บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การใช้เทคนิค Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) เพื่อศึกษากลุ่มจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของกุ้งขาว (*Penaeus vannamei*)

ทำการศึกษาวิธีการเตรียมลำไส้ของกุ้งขาวที่เหมาะสมจากการเปรียบเทียบการใช้น้ำยารักษาสภาพ 3 ชนิดคือ น้ำยาฟอร์มาลิน 10 เปอร์เซ็นต์, น้ำยาเดวิดสัน (Davidson's fixative; 33% of 95% ethanol, 22% of 100% formalin and 11.5% glacial acetic acid in distilled water) (Humason, 1972) และน้ำยา RNA friendly fixative (40.7% of 95% ethanol, 34.9% of 100% formalin and 2.2% NH_4OH in distilled water) (Hasson *et al.*, 1997) เพื่อศึกษากลุ่มจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของกุ้งขาว (*Penaeus vannamei*) ด้วยเทคนิค FISH

จากผลการทดลองพบว่าการประสบความสำเร็จในการตรวจสอบแบคทีเรียด้วยเทคนิค FISH โดยการบดลำไส้และการตัดเนื้อเยื่อลำไส้ของกุ้งขาว ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยที่สำคัญคือน้ำยารักษาสภาพและอุณหภูมิที่มีความเหมาะสมในการเก็บรักษาตัวอย่างลำไส้ ที่จะทำให้เนื้อเยื่อลำไส้ของกุ้งขาวมีโครงสร้างของเนื้อเยื่อบุผิวลำไส้ที่สมบูรณ์ คงสภาพได้ดีและรักษาเป้าหมายของโพรบคือ 16S rRNA ภายในเซลล์แบคทีเรียไว้ไม่ให้ถูกทำลาย แบคทีเรียที่มีอยู่ในลำไส้ของกุ้งขาวที่ตรวจพบมักเกาะรวมกันเป็นกลุ่มอยู่กับก้อนของอาหาร ทั้งยังมีปริมาณที่หนาแน่น บางส่วนก็กระจายอยู่ทั่วไปในบริเวณที่มีอาหาร ซึ่งสอดคล้องกับ Thimm และ Tebbe (2003) ที่ใช้เทคนิค FISH โดยใช้โพรบ EUB338 ที่มีความจำเพาะกับ 16S rRNA ของแบคทีเรีย ศึกษาการเกาะติดของแบคทีเรียที่มีอยู่ในลำไส้และเนื้อเยื่อของ *Folsomia candida* (Collembola) ซึ่งอยู่ในไฟลัมอาร์โทรพอด

จากผลการใช้น้ำยารักษาสภาพสูตรดั้งเดิมที่ใช้ในการเตรียมเนื้อเยื่อกุ้งขาวสำหรับเทคนิค *in situ* hybridization คือ น้ำยาเดวิดสัน (Davidson's fixative) ที่ใช้ศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาโดยทั่วไป พบว่าไม่ประสบความสำเร็จในการตรวจสอบแบคทีเรียด้วยเทคนิค FISH บนเนื้อเยื่อลำไส้กุ้งขาว เนื่องจากน้ำยาดังกล่าวมีความเป็นกรดสูง (ค่าความเป็นกรด-ด่าง ประมาณ 3.5-4.0) มีผลให้อาร์เอ็นเอสลายได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งหากมีการเก็บตัวอย่างไว้เป็นเวลานานๆ (Hasson *et al.*, 1997) เช่นเดียวกันกับการทดลองด้วยน้ำยาที่มีการปรับให้เหมาะสมต่อการรักษา RNA ในตัวอย่าง

