บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

อุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งทะเลเป็นธุรกิจที่มีบทบาทในการพัฒนาประเทศไทย ซึ่งในปัจจุบันมีการปรับปรุงทั้งวิธีการและเทคโนโลยีการเลี้ยงอย่างรวดเร็วและต่อเนื่องอยู่ตลอดเวลาเพื่อเพิ่มผลผลิต การเลี้ยงกุ้งทะเลมีกระจายอยู่ในแหล่งน้ำกร่อย และชายฝั่งทะเล ประมาณกันว่ามีการเลี้ยงกุ้งทะเลไม่ต่ำกว่า 20,000 ฟาร์มในพื้นที่ไม่ต่ำกว่า 500,000 ไร่ของประเทศ (ยงยุทธ ปรีดาลัมพบุตร, 2540) แต่ในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา ผลผลิตกุ้งทั่วโลกกำลังมีแนวโน้มลดลง (Fast and Menasveta, 2000) ปัญหาหนึ่งที่เกิดขึ้นกับการเลี้ยงกุ้งทะเลก็คือ การเกิดโรคระบาดในกุ้ง ซึ่งมีสาเหตุมาจากแบคทีเรียและไวรัส

เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งทะเลส่วนใหญ่จะแก้ปัญหาด้วยการใช้สารเคมีหรือใช้ยาปฏิชีวนะ ผลที่ตามมาก็คือมีสารตกค้างในตัวกุ้งและในธรรมชาติ ซึ่งส่งผลไปสู่ผู้บริโภคและสิ่งมีชีวิตในน้ำ และยังส่งผลให้สิ่งมีชีวิตดื้อยาปฏิชีวนะและสารเคมีมากขึ้น เกษตรกรส่วนใหญ่นิยมให้อาหารกุ้งทั้งในรูปอาหารเม็ดและอาหารสด หากให้มากเกินความต้องการของกุ้งแล้ว ยังส่งผลต่อต้นทุนของการผลิต และมีการสะสมของสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ ส่งผลทำให้คุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงเปลี่ยนไป ความต้านทานโรคของกุ้งลดลง ดังนั้นจะเห็นได้ว่าสิ่งแวดล้อมในบ่อเลี้ยงเป็นปัจจัยสำคัญซึ่งจำเป็นต้องมีการจัดการที่ดีภายในฟาร์ม

ในปัจจุบันแนวโน้มการเลี้ยงกุ้งทะเลแบบเกษตรอินทรีย์ซึ่งคำนึงถึงสารตกค้างและสิ่งแวดล้อมมีมากขึ้น จากการนำแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์เข้าไปแทนที่แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคเหล่านั้น การเติมแบคทีเรียที่มีประโยชน์ที่สามารถลดสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ที่มีผลเสียต่อการเจริญของกุ้ง และช่วยเสริมภูมิต้านทานให้กับกุ้งได้ เช่น Rengpipat และคณะ (1998a) แยกเชื้อบริสุทธิ์ของสายพันธุ์ *Bacillus* S11 จากลำไส้ของกุ้งกุลาดำ พบว่าสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคเรืองแสง คือ *Vibrio harveyi* ในกุ้งกุลาดำ และยังเพิ่มผลผลิตมากขึ้น

การทำวิจัยครั้งนี้ได้มีการประยุกต์ใช้และติดตามแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกในระบบทางเดินอาหาร โดยดูภาพรวมถึงการคงอยู่ของโปรไบโอติกในระบบทางเดินอาหารของกุ้งขาวว่ามากน้อยเพียงใด รวมทั้งการทดสอบความต้านทานโรคเรืองแสง

ตรวจเอกสาร

1. กุ้งขาว (Pacific white shrimp)

กุ้งขาว (*Penaeus vannamei*) เป็นกุ้งสายพันธุ์หลักของทวีปอเมริกา ในธรรมชาติพบได้ตั้งแต่ชายฝั่งของประเทศเม็กซิโกจนถึงชายฝั่งของประเทศเปรู ซึ่งเป็นเขตที่มีอุณหภูมิของน้ำประมาณ 26-28 องศาเซลเซียส และมีความเค็มประมาณ 35 พีพีที

