนี/มิลลิลิตร ทำให้เกิดความแตก

ต่างทางสถิติของอัตราการตายของกุ้งกุลาดำระหว่างกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุม ส่วนในการทดลองของ ดารุณี แซ่อุ่ย และคณะ (2530) พบว่าเชื้อ *V. harveyi* จำนวน 10^7 โคโลนี/มิลลิลิตร ทำให้ลูกกุ้งแชบ๊วยตาย 100 เปอร์เซนต์ ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีอัตราการตายเพียง 60 เปอร์เซ็นต์ Prayitno และ Latchford (1995) รายงานว่า *V. harveyi* จำนวน 10^3 โคโลนี/มิลลิลิตร ทำให้ตัวอ่อนของกุ้งกุลาดำและกุ้งขาวอินเดีย *Peneaus indicus* แสดงอาการของโรคได้ โดยความรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับอายุของกุ้ง

แบคทีเรียกลุ่มวิบริโอเป็นสาเหตุทำให้เกิดการตายของกุ้งในระดับตั้งแต่ค่อนข้างมากถึงตาย 100 เปอร์เซ็นต์ (Lightner, 1993) โดยแบคทีเรียที่แยกได้จากกุ้งที่เป็นโรคส่วนใหญ่ได้แก่ *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. splendicus*, *V. vulnificus*, *V. damsela* และ *V. harveyi* (Mohney *et al.*, 1994; Lavilla- Pitogo, 1995) อาการโดยทั่วไปของกุ้งที่ติดเชื้อวิบริโอ คือเนื้อเยื่อตับจะถูกทำลาย ในกรณีที่ติดเชื้อไม่รุนแรงจะตรวจพบเชื้อในปริมาณน้อย แต่ถ้ามีการติดเชื้ออย่างรุนแรง พบว่าจะมีเชื้อแบคทีเรียเป็นจำนวนมาก และจะมีเม็ดเลือดมารวมกันบริเวณเนื้อเยื่อที่ถูกทำลาย ซึ่งจะแสดงอาการบวมน้ำ โดยเม็ดเลือดที่พบส่วนใหญ่เป็นชนิดเซมิแกรนูลาร์ (semigranular cell) (Jiravaninivhpaisal *et al.*, 1995 อ้างโดย สาวิตรี ศิลาเกษ, 2541)

ส่วนเชื้อ *V. harveyi* เป็นหนึ่งในหลายๆสกุลของวิบริโอที่ก่อให้เกิดการตายของกุ้งโดยเฉพาะอย่างยิ่งลูกกุ้งในโรงเพาะฟัก ดารุณี แซ่อุ่ย และคณะ (2530) สังเกตุเห็นว่าทุกครั้งที่มีการตายของลูกกุ้งแชบ๊วยในโรงเพาะฟัก จะเห็นการเรืองแสงของลูกกุ้งและน้ำในเวลากลางคืน หลังจากทำการแยกเชื้อจากลูกกุ้งที่ตายก็ตรวจพบว่าเป็นเชื้อ *V. harveyi* มณเฑียร สงเสริม และคณะ (2533) พบว่าอาการที่เกิดจากการติดเชื้อ *V. harveyi* คือในระยะแรกลูกกุ้งจะเคลื่อนไหวช้าลงและตัวจะมีสีขาวขุ่น จากการศึกษาของ Lavilla-Pitogo และคณะ (1990) พบว่ามี *V. harveyi* จำนวนมากบริเวณทางเดินอาหารและในแอ่งเลือดมีเชื้อประมาณ 8.6×10^4 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ถ้ามีการติดเชื้ออย่างรุนแรง ลูกกุ้งจะหยุดว่ายน้ำ เพราะไม่มีการบีบตัวของทางเดินอาหาร เมื่อตรวจสอบโดยใช้กล้องจุลทรรศ์อิเล็กตรอนชนิดสแกน (scanning electron microscope) จะพบเชื้อรวมตัวกันเป็นจำนวนมากบริเวณปากและอวัยวะที่ช่วยในการกิน อาจติดเป็นแผ่นแน่นและเพิ่มจำนวนมากขึ้น แต่ไม่พบลักษณะที่แสดงว่าเชื้อสามารถเจาะผ่านเปลือกนอกเข้าไปภายในตัวกุ้งได้ เมื่อนำเนื้อเยื่อบริเวณเหงือกมาตัดขวาง และ ตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่ามีเชื้ออยู่จำนวนมากเช่นกัน จึงคาดว่าการติดเชื้อ *V. harveyi* อาจจะสามารถผ่านทางระบบหายใจได้ และยังพบว่าเกิดการทำลายเนื้อเยื่อบริเวณหัวใจ และเซลล์สืบพันธุ์อีกด้วย

V. harveyi เป็นแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอจัดอยู่ในวงศ์ *Vibrionaceae* เมื่อจัดจำแนกประเภทแบคทีเรียตาม Bergey 's Manual of Systematic Bacteriology (Baumann and Schubert, 1984) แบคทีเรียนี้ติดสีแกรมลบ รูปท่อนตรงหรือโค้ง เซลล์มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.3-1.3 ไมโครเมตร เคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลาที่ขั้ว (polar flagella) โดยปกติให้ผลบวกในการทดสอบออกซิเดส ไม่มีเอนเทอโรแบคทีเรียลคอมมอนแอนติเจน (enterobacterial common antigen) ต้องการอาหารง่ายๆในการเติบโต พบในน้ำที่มีความเค็มช่วงกว้าง บางชนิดสามารถเปล่งแสงสีน้ำเงิน-เขียว (bioluminescence) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยอาศัยออกซิเจนและมีเอนไซม์ลูซิเฟอเรส (luciferase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *V. harveyi* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar (NA) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมงจะมีลักษณะเรียบ โคโลนีกลม นูน มีสีขาวนวล สะท้อนแสง เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีประมาณ 2-3 มิลลิเมตร ถ้าอยู่ในที่มืดจะเห็นโคโลนีเรืองแสง เจริญได้ในอุณหภูมิช่วงกว้างคือ 14-37 องศาเซลเซียส แต่จะเจริญได้เร็วที่อุณหภูมิช่วง 17-35 องศาเซลเซียส (Lavilla-Pitogo *et al.*, 1998) และเจริญได้ที่พีเอช 6-9 (Lavilla-Pitogo *et al.*, 1990; Prayitno and Latchford, 1995; Lavilla-Pitogo *et al.*, 1998) สมบัติทางชีวเคมีของ *V. harveyi* ดังตารางที่ 5

4.2 การควบคุมและป้องกันโรคแบคทีเรียในกุ้ง

ถึงแม้ว่าการใช้ยาปฏิชีวนะเช่น amplicilin, chloramphinical, erythromycin, oxytetracyclin, oxolinic acid , sarafloxacin และอื่นๆ ผสมอาหารในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม จะสามารถแก้ไขปัญหาการติดเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* ในกุ้งกุลาดำได้ (Lightner, 1993) แต่จากการศึกษาของ Karunsagar และคณะ (1994) พบว่าเชื้อวิบริโอที่แยกได้จากกุ้งในโรงเพาะฟักและจากบ่อเลี้ยงมีแนวโน้มที่ดื้อยาปฏิชีวนะมากขึ้น โดย *V. harveyi* สามารถสร้างฟิล์ม (biofilm) ออกมาห่อหุ้มเซลล์เพื่อป้องกันการถูกทำลายจากยาปฏิชีวนะและสารเคมี เช่น คลอรีน เป็นต้น (Karunsagar and Otta, 1996) ดังนั้นการควบคุมโรคติดเชื้อ *Vibrio* ในกุ้งที่ดีที่สุดคือการป้องกันโดยการควบคุมสภาพแวดล้อมให้เหมาะสม หลีกเลี่ยงสภาวะที่ทำให้กุ้งเกิดความเครียด เช่น ควบคุมคุณภาพน้ำและอาหารให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสม การปล่อยกุ้งในอัตราที่ไม่หนาแน่นเกินไป ก็ถือเป็นการป้องกันการติดเชื้อได้ นอกจากนี้อาจใช้วิธีทางชีวภาพ คือการควบคุมไม่ให้เชื้อที่ก่อโรคมีปริมาณมากเกินไปในบ่อเลี้ยงกุ้ง (Moriaty *et al*, 1997) ได้แก่การใช้จุลินทรีย์ควบคุมปริมาณเชื้อ *Vibrio* ให้น้อยลง เช่นการใช้น้ำตาลทราย 3 กิโลกรัมต่อไร่ ใส่ลงในบ่อเลี้ยงเพื่อให้เชื้อจุลินทรีย์กลุ่มที่สามารถใช้น้ำตาลทรายได้เพิ่มจำนวนมากขึ้น ทำให้แบคทีเรียก่อโรค เช่น *V. parahaemolyticus*