ไว้คือ RNA friendly fixative ซึ่งมีค่าความเป็นกรด-ด่าง ประมาณ 6.0-7.0 ก็พบว่าน้ำยา RNA friendly fixative ไม่สามารถช่วยให้ตรวจสอบแบคทีเรียบนเนื้อเยื่อลำไส้กุ้งขาวด้วยเทคนิค FISH ได้เช่นกัน ทั้งนี้สาเหตุอาจจะเนื่องมาจากความเข้มข้นของฟอร์มาลินในน้ำยา RNA friendly fixative สูงเกินไปคือ มีฟอร์มาลินเป็นส่วนประกอบถึง 34.9 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่น้ำยาเดวิดสัน (Davidson's fixative) มีฟอร์มาลิน 22 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจากผลการทำเทคนิค FISH กับเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ระดับความเข้มข้นของฟอร์มาลินแตกต่างกันพบว่า หากเพิ่มความเข้มข้นของฟอร์มาลินมากเกิน 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นต้นไป จะทำให้สัดส่วนของจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่เรืองแสงลดลง โดยที่ยังมองเห็นเซลล์เหล่านั้นอยู่แต่เซลล์ไม่มีการเรืองแสง (ผลการทดลองไม่ได้แสดง) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าฟอร์มาลินที่มีความเข้มข้นสูงอาจจะทำลายเป้าหมายของโพรบได้ แต่ในขณะเดียวกัน หากลดความเข้มข้นของฟอร์มาลินต่ำเกินไป เมื่อนำไปรักษาสภาพเนื้อเยื่อกุ้งก็จะทำให้เนื้อเยื่อกุ้งเปื่อยยุ่ย ไม่สามารถคงสภาพได้ ดังนั้นการใช้น้ำยารักษาสภาพเป็นฟอร์มาลิน 10 เปอร์เซ็นต์นั้น พบว่ามีความเหมาะสมที่จะรักษาสภาพเนื้อเยื่อกุ้งให้คงสภาพได้ดี และรักษาเป้าหมายสำหรับโพรบที่จะเข้าไปจับในเซลล์ของแบคทีเรียคือ 16S rRNA เอาไว้ได้ ดังนั้นการเลือกน้ำยาสำหรับรักษาสภาพตัวอย่างจึงมีความสำคัญเป็นลำดับแรก ซึ่งต้องมีความเหมาะสมที่จะรักษาสภาพทั้งเนื้อเยื่อกุ้งและเป้าหมายของโพรบซึ่งก็คือ อาร์เอ็นเอในเซลล์แบคทีเรียด้วย

นอกจากนี้การเลือกใช้โพรบที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง fluorescein (excitation wavelength = 492 nm, emission wavelength = 528 nm) พบว่าสามารถช่วยลดการเกิด autofluorescence ของตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ตรวจสอบด้วยเทคนิค FISH ได้ดี หากใช้โพรบที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงในกลุ่มของ rhodamine (excitation wavelength = 557 nm, emission wavelength = 576 nm) หรือ Cy3 (excitation wavelength = 550 nm, emission wavelength = 570 nm) (Moter and Gobel, 2000) จะทำให้เกิดการ autofluorescence ขึ้นได้มาก เนื่องจากช่วงความยาวคลื่นที่ใช้ในการกระตุ้นทั้ง Cy3 และ rhodamine อาจจะไปช่วยกระตุ้นให้วัตถุต่างๆ เช่น เศษอาหารในลำไส้ของกุ้งเกิด autofluorescence ดังนั้นจึงควรเลือกชนิดของสารเรืองแสงให้เหมาะสมกับตัวอย่างที่จะทำการตรวจสอบ

นอกจากนี้แล้วการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่า เมื่อนำตัวอย่างที่ตัดเนื้อเยื่อด้วยความหนาประมาณ 3-5 ไมครอน ไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ epifluorescence ทำให้หาจุดโฟกัสของตัวอย่างได้ค่อนข้างยาก ซึ่งอาจเป็นข้อจำกัดของกล้อง epifluorescence แบบธรรมดาที่ไม่สามารถตรวจสอบตัวอย่างที่มีความหนาได้ ปัญหาดังกล่าวนี้สามารถแก้ไขได้โดยการใช้กล้องจุลทรรศน์ที่มีความสามารถในการตรวจสอบการเรืองแสงของวัตถุที่มีความหนา ซึ่งจะทำให้สามารถตรวจสอบ

การเรืองแสงของตัวอย่างที่มีความหนาระดับความลึกตามที่ต้องการได้ ตัวอย่างเช่น Confocal laser scanning microscope (CLSM) (Trebesius *et al.*, 2000)

จากผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าสามารถที่จะนำเอาเทคนิค FISH มาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบแบคทีเรียในลำไส้ของกุ้งขาวได้จากการเลือกใช้น้ำยารักษาสภาพและอุณหภูมิที่มีความเหมาะสมในการเก็บรักษาตัวอย่างลำไส้ แต่ยังมีข้อจำกัดเรื่องความหนาของตัวอย่างซึ่งสามารถแก้ไขด้วยการใช้กล้องคอนโฟคอล เลเซอร์ สแกนนิง (Confocal laser scanning microscope) ซึ่งจากข้อมูลนี้เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อศึกษาแบคทีเรียต่างๆ ที่สนใจ เช่น แบคทีเรียโปรไบโอติก ซึ่งสามารถติดตามด้วยโพรบที่มีความจำเพาะกับแบคทีเรียที่สนใจในลำไส้ของกุ้งได้

4.2 การคัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรีย

ทำการคัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับของโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ก่อโรคแบคทีเรียในกุ้งขาวคือ *V. haveyi* และ *V. parahaemolyticus* และยับยั้งการเจริญของ *V. haveyi* เมื่อนำมาเลี้ยงร่วมกัน (co-culture) เพื่อนำไปเลี้ยงกุ้งขาวต่อไป

จากผลการนำเชื้อ *Lactobacillus* spp. และ *Bacillus* spp. จำนวน 8 ชนิดคือ *L. acidophilus* TISTR 1034, *L. brevis* TISTR 855, *L. casei* TISTR 1304, *L. plantarum* TISTR 050, *Bacillus amyloliquefacien* TISTR 1045, *B. subtilis* TISTR 008, *B. coagulan* TISTR 1456 และ *B. licheniformis* ตามลำดับ เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ คือ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 เปอร์เซ็นต์ พบว่า เชื้อทั้ง 8 ชนิดดังกล่าวสามารถทนต่อความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ได้ถึงระดับ 3 เปอร์เซ็นต์ ของอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งจุดประสงค์ของการทดลองนี้คือ หากเชื้อสามารถเจริญบนอาหารที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าเชื้อสามารถเจริญในน้ำทะเลที่มีความเค็ม 15 ส่วนในพัน (ppt) ได้ ซึ่งในการทดลองเลี้ยงกุ้งขาวใช้น้ำทะเลที่มีความเค็ม 15 ส่วนในพัน (ppt)

จากผลการทดสอบโดยใช้วิธี agar well diffusion ดัดแปลงจาก Schillinger และ Lucke (1989) พบว่า *L. plantarum* สามารถยับยั้ง *V. harveyi* และ *V. parahaemolyticus* ได้ดีที่สุด ซึ่งจากการทดลองพบว่า *L. plantarum* สามารถยับยั้ง *V. harveyi* โดยมีความกว้างของ clear zone และกิจกรรมการยับยั้ง (Arbitary Unit) สูงที่สุด คือ 12.50 $\pm$ 0.50 มิลลิเมตร และ 50.00 $\pm$ 0.00 AU/ml ตามลำดับ และสามารถยับยั้งเชื้อ *V. parahaemolyticus* โดยมีความกว้างของ clear zone และกิจกรรมการยับยั้ง (Arbitary Unit) สูงที่สุด คือ 12.83 $\pm$ 0.29 มิลลิเมตร และ 55.53 $\pm$ 9.58 AU/ml

ตามลำดับ ซึ่งจากผลการทดลองมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) สอดคล้องกับการรายงานของ Mahasawasde และคณะ (2003) ได้ศึกษาถึงประสิทธิภาพของ *Lactobacillus* spp. ในการยับยั้งการเจริญของ *V. harveyi* ซึ่งก่อให้เกิดโรคเรืองแสงในกุ้งกุลาดำ พบว่าเฉพาะส่วนของเหลวที่ผ่านเยื่อกรอง (filtrate) ของ *Lactobacillus* spp. เท่านั้นที่สามารถยับยั้ง *V. harveyi* ได้ดีที่สุด และประสิทธิภาพของ *L. plantarum* มีผลในการยับยั้ง *V. parahaemolyticus* ได้ดีที่สุด