ตารางที่ 5 คุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Vibrio harveyi*

สมบัติ	ผลการทดสอบ
oxidase test	+
motility	+
catalase test	+
luminescence	+
ONPG hydrolysis	+
citrate	+
arginine dihydrolase	-
decarboxylase	
ornithine decarboxylase	+
lysine decarboxylase	+
enzyme production	
amylase	+
gelatinase	+
utilization of	
glucose	+
mannose	+
arabinose	+/-
galactose	+/-
lactose	-
moltose	+
melibiose	-
mannitol	+
fructose	+
sorbitol	-
sucrose	d
rhamnose	-
growth on TCBS	+
growth at	
0 % NaCl	-
3 % NaCl	+
6 % NaCl	+
8 % NaCl	+/-

+ =ให้ผลบวก - =ให้ผลลบ +/- = ผลไม่ชัดเจนระหว่างบวกและลบ, d=11-89 เปอร์เซ็นต์ให้ผลบวก

ที่มา : Baumann และ Schubert (1984)

และ *V. harveyi* ซึ่งเป็นกลุ่มที่ไม่สามารถใช้น้ำตาลทรายเป็นแหล่งอาหาร ทำให้เจริญได้น้อยลง (Lightner, 1993) นอกจากนี้อาจใช้โปรไบโอติกแบคทีเรีย (probiotic bacteria) ควบคุมเชื้อวิบริโอที่ก่อโรคในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเช่น Austin และคณะ (1995) พบว่าเชื้อ *V. alginolyticus* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Aeromonas salmonicida*, *V. anguillarum* และ *V. ordalii* ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคในปลาแซลมอน นอกจากนี้ Austin และคณะ (1992) ยังพบว่าสาหร่ายเซลล์เดียวบางชนิด เช่น *Tetraselmis suecica* สามารถยับยั้งการเจริญของ *V. anguillarum*, V. *salmonicida* และ *V. ordalii* ได้เช่นกัน ดังนั้นการใช้วิธีควบคุมทางชีวภาพ (biological control) ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น่าจะเป็นวิธีเหมาะสม เพราะสามารถลดการใช้สารเคมี, ลดการดื้อยาปฏิชีวนะและไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม (Rengpipat *et al.*, 1998; Gatesoupe, 1999; Verschuere *et al.*, 2000)

5. โปรไบโอติก

Hammes และ Hertel, (1997) ได้ให้ความหมายของโปรไบโอติกว่าคือการเลี้ยงจุลินทรีย์ที่มีชีวิตเพียงชนิดเดียวหรือหลายชนิดในสัตว์หรือมนุษย์ แล้วส่งผลให้เกิดประโยชน์ต่อเจ้าบ้าน โดยจุลินทรีย์โปรไบโอติกจะเข้าไปทำให้จุลินทรีย์ชนิดต่างๆในระบบลำไส้ เกิดความสมดุลย์ โดยทั่วไปเมื่อโปรไบโอติกอยู่ในร่างกายของคนหรือสัตว์ควรมีบทบาทดังนี้

1). เพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ และมีผลลดปริมาณจุลินทรีย์ที่ก่อโรค

2). อาจมีการสร้างสารปฏิชีวนะซึ่งควบคุมกลุ่มจุลินทรีย์ที่เป็นโรคได้

3). อาจมีการสร้างกรดแลกติกทำให้กระเพาะอาหารมีสภาพเป็นกรด จึงเกิดการย่อยและการใช้ประโยชน์จากสารอาหารต่างๆได้ดีขึ้น

4). จะไปแย่งจับกับเยื่อบุลำไส้ ทำให้จุลินทรีย์ที่ก่อโรคมาจับกับเยื่อบุลำไส้ ไม่ได้ จึงทำให้ไม่แสดงอาการของโรค

5). จะไปลดการสังเคราะห์พวกอะมีนในระบบทางเดินอาหาร ซึ่งโดยปกติสารพวกอะมีนจะเป็นพิษ คือทำให้การนำสารอาหารไปใช้ประโยชน์ได้น้อยลง แต่ถ้าสารอะมีนถูกยับยั้งการสังเคราะห์ จะทำให้สามารถนำสารอาหารไปใช้ได้มากขึ้น

6). สร้างเอนไซม์หลายชนิดที่ร่างกายสร้างไม่ได้ เช่น เบต้า-กาแลกโตซิเดส, เพคติเนส และเซลลูเลส

7). จะไปกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรคในระบบทางเดินอาหารให้สูงขึ้น

8).สามารถสร้างสารที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายสัตว์ เช่นกรดไขมัน, กรดอะมิโนและวิตามิน

Central Library
Prince of Songkla Univ.

9).สามารถกระตุ้นทำให้เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซท์หรือแมคโครฟาร์จมารวมตัวกันซึ่งแมคโครฟาร์จจะเป็นตัวทำลายเชื้อโรค (เกรียงศักดิ์ พูลสุข, 2535; Fuller, 1989; 1992; Gibson and Roberfroid, 1995)

5.1 ลักษณะของจุลินทรีย์ที่เป็นโปรไบโอติกที่ดี มีลักษณะดังต่อไปนี้

1). เจริญเติบโตได้ง่ายและสามารถยังชีพอยู่ได้ในลำไส้สัตว์

2). ต้องไม่เป็นจุลินทรีย์ที่ก่อโรค

3). สามารถเจริญได้ในบริเวณที่มีแหล่งอาหารน้อย

4). ทนต่อกรด โดยเฉพาะกรดจากน้ำย่อยหรือจากกระเพาะอาหาร

5). สร้างกรดแลกติกได้

6). มีความคงทนต่อสภาพแห้งได้นาน สามารถนำมาผลิตหรือผสมในอาหารสัตว์ได้

7). มีการเจริญเติบโตที่ช่วงอุณหภูมิกว้างคือระหว่าง 20 – 60 องศาเซลเซียส

8). ต้องมีคุณสมบัติในการเจริญเติบโตเร็ว คือใช้เวลาในการเพิ่มจำนวน (generation time) ต่ำ

9). ทนต่อยาปฏิชีวนะได้หลายชนิดซึ่งมักพบหรือใช้ในการผลิตอาหารสัตว์

10). ต้องไม่มีคุณสมบัติในการถ่ายทอดกรรมพันธุ์การต้านยา

11). ไม่ก่อให้เกิดหรือสร้างสารพิษ

12). สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้

13).ช่วยย่อยสลายกากอาหารแล้วให้ผลผลิตเป็นกรดอะมิโน,กรดไขมันและวิตามิน (เกรียงศักดิ์ พูลสุข, 2535; Gomez-Gil and Roque, 1998; Phianphak *et al.*, 1997)