จากผลการทดสอบโดยใช้วิธีเลี้ยงเชื้อร่วมกัน (co-culture) ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของสุภฎา คีรีรัฐนิคมและคณะ (2543) โดยการนำเชื้อ *L. plantarum* ระดับความเข้มข้น 10^2, 10^3 และ 10^4 CFU/ml ตามลำดับ เลี้ยงร่วมกับเชื้อ *V. harveyi* 10^3 CFU/ml พบว่า *L. plantarum* ระดับความเข้มข้น 10^4 CFU/ml มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *V. harveyi* ระดับความเข้มข้น 10^3 CFU/ml ได้ ส่วนเชื้อ *L. plantarum* ระดับความเข้มข้น 10^2 และ 10^3 CFU/ml ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *V. harveyi* ระดับความเข้มข้น 10^3 CFU/ml ได้ ซึ่งมีแนวโน้มที่คล้ายคลึงกันกับการรายงานของ Vaseeharan และ Ramasamy (2003) ศึกษาถึงประสิทธิภาพของ *B. subtilis* BT23 ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในกุ้งคือ *V. harveyi* ทั้งในห้องทดลอง (*in vitro*) และในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) พบว่า *B. subtilis* BT23 สามารถควบคุมการเจริญเติบโตของ *V. harveyi* ได้ด้วยการทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion, วิธี co-culture และการทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค (challenge test) จากเชื้อ *V. harveyi* เช่นกัน และได้มีรายงานการทดลองเกี่ยวกับการนำสารที่ผลิตจาก *L. plantarum* มาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารต่างๆ ได้แก่ Anderssen และคณะ (1998) ได้ทดสอบกิจกรรมการยับยั้งของเชื้อ *L. plantarum* C11 ที่ผลิตสารเปปไทด์แบคเทอริโอซิน 6 ชนิด คือ plantaricin A, E, F, J, K และ N ซึ่งจากการทดลองพบว่า เมื่อนำ plantaricin E กับ F และ J กับ K มารวมกันในอัตราส่วน 1:1 แล้วนำไปทดสอบกิจกรรมการยับยั้งต่อเชื้อทดสอบชนิดต่างๆ เช่น *L. casei* NCDO 2713, *Pediococcus pentosaceus* NCDO 390 และ *Carnobacterium piscicola* U 149 ซึ่งพบว่าสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ แต่ plantaricin N ไม่สามารถยับยั้งเชื้อดังที่กล่าวมาแล้วได้ จากการรายงานของ Van Reenen และคณะ (1998) ได้แยก *L. plantarum* 423 จาก Sorghum beer สามารถผลิตแบคเทอริโอซิน ชนิด plantaricin 423 ซึ่งสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียและเชื้อก่อโรค ได้แก่ *Bacillus cereus*, *Clostridium spongenes*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria* spp. และ *Staphylococcus* spp. และได้กล่าวถึงคุณลักษณะของ plantaricin 423 คือ สามารถคงสภาพที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส แต่สูญเสียกิจกรรม 50 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที และ 75 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที อยู่ในช่วง pH 1.0 ถึง 10.0 สูญเสียกิจกรรมเมื่อมี pepsin, papain, α-chymotrypsin, trypsin และ proteinase K และมีขนาดประมาณ

3-5 kDa เป็นต้น Ogunbanwo และคณะ (2003) ได้ทดลองแยก *L. plantarum* F1 และ *L. brevis* OG1 จากอาหารหมัก Nigerian ซึ่งผลิตสารแบคเทอริโอซินที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรค เชื้อที่ทำให้อาหารเน่าเสีย และแบคทีเรียแลกติกอีกหลายชนิด ได้แก่ *Escherichia coli* NCTC 10418, *Enterococcus faecalis* EF1 แต่ไม่สามารถยับยั้ง *Candida albicans* ATCC 10231 และ *Klebsiella* sp. UCH 15 และได้กล่าวถึงคุณลักษณะของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อทั้ง 2 ชนิด คือ แบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *L. brevis* OG1 สามารถคงสภาพต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที อยู่ในช่วง pH 2.0-8.0 ส่วนแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *L. plantarum* F1 สามารถคงสภาพต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที อยู่ในช่วงเวลา pH 2.0-6.0 สำหรับ mitomycin C และแสง UV ไม่มีผลต่อกิจกรรมของแบคเทอริโอซินทั้ง 2 ชนิด ขณะที่การสกัดด้วย chloroform จะทำลายกิจกรรมแบคเทอริโอซินทั้ง 2 ชนิดนี้ เป็นต้น นอกจากนั้นแล้ว *Lactobacillus* spp. ชนิดอื่นก็สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้เช่นกัน ดังรายงานของ Tahara และคณะ (1996) พบว่า *L. acidophilus* JCM 1132 สามารถผลิตสารแบคเทอริโอซินชนิดหนึ่งที่เรียกว่า acidocin J 1132 ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียชนิดอื่นได้ เช่น *L. brevis*, *L. casei*, *L. fermentum* และ *L. plantarum* ซึ่งได้ทำการทดลองเลี้ยง *L. acidophilus* ในอาหาร MRS broth ที่ปราศจาก meat extract ที่ pH 5.0 และในสภาพที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในถังหมักที่มีการกวนตลอดเวลา ทำการวัดการเจริญเติบโตโดยสังเกตจากความขุ่น (Optical density ที่ 600 nm) ซึ่งจากที่กล่าวมานั้นจะเห็นได้ว่ามีการใช้ประโยชน์จากเชื้อ *Lactobacillus* ซึ่งรวมไปถึง *L. plantarum* ด้วยก็ตาม สำหรับการคัดเลือกโปรไบโอติกที่แยกได้จากทางเดินอาหารของกุ้งโดยตรง บางครั้งอาจได้แบคทีเรียที่ไม่ปลอดภัยต่อการใช้สำหรับมนุษย์ ดังนั้นในการคัดเลือกเชื้อโปรไบโอติกที่ใช้กับมนุษย์ และมีรายงานที่แน่นอนแล้วว่าปลอดภัยต่อมนุษย์นำมาทดลองให้สัตว์น้ำกินน่าจะเป็นอีกแนวทางหนึ่งสำหรับอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งต่อไป