5.2 โปรไบโอติกที่ใช้ในการเลี้ยงสัตว์

วรรณี เมืองเจริญ (2535) รายงานว่าในช่วง 10-15 ปีที่ผ่านมา ได้มีการค้นคว้าหาจุลินทรีย์ที่เกื้อกูลกับการลงทุนทำปศุสัตว์ และมีการศึกษาจุลินทรีย์ที่อยู่ในลำไส้ของสุกรจำนวนกว่า 400 ชนิด จนถึงปัจจุบันพบว่ามีจุลินทรีย์ทั้งยีสต์, รา และ แบคทีเรีย ที่นำมาใช้เป็นโปรไบโอติกแล้ว ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แบคทีเรีย ยีสต์และราที่เป็นโปรไบโอติก

ชนิดจุลินทรีย์	สายพันธุ์ที่นิยมใช้
แบคทีเรีย	
Bacillus sp.	*B. coagulan, B. subtilis, B. licheniformis, B. toysi, B.stearothermophilus*
Bacteroides sp.	*B. amylophilus, B. capillosus, B. ruminocola, B. suis*
Bifidobacterium sp.	*B. thermophilum, B. adolescentis, B. animalis, B. bifidum, B. infantis, B. longum*
Lactobacillus sp.	*L. acidophilus, L. bifidus, L. brevis, L. bulgaricus, L. casei, L. rerterii, L. ellobiosus, L. colinoides, L. corvatus ,L. delbruekii, L. fermentum, L. lactis, L. plantarum, L. ruminis, L. vitulinus*
Leuconostoc sp.	*L. cromoris, L. dextranicum, L. lactis, L. mesenteroides*
Pediococcus sp.	*P. acidophilus, P. halophilus, P. pentosaecus, P. cerevisiea, P. acidilacticii*
Propionibacterium sp.	*P. freudenreichii, P. shermanii*
Streptococcus sp.	*S. cremoris , S. diacetyl actis, S. faesium S. intermedius, S. lactis , S. thermophilus*
Clostridium sp.	*C. butyridium*
Enterococcus sp.	*Enterococcus* sp.
Escherichia sp.	*E. coli*
ยีสต์	
Sacharomyces sp.	*S. cerevisieae*
Candida sp.	*C. pentoiepessi* (*Torulopsis bovina*)
รา	
Aspergillus sp.	*A. oryzae*
Aspergillus sp.	*A. niger*

ที่มา: ดัดแปลงจาก วรรณี เมืองเจริญ (2535)

5.3 โปรไบโอติกกับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

สำหรับในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โปรไบโอติกหมายถึง การเติมจุลินทรีย์ลงสู่ถังหรือบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำ จุลินทรีย์ที่ดีหรือโปรไบโอติกจะไปเปลี่ยนแปลงชนิดหรือแทนที่แบคทีเรียที่ก่อโรคในน้ำและในตะกอนดิน เพิ่มความหลากหลายของจำนวนและชนิดของจุลินทรีย์ และทำให้สัตว์น้ำมีสุขภาพดีขึ้น (Moriaty *et al.*, 1997)รวมทั้งสามารถเจริญในระบบทางเดินอาหารของสัตว์น้ำได้ (Cahill, 1990; Gatsope, 1999; Gram *et al.*, 1999) Boyd และ Gross (1998); Phinphak และคณะ (1997) และ Moriaty (1997) กล่าวถึงการทำงานของโปรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำดังนี้

1). เพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำ

2). ลดความเข้มข้นของไนโตรเจนและฟอสฟอรัส

3).ส่งเสริมการเจริญของสาหร่ายที่มีประโยชน์และยับยั้งการเจริญของสาหร่ายที่เป็นพิษ เช่นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

4). ช่วยเพิ่มความเข้มข้นของออกซิเจนละลาย

5). ควบคุมความเข้มข้นของแอมโมเนีย, ไนไตรท์ และไฮโดรเจนซัลไฟด์ โดยการสร้างเอนไซม์บางชนิด (exo enzyme) ที่ทำให้ความเป็นพิษของสารดังกล่าวลดลง

6). ทนต่อเชื้อก่อโรคและมีอัตราการอยู่รอดสูง

7).เพิ่มปริมาณอาหารมีชีวิต เช่นแพลงก์ตอนสัตว์ (zoo plankton)

8). ช่วยส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันให้ดีขึ้น

9). ปรับปรุงคุณภาพน้ำ ทำให้น้ำที่ปล่อยสู่สิ่งแวดล้อมมีการปนเปื้อนน้อยลง

10). อาจมีการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค

11). โปรไบติกบางชนิดเช่น *Bacillus* sp. สร้างเอนไซม์ที่สามารถย่อยสารโมเลกุลใหญ่เช่น พอลิเมอร์ ทำให้สามารถเจริญในน้ำได้ดีกว่าเชื้อก่อโรค เช่น *Vibrio* sp. ที่ไม่สร้างเอนไซม์

แบคทีเรียที่เป็นโปรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้แก่ *Bifidobacterium* sp. (Itami *et al.*, 1998); *Bacillus* sp. (Boyd and Gross,1998; Reangpipat *et al.*,1998a; 1998b); *Pseudomonas* sp. (Smith and Durey, 1993; Gram *et al.*, 1999) *Rhodopseudomonas sp.* (Jingjin *et al.*, 1997); *Rhodobacter* sp. (Xiuzhen and Yufeng, 1993; Pradal, 1994); *Lactobacillus* sp. (Jiravanichpaisal *et al.*, 1997) นอกจากนี้แบคทีเรียในกลุ่มวิบริโอบางสายพันธุ์ก็เป็นโปรไบติกด้วยเช่นกัน (Direkbusarakom *et al.*, 1997; Garriques and Areralo, 1995;

Austin *et al.*, 1995) และสาหร่ายกลุ่ม *Tetraselmis succica* (Austin *et al.*, 1992) การประยุกต์ใช้โปรไบโอติกกับการเลี้ยงสัตว์น้ำมีหลายวิธีดังนี้

5.3.1. ใช้โปรไบโอติกที่เป็นเซลล์มีชีวิตเติมลงในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำ

Boyd และ Gross (1998) รายงานว่าแบคทีเรียที่นิยมใช้เป็นโปรไบโอติกชนิดที่เป็นเซลล์มีชีวิตเติมลงในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำมีหลายชนิดได้แก่ *Bacillus* sp., *Nitrosomonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Enterobacter* sp., *Cellulomonas* sp., *Rhodopseudomonas* sp. และ photosynthetic sulfur bacteria โดยปริมาณแบคทีเรียที่ใช้เติมลงในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำจะอยู่ในช่วง 10^2-10^4 โคโลนี/มิลลิลิตร Zherdmant และคณะ (1997 อ้างโดย Gomez-Gil *et al.*, 2000) รายงานว่าโปรไบโอติกแบคทีเรียจำนวน 10^3 โคโลนีต่อมิลลิลิตร สามารถป้องกันการติดเชื้อในกุ้งขาว *Penaeus vannamei* ได้ Haryanti และ Tsumura (1998) รายงานว่าเมื่อใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ BY-9 ที่มีเชื้อเริ่มต้น 10^6 โคโลนี/มิลลิลิตร เติมลงในถังที่เลี้ยงลูกกุ้งกุลาดำ พบว่าเชื้อวิบริโอในน้ำมีจำนวนลดลง กุ้งมีอัตราการรอด 46.11 เปอร์เซ็นต์ ส่วนชุดควบคุมมีอัตราการรอดเพียง 10.57 เปอร์เซ็นต์ Maeda และ Liao (1992) รายงานว่าเมื่อเติมแบคทีเรียที่แยกได้จากดินจำนวน 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลงในบ่ออนุบาลลูกกุ้งกุลาดำ ทำให้มีอัตราการรอดและการลอกคราบ ดีกว่าชุดควบคุม เมื่อใช้โปรไบโอติกแบคทีเรียจำนวน 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เป็นอาหารเสริมในการเลี้ยงตัวอ่อนหอยนางรม (*Crassostrea gigas*) พบว่าได้ผลผลิตสูงขึ้น เพราะโปรไบโอติกแบคทีเรียมีสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญและสร้างเอนไซม์ ที่ทำให้หอยนางรมมีระบบการย่อยที่ดี นอกจากนี้ยังช่วยกำจัดสารเมทาบอไลท์บางชนิด ที่สาหร่ายหรือสิ่งมีชีวิตอื่นๆ สร้างขึ้น (Douillet and Langdon, 1994) Nagami และ Maeda (1992) ใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ *Thalassobacter utilis* จำนวน 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เติมลงในบ่อเลี้ยงปูสีน้ำเงิน *Porturus trituberculatus* พบว่าปูมีอัตราการรอด 27.2 เปอร์เซ็นต์ ส่วนชุดควบคุมมีอัตราการรอด 6.8 เปอร์เซ็นต์ Xiuzhen และ Yufeng (1993) เติมแบคทีเรียสังเคราะห์แสงลงในบ่อเลี้ยงปลา silver carp *Hypophthalmicchthys molitrix* และ grass carp *Ctenopharyngo donidella* พบว่าจำนวนแบคทีเรียที่เหมาะสมที่ให้ผลผลิตสูงสุดคือ 17.6 ล้านล้านเซลล์/ลูกบาศก์เมตร Gomez-Gil (1998) ใช้โปรไบโอติกแบคทีเรียจำนวน 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เติมในถังเลี้ยงกุ้งที่ปลอดเชื้อ พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมง โปรไบโอติกแบคทีเรียจะลดจำนวนลง Gibson และคณะ (1998) รายงานว่าเมื่อใช้ *Aeromonas media* สายพันธุ์ 199 ซึ่งผลิตแบคเทอริโอซิน (bacteriocin-like inhibitory substance, BLIS) จำนวน 10^4 เซลล์ต่อ

มิลลิลิตร สามารถป้องกันการตายจากการติดเชื้อ *Vibrio tubiashi* ในหอยนางรม (*Crassostrea gigas*) ได้

5.3.2. ใช้โปรไบโอติกผสมกับอาหารสำเร็จรูป อาหารเม็ดหรือผสมกับอาหารมีชีวิต

Rengpipat และคณะ (1998a) รายงานว่า เมื่อใช้ *Baciillus* S11 ในลักษณะต่างกันคือ เซลล์สด, เซลล์สดในน้ำเกลือ และเซลล์แห้ง (lyophylized cell) ผสมอาหารสำหรับเลี้ยงกุ้งกุลาดำอายุ 30 วัน (PL30) เปรียบเทียบกับอาหารสูตรปกติ เมื่อให้อาหารครบ 100 วัน นำกุ้งกุลาดำในแต่ละชุดมาแช่เชื้อ *V. harveyi* D331 ที่มีปริมาณเชื้อ 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นอีก 7 วัน แช่เชื้อ *V. harveyi* D331 ซ้ำอีกครั้งโดยมีปริมาณเชื้อ 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ผลการทดลองพบว่า กุ้งกุลาดำที่กินอาหารผสม *Baciillus* S11มีอัตราการรอด 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกุ้งกุลาดำที่กินอาหารปกติมีอัตราการรอดเพียง 26 เปอร์เซ็นต์ Austin และคณะ (1995) พบว่าโปรไบโอติกแบคทีเรียสายพันธุ์ *Vibrio alginolyticus* สามารถลดการตายจากเชื้อ *Aeromonas salmonicida, Vibrio anguillarum* และ *Vibrio ordalii* ในปลาแซลมอนได้ โดยแบ่งการทดลองเป็น 2 ชุด คือ ชุดควบคุมและชุดทดลอง ชุดควบคุม แช่ปลาแซลมอนในถังที่มีเชื้อ *A. salmonicida, V. anguillarum* และ *V. ordalii* ชนิดละ 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นาน 10 นาที ส่วนชุดทดลองนั้น แช่ปลาแซลมอนในถังที่มีโปรไบโอติกแบคทีเรียจำนวน 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นาน 10 นาที หลังจากนั้นเลี้ยงไว้ 7 วัน จึงนำมาแช่ *A. salmonicida, V. anguillarum* และ *V. ordalii* ซ้ำอีกครั้งในปริมาณเชื้อและเวลาเท่าเดิมตรวจอัตราการตาย ผลการทดลองพบว่า ชุดควบคุมปลาแซลมอนมีอัตราการตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในชุดทดลองมีอัตราการตายจากเชื้อ *A. salmonicida, V. anguillarum* และ *V. ordalii* เท่ากับ 18, 74 และ 74 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ D-Souza และ Dias (1989) ได้ใช้แบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่แยกได้จากระบบบำบัดน้ำเสียผสมอาหาร เพื่อใช้ในการเลี้ยงปลานิล *Tilapia mossambica* พบว่าให้ผลผลิตสูงกว่าชุดควบคุม และเมื่อผสมแบคทีเรียสังเคราะห์แสงกลุ่ม *Rhodobacter capsulatus* ปริมาณ 0.01 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเพื่อเลี้ยงปลาเรนโบว์เทร้าต์ *Oncorhynchus mykiss* พบว่าการเกิดสี และอัตราการเจริญดีกว่าชุดที่เลี้ยงด้วยอาหารปกติและอาหารที่ผสมคาร์โรทินอยด์สังเคราะห์ (Pradal, 1992; 1994) Reangpipat และคณะ (1998b) ใช้ *Bacillus* sp.สายพันธุ์ S11 ที่แยกได้จากระบบทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำเป็นอาหารเลี้ยงอาร์ทีเมีย เพื่อให้เกิดเป็น probiotic encapsulation เพื่อ ใช้เลี้ยงลูกกุ้งกุลาดำ พบว่าจะให้ผลผลิตกุ้งสูงขึ้นและทนต่อโรคได้ดีกว่าลูกกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียที่กินอาหารปกติ

6. ระบบภูมิคุ้มกันในกุ้ง

กุ้งกุลาดำอยู่ในกลุ่มครัสเตเชียน (crustacean) ซึ่งอยู่ในไฟลัมสัตว์ที่มีขาปล้อง (arthropoda) เป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง ซึ่งระบบภูมิคุ้มกันที่ตอบสนองสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกายจะแตกต่างกับสัตว์ในกลุ่มที่มีกระดูกสันหลัง (Soderhall and Cerenius, 1992; Johansson *et al.*, 2000; Sritunyalucksana and Sodehall, 2000) นั่นคือกุ้งจะมีการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกายแบบไม่จำเพาะเจาะจง (Smith and Soderhall, 1983; Duvic and Soderhall, 1989) คือไม่สามารถจดจำสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกายได้ และจะตอบสนองช้ากว่าการสร้างแอนติบอดีในสัตว์ชั้นสูง โดยพบว่ามีการตอบสนองของเซลล์และสารในน้ำ (cellular and humoral responses) ดังนี้

1) cellular response เซลล์ที่ทำหน้าที่ในการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมได้แก่ เซลล์เม็ดเลือด (Soderhall *et al.*, 1985; Persson *et al.*, 1987; Soderhall and Cerenius, 1992, 1998) ซึ่งจะกำจัดสิ่งแปลกปลอมโดยกระบวนการต่างๆเช่น ฟาโกซัยโตซิส (phagocytosis), เอนแคปซูเลชัน (encapsulation), โนดูลฟอร์เมชั่น (nodule formation), การสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (antimicrobial compound), และ ระบบโปรฟีนอลออกซิเดส (prophenoloxidase activating system, proPO system) (Smith and Soderhall, 1983; Hose *et al.*, 1987; Duvic and Soderhall, 1989, Johansson and Soderhall, 1988)