4.3 การประยุกต์ใช้โปรไบโอติกในกุ้งขาวโดยการนำเซลล์สดผสมกับอาหารกุ้งขาว

จากการนำ *L. plantarum* ที่มีความเข้มข้น 10^3, 10^6 และ 10^9 CFU/g ผสมในอาหารกุ้งเพื่อเลี้ยงกุ้งขาว ซึ่งก่อนเริ่มการทดลองเลี้ยงกุ้งขาวได้มีการตรวจสอบปริมาณเชื้อ *L. plantarum* ในอาหารกุ้งขาวด้วยวิธีการนำอาหารกุ้งมาเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหาร MRS agar เป็นเวลา 3 วัน พบว่าปริมาณของเชื้อ *L. plantarum* ยังสามารถคงอยู่ในอาหารกุ้งทดลองในปริมาณเชื้อที่ต้องการทั้ง 3 วัน และติดตาม *L. plantarum* ในลำไส้กุ้งบดด้วยเทคนิค Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) ชั่วโมงที่ 1, 2, 3, 6, 12, 24, 48 และ 72 ตามลำดับ พบว่าสามารถติดตาม *L. plantarum* ได้ถึง

ชั่วโมงที่ 72 ทั้งวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อและวิธี FISH ซึ่งในรายงานก่อนหน้านี้มีการนำเชื้อที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกนำมาประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เช่น กลุ่ม *Bacillus* spp., *Vibrio* spp., *Pseudomonas* spp. และ *Lactobacillus* spp. ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก ซึ่งจุลินทรีย์ที่เป็นโปรไบโอติกส่วนใหญ่ ได้แก่ แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก (lactic acid bacteria) เช่น *Lactobacillus* spp. *Bifidobacterium* spp. และ *Streptococcus* spp. (Smoragiewicz *et al.*, 1993) และ *Carnobacterium* spp. (Gatesoupe, 1994; Joborn *et al.*, 1997) ส่วนใหญ่เป็นการศึกษาในปลา (Gatesoupe, 1994; Nikoskelainen *et al.*, 2001) และหอย (Douillet and Langdon, 1994) ขณะที่การศึกษาในกุ้งยังมีรายงานอยู่น้อย (Rengpipat *et al.*, 1998a; Moriaty, 1998) การนำเชื้อ *L. rhamnosus* (ATCC 53103) ที่แยกได้จากมนุษย์ 10^9 และ 10^{12} CFU/g ผสมในอาหารเลี้ยงปลาเรนโบว์เทราท์ เพื่อป้องกันโรคฟูรันคูโลซิส (furunculosis) ซึ่งเป็นผลมาจากเชื้อ *Aeromonas salmonicida* ซึ่งสามารถลดอัตราการตายของปลาจาก 52.6 เปอร์เซ็นต์ในกลุ่มควบคุมเป็น 18.9 เปอร์เซ็นต์ในกลุ่มที่ใช้เชื้อ 10^9 CFU/g ผสมในอาหาร และ 46.3 เปอร์เซ็นต์ในกลุ่มที่ใช้เชื้อ 10^{12} CFU/g ผสมในอาหาร (Nikoskelainen *et al.*, 2001) Ringo และ Strom (1994) รายงานว่าเชื้อ *Carnobacterium divergens* ที่แยกได้จากลำไส้ของปลาแอตแลนติกแซลมอนสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Vibrio anguillarum* และ *V. salmonicida* ได้ Olsson และคณะ (1998) รายงานว่า *Carnobacterium* sp. สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *V. anguillarum* ในทางเดินอาหารของปลาเทอร์บอต (turbot) จากผลการศึกษาพบว่า *Carnobacterium* spp. ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *V. anguillarum* ได้เมื่อเลี้ยงเชื้อในปริมาณที่เท่ากัน แต่ *Carnobacterium* spp. สามารถยับยั้งการเจริญของ *V. anguillarum* ได้เมื่อมีเชื้อ *Carnobacterium* spp. ปริมาณ 10^6 CFU/ml ขณะที่ *V. anguillarum* มีปริมาณ 10^4 CFU/ml แสดงให้เห็นว่าต้องใช้โปรไบโอติกในอาหารสัตว์น้ำให้มากเพียงพอที่จะทำให้โปรไบโอติกสามารถเจริญ และมีปริมาณมากกว่าเชื้ออื่นๆ ในลำไส้ของสัตว์น้ำ Robertson และคณะ (2000) ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของการประยุกต์ใช้ *Carnobacterium* spp. เพื่อเป็นโปรไบโอติกในอาหารปลาเรนโบว์เทราท์ โดยการเคลือบเม็ดอาหารปลาด้วยเชื้อ *Carnobacterium* spp. ความเข้มข้น 5 x 10^7 CFU/g หลังจากเลี้ยงปลาด้วยอาหารทดลองดังกล่าว เป็นระยะเวลา 28 วัน จึงทดสอบความต้านทานโรคโดยฉีดเชื้อ *Aeromonas hydrophila*, *V. anguillarum*, *V. ordalli* และ *Yersenia ruckeri* ให้แก่ปลา ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า ปลาที่ได้รับอาหารเสริมโปรไบโอติกมีอัตราการรอดตายหลังจากฉีดเชื้อสูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเจน สำหรับการรายงานในกุ้ง เช่น การศึกษาในกุ้งวัยอ่อน (Post larva) ให้โปรไบโอติกผ่านทางอาหารมีชีวิต ดังรายงานของ Rengpipat และคณะ (1998b) ที่ให้กุ้งกุลาดำวัยอ่อน (Post larva) ได้รับโปรไบโอติก *Bacillus* S11 ผ่านทางอาร์ทีเมีย โดยนำอาร์ทีเมียที่เพิ่งฟักตัวใหม่ๆ แช่ในสารละลายโปรไบโอติก *Bacillus* S11