2) humoral response เช่น โปรตีนชนิดต่างๆในพลาสมา ได้แก่ แอกกลูตินิน (agglutinin), ฮีโมไลซิน (hemolysin), ไลโซไซม์ (lysozyme), โปรตีนที่ช่วยในการแข็งตัวของเลือด (clotting protein) (Hermandez-Lopez *et al.*, 1996; Vargas-Albores *et al.*, 1997; Roch, 1999) และ แลคติน (lectin) (Soderhall and Cerenius, 1992)

6.1 ชนิดของเซลล์เม็ดเลือด

เม็ดเลือดกุ้งแบ่งได้เป็น 3 ประเภท (Bauchau, 1981; Martin and Graves, 1985; Soderhall and Cerenius, 1992) โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) และองค์ประกอบของไซโตพลาสซึม (Sequeira *et al.*, 1995) ดังนี้

1) อะแกรนูโลไซท์ (agranulocyte) หรือไฮยาลินเซลล์ (hyaline cell) เป็นกลุ่มที่ไม่มีแกรนูลหรือมีจำนวนน้อยในไซโตพลาสซึม (Soderhall and Cerenius, 1992) บางครั้งเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนจะพบไซโตพลาสมิกอินคลูชัน รูปร่างคล้ายกระสวยหรือค่อนข้างกลม มีนิวเคลียสขนาดใหญ่อยู่บริเวณกลางเซลล์ (Martin *et al.*, 1987) ภายในเซลล์มีอัตราส่วนระหว่างนิวเคลียสต่อไซโตพลาสซึมสูงมาก สามารถยึดเกาะกับกระจกสไลด์ได้ ทำหน้าที่ในการจับกินสิ่ง

แปลกปลอมโดยกระบวนการฟาโกซัยโตซิส (Smith and Soderhall, 1983) นอกจากนี้ยังชักนำให้เกิดการเริ่มต้นของกระบวนการตกตะกอน (coagulation) (Omori *et al.*, 1989 อ้างโดย Bachere, 2000)

2) เซมิแกรนูลาร์ ฮีโมไซท์ (semigranular haemocyte) เซลล์กลุ่มนี้ประกอบด้วยแกรนูลในปริมาณน้อย และจำนวนแตกต่างกัน มีรูปร่างหลายแบบคือ รูปกลม รูปไข่และรูปกระสวย ภายในเซลล์มีเอนไซม์หลายชนิดเช่น ไลโซโซมอล เอนไซม์ (lysosomal enzyme), แอซิดฟอสฟาแตส (acid phosphatate), เอสเทอเรส (esterase) และ เบตา-กลูโคโรนิเดส (β-glucoronidase) (Hose and Matin, 1989) คาดว่ามีหน้าที่ในการจดจำและตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมโดยการปล่อยแกรนูล (degranulations) และจับกับสิ่งแปลกปลอม (Johansson and Soderhall, 1989; Soderhall and Cerenius, 1992) รวมถึงชักนำให้เกิดขบวนการเอนแคปซูเลชัน (Persson *et al.*, 1987) และกระบวนการฟาโกซัยโตซิส (Hose and Martin, 1989) สำหรับหน้าที่หลักของเซมิแกรนูลาร์ ฮีโมไซท์ในกุ้ง คือจะจับกับสารพอลิแซ็กคาไรด์ของจุลินทรีย์ เช่น สารไลโปพอลิแซ็กคาไรด์ (lipopolysacharide, LPS) และ เบตา-1,3 กลูแคน (β-1,3-glucan) (Smith and Soderhall, 1983; Johansson and Soderhall, 1985; Soderhall and Cerenius, 1992) และมีการหลั่งสารต่างๆ ออกมา เช่นระบบโปรฟีนอลออกซิเดส (Smith and Soderhall, 1983; Soderhall and Cerenius, 1998)

3) แกรนูลโลไซท์ (granulocyte) เป็นเม็ดเลือดที่มีแกรนูลขนาดใหญ่ บางครั้งเรียกว่าลาร์จแกรนูลาร์ ฮีโมไซท์ (large granular haemocyte) มีรูปร่างหลายแบบ มีเอนไซม์แอซิด ฟอสฟาเตสน้อยกว่าที่มีในเซมิแกรนูลาร์ ฮีโมไซท์ ส่วนเอสเทอเรส และ เบตา-กลูโคโรนิเดส มีปริมาณที่เท่ากัน (Hose and Martin, 1989) และทำหน้าที่เป็นตัวหลักในระบบโปรฟีนอลออกซิเดส โดยเกี่ยวข้องกับโปรตีน 2 ชนิด คือ โปรตีนที่มีขนาด 76 กิโลดาลตัน (76 kDa factor) (Johansson and Soderhall, 1989) และ β-1,3-glucan binidng protein (Duvic and Soderhall, 1989) ซึ่งจะถูกกระตุ้นโดยเบตา-1,3 กลูแคน (Smith and Soderhall, 1983; Vargas-Albores *et al.*, 1997) ลักษณะและหน้าที่ของเม็ดเลือดแสดงไว้ในตารางที่ 7 และ ตารางที่ 8

ถึงแม้ว่าในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง จะไม่มีกระบวนการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมแบบจำเพาะหรือแบบอิมโมโนโกลบลูลิน (immunoglobulins) เหมือนในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง (Smith and Soderhall, 1983; Vargas-Albores and Yepiz-Plascencia, 2000) แต่สามารถจดจำและทำลายจุลินทรีย์หรือพาราไซต์ที่ผ่านเข้ามาในเซลล์ได้ โดยจะมีโปรตีนบางชนิดสามารถจดจำสาร

ตารางที่ 7 หน้าที่หลักของเม็ดเลือดที่ใช้เป็นเกณฑ์ในการจำแนกชนิด

หน้าที่/ชนิด	อะแกรนูโลไซท์	เซมิแกรนูลาร์ ฮีโมไซท์	แกรนูลโลไซท์
ฟาโกไซโตซิส	+	จำกัด	-
เอนแคปซูเลชัน	-	+	จำกัด
ไซโตทอกซิคซิตี้	ไม่มีข้อมูล	+	+
โปรฟีนอลออกซิเดส	-	+	+

ที่มา : Soderhall and Cerenius, 1992

หมายเหตุ : + เกิดปฏิกริยาได้

- เกิดปฏิกริยาไม่ได้

จำกัด เกิดปฏิกริยาได้อย่างจำกัด

ตารางที่ 8 แสดงลักษณะ สมบัติ และหน้าที่ของเซลล์เม็ดเลือดแต่ละชนิด

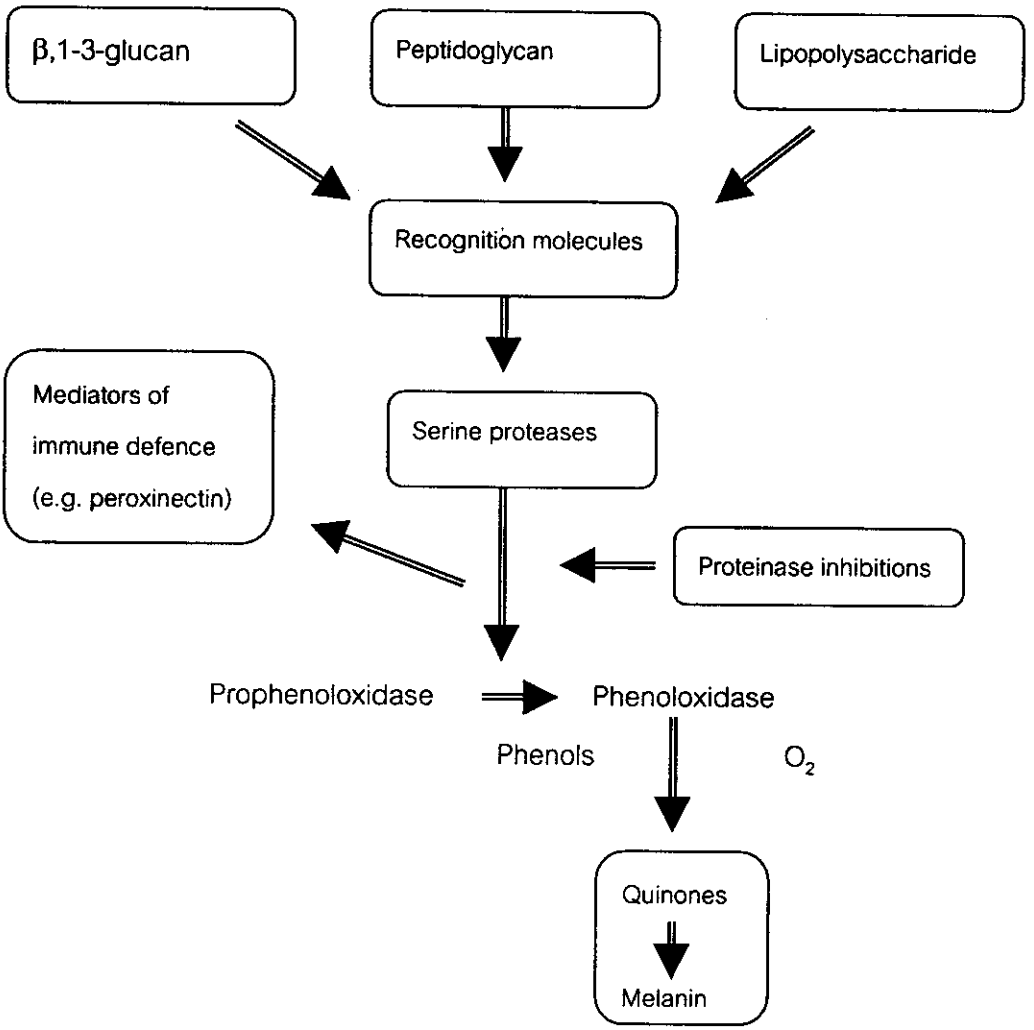
ชนิด	สมบัติ
แกรนูโลไซท์	ไม่มีแกรนูล หรือมีจำนวนน้อย มีนิวเคลียสในไซโตพลาสซึมจำนวนมาก,ไรโบโซมแบบขรุขระ, ไรโบโซมแบบอิสระ และ ไมโตคอนเดรีย เป็นจุดเริ่มต้นของการเกิดตกตะกอน เกิดกระบวนการฟาโกซัยโตซิส
เซมิแกรนูลาร์	มีแกรนูลขนาดเล็กในไซโตพลาสซึม, มีเอนไซม์หลายชนิด และเป็นต้นกำเนิดของระบบโปรฟีนอลออกซิเดสรวมถึงชักนำให้เกิดการจำสิ่งแปลกปลอม,กระบวนการไซโตทอกซิคซิตี้,กระบวนการเอนแคปซูเลชันและกระบวนการฟาโกซัยโตซิส
แกรนูลโลไซท์	มีแกรนูลในไซโตพลาสซึมมาก มีเอนไซม์บางชนิดน้อยกว่าเซมิแกรนูลาร์ฮีโมไซท์ เกิดกระบวนการไซโตทอกซิคซิตี้ และสามารถเกิดระบบโปรฟีนอลออกซิเดสได้มากกว่า

ที่มา: Hose และ Martin (1989), ดัดแปลงจาก Johansson และคณะ (2000)

ประกอบที่อยู่ในผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ (cell wall) (Ashida, *et al.*, 1983; Rowley and Rahmet-alla, 1990) ไลโปโพลีแซ็กคาร์ไรด์ และ เบตา 1,3 กลูแคน (Smith and Soderhall, 1983; Johansson and Soderhall, 1985; Vargas-Albores *et al.*, 1997) โปรตีนชนิดนี้จะไม่สามารถทำลายสิ่งแปลกปลอมได้เอง แต่จะกระตุ้นให้เกิดกระบวนการอื่นๆเช่น ฟาโกซัยโตซิส (Ratcliffe *et al.*, 1985 อ้างโดย Vargas-Albores and Yepiz-Plascencia, 2000) และระบบกระตุ้นโปรฟีนอลออกซิเดส (Soderhall *et al.*, 1990)

6.2 ระบบกระตุ้นโปรฟีนอลออกซิเดส (Prophenoloxidase activating system, proPO system)

เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase, PO) (E.C. 1.14.18.1) ที่พบในน้ำเลือด (haemolymp) จะอยู่ในรูปโปรเอนไซม์ เรียกว่า proPO (Soderhall and Unestam, 1979) และเปลี่ยนเป็น phenoloxidase (PO) ได้ ต้องอาศัยกระบวนการที่เรียกว่า ระบบกระตุ้นโปรฟีนอลออกซิเดส เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสมีหน้าที่ในการเกิดเอนแคปซูเลชัน และกระบวนการสร้างเมลานิน ดังแสดงในภาพที่ 2 (Soderhall and Cerenius, 1998) สารกระตุ้นจะไปจับกับโปรตีนที่มีหน้าที่ในการจดจำสิ่งแปลกปลอมเช่น beta-glucan binding protein และ lipopolysacharide binding protein เกิดเป็นสารเชิงซ้อนที่สามารถกระตุ้นให้เม็ดเลือดหลั่งสารต่างๆออกมา เช่น ระบบโปรฟีนอลออกซิเดส และระบบเอนไซม์ที่กระตุ้นระบบโปรฟีนอลออกซิเดส (Knaap, 1993 อ้างโดย สาวิตร ศิลาเกษ, 2541) โดยเอนไซม์ที่หลั่งออกมาคือซีรีนโปรติเอส (serine proteinase) มีหน้าที่ในการย่อยเอนไซม์โปรฟีนอลออกซิเดสให้เป็นเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส หลังจากนั้นเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส จะเกิดปฏิกริยาการเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซี (hydroxylation) กับ ฟีนอล และปฏิกริยาออกซิเดชัน กับ โอ-ฟีนอล (o-phenol) ผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ ควิโนน (quinones) (Soderhall and Cerenius,1998; Johansson and Soderhall, 1989; Ashida and Yamazaki, 1990) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการสร้างเมลานิน (Ashida *et al.*, 1983; Duvic and Soderhall, 1989, Hernandez-Lopez *et al.*, 1996, Gollas-Galvan *et al.*, 1997) สารเมลานินที่ถูกสร้างขึ้นจะสังเกตุเห็นเป็นจุดสีดำหรือเรียกว่าเมลาโนซิส (melanosis) บริเวณที่เกิดเอนแคปซูเลชัน, โนดูลฟอร์เมชัน หรือบริเวณผิวชั้นนอก (cuticle) ที่มีการติดเชื้อรา (Ashida *et al.*, 1983; Ferrer *et al.*, 1989; Vargas-Albores and Yepiz-Plascencia, 2000)