ความเข้มข้น 10^4 CFU/ml นาน 24 ชั่วโมง พบว่าการพัฒนาในแต่ละระยะของกุ้งกุลาดำวัยอ่อน (Post larva) จะใช้เวลาน้อยลง และมีปัญหาเกี่ยวกับโรคต่ำกว่ากุ้งที่ไม่ได้รับโปรไบโอติก วรรณนิภา เพี้ยนภักตร์ (2539) ได้ทดลองเปรียบเทียบการเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่เสริมด้วยโปรไบโอติก *Bacillus* S11 กับไม่ใช้โปรไบโอติก พบว่าการเลี้ยงกุ้งที่เสริมด้วย *Bacillus* S11 ในรูปแบบของการผสมเซลล์ในอาหารกุ้งที่แตกต่างกันคือ เซลล์สด, เซลล์สดในน้ำเกลือ และเซลล์แช่เยือกแข็งแห้ง (lyophilized) ให้ผลที่ไม่แตกต่างกัน แต่ให้ผลแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (ไม่ใช้โปรไบโอติก) นอกจากนี้พบว่า *Bacillus* S11 มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์โปรตีเอส, อะไมเลส และไลเปส แต่ไม่ได้ช่วยปรับปรุงคุณภาพน้ำ จากการตรวจนับแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อจากลำไส้ของกุ้ง (midgut ไปจนถึง hindgut) ในแต่ละการทดลอง พบว่ากลุ่มควบคุมมีเชื้อ *Vibrio* spp. สูงถึง 10^6 CFU/g และพบ *Bacillus* spp. เพียงเล็กน้อยเท่านั้น แต่ในกลุ่มทดลองที่เสริมด้วย *Bacillus* S11 ทั้ง 3 กลุ่มนั้นพบว่ามี *Bacillus* S11 เป็นกลุ่มเด่นประมาณ 10^6-10^7 CFU/g และมี *Vibrio* spp. เพียงเล็กน้อยเท่านั้น