ภาพที่ 2 การกระตุ้นระบบโปรฟีนอลออกซิเดสในแมลง

ที่มา : Soderhall และ Cerenius, 1998

โดยทั่วไปโปรตีนที่ทำหน้าที่จดจำสิ่งแปลกปลอม (recognition protein) จะพบในพลาสมาหรือบริเวณผิวเซลล์ ก่อนที่จะมีการบุกรุกของสิ่งแปลกปลอม แต่ Kang และคณะ (1998) รายงานว่าพบโปรตีนที่จดจำเปปติโดกลัยแคน (peptidoglycan recognition protein) ในผีเสื้อกลางคืน (*Trichoplusia ni*) หลังจากติดเชื้อแบคทีเรีย Vargas-Albores(1995) รายงานว่า lipopolysac charide-binding agglutinin ที่พบในกุ้งมีขนาด 180-kDa มีตำแหน่งจำเพาะหลายตำแหน่งที่สามารถจับกับสิ่งแปลกปลอมได้ (multivalent carbohydrate-binding agglutinin) ซึ่งนอกจากจะทำให้เกิดแอกกลูติเนชันของแบคทีเรียแล้ว ยังช่วยเพิ่มอัตราการเกิดฟาโกซัยโตซิสอีกด้วย ส่วนโปรตีนอีกชนิดที่จดจำสิ่งแปลกปลอมและสามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองได้คือ beta-glucan binding protein (BGBP) มีตำแหน่งจำเพาะเพียงตำแหน่งเดียว (monovalent) จึงไม่สามารถชักนำให้เกิดแอกกลูติเนชันของแบคทีเรีย แต่กระตุ้นให้เกิดระบบโปรฟีนอลออกซิเดส (Duvic and Soderhall, 1989)

6.3 Beta-glucan binding protein (BGBP)

BGBP เป็นส่วนประกอบของระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์พวกขาปล้อง สามารถแยกได้จากแมลง 2 ชนิด คือ *Blaerus craniifer* (Soderhall *et al.*, 1988 อ้างโดย Vargas-Albores and Yepiz-Plascencia, 2000) และ *Bombyx mori* (Ochiai and Ashida, 1988 อ้างโดย Vargas-Albores and Yepiz-Plascencia, 2000), จากกุ้งขาเหลือง (*Penaeus californiensis*) (Vargas-Albores *et al.*, 1996), กุ้งขาว (*Penaeus vannamei*) (Vargas-Albores *et al.*, 1997) และกุ้งสีน้ำเงิน (*Penaeus stylirostris*) (Vargas-Albores and Soderhall, 1999) BGBP ที่พบในครัสเตเซียนจะมีขนาดใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 9)

7. **สารกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน** (Immunostimulant)

สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน เป็นสารที่ทำให้สิ่งมีชีวิตมีความต้านทานโรคสูงขึ้น แต่จะมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเท่านั้น (Sakai, 1999) ซึ่งสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่นิยมใช้ในกุ้งและปลามีดังนี้ กลูแคน , แลคโตเฟอริน (lactoferin), ไคติน (chitin) และ ลีวามิโซน (levamisole) นอกจากนี้สารกระตุ้นการเจริญ (growth hormone), วิตามินอีและซี (ตารางที่11) ก็มีรายงานว่าใช้เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ โดยจะกระตุ้นกระบวนการฟาโกซัยโตซิส และ bactericidal activity

ตารางที่ 9 Beta-glucan binding protein ที่พบในแมลงและครัสเตเซียน

ชนิด	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	เอกสารอ้างอิง
Blaberus craniifer	91	(Soderhall *et al.*, 1988)
Bombyx mori	62	(Ochiai and Ashida, 1988)
Pacifastacus leniusculus	100	(Duvic and Soderhall, 1990; Cerenius *et al.*, 1994)
Astacus astacus	95-105	(Duvic and Soderhall, 1993)
Procambarus clarkii	100	(Duvic and Soderhall, 1993)
Calinectes maenas	110	(Thornqvist *et al.*, 1994)
Penaeus californiensis	100	(Vargas-Albores *et al.*, 1996)
Penaeus vannamei	100	(Vargas-Albores *et al.*, 1997)
Penaeus stylirostris	100	(Vargas-Albores *et al.*, 1997)

ที่มา: Vargas-Albores และ Yepiz-Plascencia (2000)

ตารางที่ 10 สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่ใช้ในปลาและกุ้ง

Biological substance					
Bacterial derivative /Bacaterial cell	Polysaccharides	Animal and plant extract	Nutritional factors	Hormone, cytokine and other	Synthetic chemical
β-glucan	Chitin	Ete (Tunicate)	Vitamin C	Lactoferrin	Levamisole
peptidoglycan*	Chitosan	Hde(Abalone)	Vitamin E	Interferon	FK-565
FCS	Lentinan	Firefly aquid		Growth hormone	MDP
Lipopolysaccharide	Schizophyllan	Quillaja saponin (soap tree)		Prolactin	
C. butyricum cells	Oligosaccharide	Glycyrrhizin (licorice)			
A. stenohalis cells					
V. anguillarum cells (vaccine)					

ที่มา : ดัดแปลงจาก Sakai (1999)

C = *Clostridium*, A=*Achromobacterium*, V=*Vibrio*, FCS= Freund' s complete adjuvant, FK –565=(hepatanoyl-y-D-glutamyl-(L)-meso-diaminopimelyl-(D)-alanine), MDP=Muramyl dipeptide

7.1 กลูแคน

กลูแคนที่ได้มีการนำมาใช้เพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันมีหลายชนิดเช่น ยีสต์กลูแคน เปปไทด์-กลูแคน และเบตา-1,3-กลูแคน เป็นต้น โดยสามารถกระตุ้นระบบโปรฟีนอลออกซิเดสในหนอนไหม (silkworm, *Bombyx mori*) ได้ (Ashida *et al.*,1983) มลฤดี สิทธิพันธุ์ และคณะ (2543) ทดลองใช้กลูแคนจากผนังเซลล์ของยีสต์ผสมในอาหารสำหรับเลี้ยงกุ้งกุลาดำพบว่าสามารถกระตุ้นให้ระบบภูมิคุ้มกันสูงขึ้น Cerenius และคณะ (1991) รายงานว่า *Psorospemium haeckeli* ซึ่งเป็นพาราไซต์ของกุ้งน้ำจืด crayfish (*Astacus astacus*) สามารถกระตุ้นระบบโปรฟีนอลออกซิเดสของเม็ดเลือดได้ Jorgensen และคณะ (1993) พบว่าเบตา-1,3-กลูแคน จะช่วยกระตุ้นการเกิด bactericidal activity ในปลาเรนโบว์เทราต์ นอกจากนี้ Itami และคณะ (1993) รายงานว่าเมื่อให้สารเปปติโดกลัยแคนแก่กุ้งคุรุม่า (*Penaeus japonicus*) สามารถกระตุ้นให้เม็ดเลือดเกิดกระบวนการฟาโกซัยโตซิสได้มากขึ้นและกุ้งทนต่อโรคได้ดีขึ้นอีกด้วย เมื่อแช่ตัวอ่อนของกุ้งกุลาดำในสารเบตา-1,3-กลูแคน นาน 3 ชั่วโมง จะลดอัตราการตายจากเชื้อ *Vibrio vulnificus* ได้ โดยเบตา-1,3-กลูแคนจะช่วยกระตุ้นระบบโปรฟีนอลออกซิเดสของเม็ดเลือดกุ้ง (Sung *et al.*, 1994) Yen-Ling และ Yen-Ling (1994) ทดลองใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันหลายชนิดในการทดสอบความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดซุปเปอร์ออกไซด์แอนอิออน (O_2^-) ในกุ้งพบว่าเบตา-1,3-กลูแคนสามารถกระตุ้นได้ดีกว่าสารอื่นๆ Itami และคณะ (1998) รายงานว่าเมื่อให้สารเปปติโดกลัยแคนจาก *Bifidobacterium thermophilum* แก่กุ้งคุรุม่า โดยวิธีการกินพบว่าสามารถกระตุ้นให้เม็ดเลือดเกิดกระบวนการฟาโกซัยโตซิสได้มากขึ้น และเมื่อฉีดเบตา-1,3-กลูแคนที่ได้จากผนังเซลล์ของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เข้าสู่ตัวกุ้งกุลาดำ พบว่าสามารถป้องกันการติดเชื้อตัวแดงดวงขาว (white spot syndrome associated virus, WSSV) (Chih-Cheng and Yen-ling, 1999) และลดอัตราการตายจากเชื้อ *Vibrio alginolyticus* ได้ (Teunissen *et al., 1998*)