สำหรับการใช้จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกด้วยวิธีการผสมอาหารมีจุดมุ่งหมายเพื่อให้จุลินทรีย์ยึดเกาะเซลล์บุผิวผนังลำไส้ (gastrointestinal epithelium) ของสัตว์น้ำได้ดี ในสัตว์เลือดอุ่น พบว่าแบคทีเรียกลุ่มแลคติกสามารถยึดเกาะกับผนังลำไส้ได้ เนื่องจากเลคติน (lectin) ทำปฏิกิริยากับคาร์โบไฮเดรทบางอย่างที่อยู่บนผิวของเซลล์บุผิวผนังลำไส้ หรือบนผิวเซลล์ของแบคทีเรีย ซึ่งจากการติดตาม *L. plantarum* ในลำไส้กุ้งบดโดยใช้เทคนิค Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) พบว่าชั่วโมงที่ 0, 1, 2, 3, 6, 12, 24, 48 และ 72 ของชุดทดลองที่ 1 (ชุดควบคุม)ไม่พบเชื้อ *L. plantarum* ในระบบทางเดินอาหารของกุ้งขาว ส่วนชุดทดลองที่ 2, 3 และ 4 สามารถนับเชื้อ *L. plantarum* ในระบบทางเดินอาหารของกุ้งขาวหลังจากหยุดให้อาหารที่ผสมโปรไบโอติก (*L. plantarum*) ในชั่วโมงที่ 12, 24, 48 และ 72 ซึ่งปริมาณของเชื้อ *L. plantarum* ที่นับได้ในชุดทดลองที่ 2 อยู่ในช่วง 4.97×10^6 ถึง 1.86×10^7 เซลล์ต่อกรัมลำไส้ของกุ้งขาว, ปริมาณของเชื้อ *L. plantarum* ที่นับได้ในชุดทดลองที่ 3 อยู่ในช่วง 2.88×10^6 ถึง 3.18×10^7 เซลล์ต่อกรัมลำไส้ของกุ้งขาว และปริมาณของเชื้อ *L. plantarum* ที่นับได้ในชุดทดลองที่ 4 อยู่ในช่วง 8.40×10^6 ถึง 1.93×10^7 เซลล์ต่อกรัมลำไส้ของกุ้งขาว ตามลำดับ และได้ยืนยันโดยการติดตาม *L. plantarum* ในเนื้อเยื่อลำไส้กุ้งขาวโดยใช้เทคนิค FISH ตรวจสอบด้วยกล้องอิพิฟลูออเรสเซนซ์ (epifluorescence microscope) ซึ่งจะพบการรวมกลุ่มของเชื้อ *L. plantarum* และบางเซลล์ก็อาจจะกระจายอยู่บนผนังลำไส้ แต่จากภาพจะสังเกตได้ค่อนข้างยาก เนื่องจากภาพที่ถ่ายจากกล้องอิพิฟลูออเรสเซนซ์สามารถมองภาพได้เพียง 2 มิติเท่านั้น (Trebesius *et al.*, 2000) จึงยังไม่สามารถยืนยันได้อย่างชัดเจนมากนัก ดังนั้นจึงนำตัวอย่างลำไส้กุ้งขาวจากแต่ละชุดการทดลองไฮบริดไดซ์

ด้วยโพรบ Lab158 ติดฉลากด้วย Cy3 ซึ่งมีช่วงความยาวคลื่นของการถูกกระตุ้นด้วยแสงประมาณ 550 นาโนเมตร ตรวจสอบการเรืองแสงของแบคทีเรียด้วยกล้องคอนโฟคอล เลเซอร์ สแกนนิง (confocal laser scanning microscope) เพื่อยืนยันผลการทดลองอีกครั้ง พบว่าเนื้อเยื่อของกุ้งขาวชุดทดลองที่ 2, 3 และ 4 มีการเรืองแสงของแบคทีเรียที่มีอยู่ในลำไส้ ซึ่งแสดงว่าเชื้อที่ติดสารเรืองแสงสีแดง คือ *L. plantarum* ซึ่งจากรายงานของ Gildberg และ Mikkelsen (1998) ศึกษาการเจริญของ *Carnobacterium divergens* บนผนังลำไส้ของปลาแอตแลนติกคอต โดยการใช้เทคนิค immunohistochemical พบว่าเซลล์ของ *C. divergens* จะยึดเกาะผนังลำไส้ในส่วนไส้ติ่ง (pyloric caeca) ได้ดีกว่าลำไส้ส่วนอื่นๆ นอกจากนี้เมื่อนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียในมูลปลาที่ถ่ายออกมายัง พบว่า มีปริมาณของ *C. divergens* สูงถึง 10^6 CFU/g ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียที่เสริมลงในอาหารดังกล่าวสามารถเจริญขึ้นได้ภายในลำไส้ของปลา ถึงแม้ว่าแบคทีเรียแลคติกสามารถยึดเกาะผนังลำไส้ของสัตว์น้ำ ตลอดจนเจริญอยู่ในอาหารที่จัดเตรียมไว้ได้ก็ตาม แต่ส่วนใหญ่ปริมาณแบคทีเรียดังกล่าวในลำไส้จะลดลงภายใน 2-3 วัน หลังได้รับอาหาร ดังนั้นสามารถเพิ่มปริมาณแลคติกแบคทีเรีย เช่น *Lactobacillus* spp. และ *Carnobacterium* spp. ในลำไส้ของสัตว์น้ำได้ โดยการเสริมแบคทีเรียดังกล่าวลงในอาหารให้แก่สัตว์น้ำในปริมาณที่มากเพียงพอ (Olsson, 1995)