7.2 ไลโปโพลีแซคคาร์ไรด์

ไลโปโพลีแซคคาร์ไรด์ เป็นสารประกอบที่พบในผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ (Sakai ,1999) สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ Goldenberg และคณะ (1984) และ Salati และคณะ (1987 อ้างโดย Sakai, 1999) พบว่า LPS สามารถกระตุ้นให้เม็ดเลือดของกุ้งมังกร (Lobter) และ ปลากะพงแดง (red sea bream) มีกระบวนการฟาโกซัยโตซิสได้ดีขึ้น Itami และคณะ (1989) รายงานว่าเมื่อให้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดที่เป็น formalin-killed vibrio bactericin สามารถลดอัตราการตายจากการติดเชื้อวิบริโอในกุ้งคุรุม่าได้ Norqvist และคณะ (1989 อ้างโดย Sakai, 1999) รายงาน

ว่าเมื่อให้วัคซีนจากเชื้อ *V. anguillarum* แบบตัวเป็นอ่อนฤทธิ์ (attenuated) สามารถลดการติดเชื้อ *Aeromonas salmonicida* ในปลาเรนโบว์เทราต์ ได้

7.3 คาร์โรทินอยด์ (carotenoid)

คาร์โรทินอยด์เป็นสารสีที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติทั้งในพืช สัตว์ สาหร่ายและแบคทีเรียโดยเฉพาะแบคทีเรียสังเคราะห์แสงพบว่ามีถึง 78 ชนิด (Straub, 1971 อ้างโดยOkimasu *et al.*, 1992) โดยชนิดที่พบในแบคทีเรียสังเคราะห์แสง (*Rhodobacter capsulatus*) จะเป็นชนิดแซนโทฟิลด์ (xanthophyll) และ เบตา-คาร์โรทีน (β-carotene) (Okimasu *et al.*, 1992) คาร์โรทินอยด์สามารถละลายได้ในไขมัน และเป็นแหล่งของวิตามินเอ (retinol) ปัจจุบันมีการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมหลายชนิดเช่นอุตสาหกรรมยา อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องสำอาง เป็นต้น (Latscha, 1991) คาร์โรทินอยด์ที่พบในสัตว์น้ำโดยเฉพาะในปลาและกุ้งจะประกอบด้วยคาร์บอน 40 ตัว (C_{40}) มีหน้าที่หลายอย่างเช่น เป็นแหล่งรวมพลังงานแสง เป็นตัวรับอิเล็กตรอน ช่วยย่อยสลายคอเลสเตอรอล ป้องกันมะเร็ง และที่สำคัญสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ (Latscha, 1990 อ้างโดย Latscha, 1991) การที่คาร์โรทินอยด์สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้หลายด้านจึงมีผู้สนใจนำมาประยุกต์กับการเลี้ยงสัตว์น้ำ แต่คาร์โรทินอยด์ที่พบในธรรมชาติมีหลายรูปแบบ การที่สัตว์น้ำจะนำไปใช้ได้หรือไม่นั้นขึ้นลักษณะโครงสร้างของสารสีนั้น No และ Storebakken (1992) รายงานว่าปลาเรนโบว์เทราต์ *Oncorhynchus mykiss* ที่กินอาหารผสมแอสตาแซนทีนจะให้เนื้อปลาที่มีสีแดงกว่ากลุ่มที่กินแคนตาแซนทีน (canthaxanthine) เพราะปลาจะเปลี่ยนแอสตาแซนทีนเป็นวิตามินเอได้ง่ายกว่าแคนตาแซนทีน นอกจากนี้ยังใช้เพื่อการเร่งสีในปลาและกุ้งทำให้เป็นที่ต้องการของผู้บริโภคมากขึ้น ซึ่งในประเทศญี่ปุ่นสีของสัตว์น้ำจะเป็นบ่งชี้ถึงความมีคุณภาพและใช้กำหนดราคาของสัตว์น้ำ (Chien and Jeng,1992) โดยกุ้งกุลาดำที่ได้สารคาร์โรทินอยด์จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินหรือเรียกว่า blue shrimp disease และเมื่อนำมาปรุงอาหารจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อนหรือสีส้ม (Latscha, 1991) สอดคล้องกับรายงานของมะลิ บุณยรัตผลิน และคณะ (2543) พบว่ากุ้งกุลาดำที่กินอาหารผสมแอสตาแซนทีน เมื่อนำมาต้ม นาน 5 นาทีจะมีสีแดงเข้มกว่ากุ้งที่กินอาหารปกติ และนอกจากนี้แอสตาแซนทีนยังช่วยส่งเสริมให้ปลาเรนโบว์เทราต์มีระบบภูมิคุ้มกันที่สูงขึ้นด้วย (Thomson *et al.*, 1995)

สำหรับวิธีการให้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันแก่สัตว์น้ำมีหลายวิธี เช่น การฉีด (injection) การแช่ (immersion) และการกิน (oral) (Sakai, 1999) โดย Itami และคณะ (1989) รายงานว่าเมื่อให้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดที่เป็น formalin-killed vibrio bactericin โดยวิธีการฉีดและการแช่ พบว่า

สามารถลดอัตราการตายจากการติดเชื้อวิบริโอในกุ้งคุรุม่าได้ และเมื่อให้วัคซีนที่ผลิตจาก *Vibrio harveyi* แก่กุ้งกุลาดำโดยวิธีการฉีด พบว่ากุ้งสามารถทนต่อเชื้อเรืองแสง (*V. harveyi*) ได้ดีกว่าวิธีกินและวิธีการแช่ (สาวิตรี ศิลาเกษ, 2541) กิจการ ศุภมาตย์ และ สิทธิ บุณยรัตผลิน (2538) ได้ให้วัคซีนที่ผลิตจาก *Vibrio sp.* แก่กุ้งกุลาดำโดยวิธีการแช่ พบว่าหลังจากแช่วัคซีนนาน 10 วัน ค่าความว่องไวในการจับกินสิ่งแปลกปลอมมีค่าสูงขึ้นเพียงเล็กน้อย และไม่มีความต้านทานต่อโรคไวรัสหัวเหลือง (yellow head virus)

วัตถุประสงค์

1. คัดเลือกแบคทีเรียสังเคราะห์แสง เพื่อใช้เป็นโปรไบโอติกแบคทีเรีย
2. ศึกษาผลของอาหารและสภาวะแวดล้อมต่อการเจริญและคุณภาพเซลล์แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ที่คัดเลือก
3. ศึกษาผลของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ที่คัดเลือกต่อการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคเรืองแสงในกุ้งกุลาดำ ผลต่อระบบภูมิคุ้มกันและสีของกุ้งกุลาดำ

ขอบเขตการวิจัย

แยกและคัดเลือกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่มีสมบัติเป็นโปรไบโอติกจากธรรมชาติ นำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ มาศึกษาการเจริญและสมบัติของเซลล์ ศึกษาผลของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงเมื่อเติมในอาหารเพื่อศึกษาผลต่อระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้แบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่มีสมบัติเหมาะสมต่ออุตสาหกรรมการผลิตโปรไบโอติกแบคทีเรียและเหมาะต่อการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