4.3.1 ความต้านทานโรค

หลังจากเลี้ยงกุ้งขาวเป็นเวลา 1 เดือน นำกุ้งแต่ละชุดการทดลองจำนวน 10 ตัว มาทดสอบความต้านทานต่อการติดเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคจากเชื้อ *V. harveyi* โดยวิธีการแช่ (immersion challenge) และบันทึกอัตราการตายเป็นเวลา 14 วัน พบว่าชุดการทดลองที่ 1 (ชุดควบคุม) มีอัตราการตายสูงที่สุด คือ 60 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ 2, 3 และ 4 คือ 50, 43 และ 30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ชุดการทดลองที่ 4 (เติมเชื้อ *L. plantarum* ที่ระดับความเข้มข้น 10^9 CFU/g) มีอัตราการตายเพียง 30 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) สอดคล้องกับการรายงานของ Phianphak และคณะ (1999) รายงานว่า กุ้งกุลาดำวัยอ่อนอายุ 30 วัน (Post larva 30) ที่ได้รับเชื้อ *Lactobacillus* spp. โดยวิธีการผสมในอาหาร เป็นเวลา 100 วัน มีการเจริญเติบโต และอัตราการรอดตายสูงกว่ากุ้งในกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และเมื่อทดสอบความต้านทานต่อเชื้อ *Vibrio harveyi* D331 โดยวิธีการแช่เป็นเวลา 10 วัน พบว่าทำให้กุ้งกุลาดำรอดตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีอัตราการรอดตายเพียง 26 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น และพิกุล จิรวาณิชไพศาล (2543) ได้ทดลองเหนี่ยวนำกุ้งกุลาดำให้เกิดโรคด้วยวิธีการฉีดเข้าทางกล้ามเนื้อ พบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารผสม

Lactobacillus spp. มีเปอร์เซ็นต์การตายสะสมน้อยกว่ากุ้งที่ได้รับอาหารปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ซึ่งสาเหตุที่อัตรารอดสูงกว่าชุดควบคุมอาจเนื่องมาจากเซลล์ของ *Lactobacillus* spp. เข้าไปยึดเกาะกับผนังลำไส้กุ้งกุลาดำ ทำให้ *Vibrio* spp. ที่ไม่ได้ยึดเกาะกับผนังลำไส้ถูกกำจัดออกไปโดยการขับถ่ายของกุ้ง นอกจากนี้ *Lactobacillus* spp. อาจมีผลในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ ทำให้มีความต้านทานต่อเชื้อ *Vibrio* spp. ได้ดีขึ้น ผนังเซลล์ของ *Lactobacillus* spp. มี peptidoglycan เป็นองค์ประกอบซึ่งเป็นสารที่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ (Unestern and Soderhall, 1977) ซึ่งสารประกอบจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียและเชื้อราคือ lipopolysaccharide, β-glucan และ peptidoglycan จะมีผลกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน เช่น phagocytosis, melanization, encapsulation และกระบวนการแข็งตัวของเลือด โดยเกิดการรวมตัวของ β-1,3 glucan และ β- 1,3 glucan binding protein เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนไปกระตุ้นที่ membrane receptor ของเซลล์เม็ดเลือดชนิด semigranulocytes ทำให้เกิดการหลั่งสารต่างๆ ออกมาเช่น prophenoloxidase ทำหน้าที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคที่เข้าสู่ร่างกาย (Knapp, 1993) จึงทำให้ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งที่ได้รับ *Lactobacillus* spp. ทำงานได้ดีขึ้นจึงสามารถกำจัด *Vibrio* spp. ได้ดีกว่ากลุ่มควบคุม