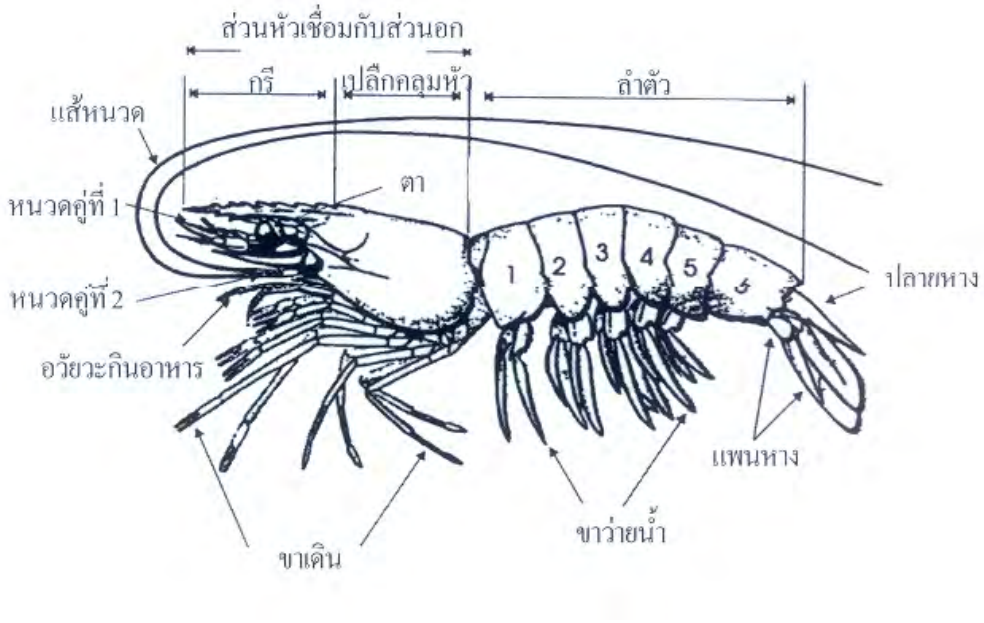
1.1 อนุกรมวิธานของกุ้งขาว *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei* Boone

Phylum Arthropoda
Class Crustacea
Subclass Malacostraca
Superorder Eucarid Ecarida
Order Decapoda
Suborder Natantia
Section Penaeidea
Family Penaeidae
Genus *Penaeus*, *Litopenaeus*
Species *vannamei*

1.2 ลักษณะทั่วไป

ลักษณะทั่วไปของกุ้งขาว (ภาพที่ 1) ส่วนหัวมี 1 ปล้อง มีกรีอยู่ในระดับยาวประมาณ 0.8 เท่าของความยาวเปลือกหัวสันกรีสูง ปลายกรีแคบ ส่วนของกรีมีลักษณะเป็นสามเหลี่ยมมีสีแดงอมน้ำตาล กรีด้านบนมี 8 ฟัน กรีด้านล่างมี 2 ฟัน ร่องบนกรีมองเห็นได้ชัด เปลือกหัวสีขาวอมชมพูถึงแดง ขาเดินมีสีขาวเป็นลักษณะที่โดดเด่น หนวดแดง 2 เส้นยาว ตาแดงเข้ม ส่วนตัวมี 6 ปล้องและมีสีขาว หน้าอกใหญ่ การเคลื่อนไหวเร็ว เปลือกตัวสีขาวอมชมพูถึงแดงเปลือกบาง ขาว่ายน้ำ 5 คู่ มีสีขาวข้างใน ที่ปลายมีสีแดง ส่วนหางมี 1 ปล้อง ปลายหางมีสีแดงเข้ม แพนหางมี 4 ใบ และ 1 กรีหาง ขนาดตัวที่โตสมบูรณ์เต็มที่ของกุ้งสายพันธุ์นี้จะมีขนาดที่เล็กกว่ากุ้งกุลาดำ หากินทุกระดับความลึกของน้ำ ชอบว่ายล่องน้ำแก่ง ลอกคราบเร็วทุกๆ สัปดาห์

กุ้งขาวเป็นสายพันธุ์กุ้งทะเลที่มีการเพาะเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายในหลายประเทศ เช่น สหรัฐอเมริกา, เม็กซิโก, กัวเตมาลา, นิคารากัว, คอสตาริกา, ปานามา, โคลัมเบีย, เอวาดอร์ และเปรู กุ้งสายพันธุ์นี้เป็นสัตว์ที่มีความแข็งแรงและทนทานจึงมีการขยายพันธุ์ตามธรรมชาติได้กว้างไกล ในแถบแนวชายฝั่งตะวันออกของมหาสมุทรแปซิฟิก ตั้งแต่เม็กซิโกถึงเปรู เนื่องจากภูมิภาคในแถบนี้ที่ระดับความลึกจากเส้นแนวชายฝั่งลงไปประมาณ 72 เมตรหรือ 235 ฟุต มีพื้นท้องทะเลเป็นเหมือนโคลนที่เหมาะสมแก่การเจริญเติบโต และเป็นแหล่งอาหารที่อุดมสมบูรณ์ ประเทศเอวาดอร์เป็นประเทศผู้ผลิตรายใหญ่ที่มีฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้ง, ลูกกุ้ง และพ่อ-แม่พันธุ์



ภาพที่ 1 ลักษณะภายนอกโดยทั่วไปของกุ้งขาวตัวเต็มวัย

Figure 1 General external adult anatomy of *Penaeus vannamei*

ที่มา: แลบอินเตอร์ (2547)

1.3 วงจรชีวิตและการสืบพันธุ์

ในธรรมชาติของกุ้งสายพันธุ์นี้จะมีอายุขัยประมาณเกือบ 36 เดือน โดยปกติแล้วแม่กุ้งขนาด 60-120 กรัม จะวางไข่ประมาณ 150,000 ถึง 250,000 ฟอง ส่วนแม่กุ้งขนาด 30-45 กรัม จะวางไข่ประมาณไม่เกิน 100,000 ฟอง โดยจะวางไข่ในตอนกลางคืนบนพื้น แม่กุ้งจะว่ายน้ำอย่างรวดเร็วอยู่ประมาณ 45-60 วินาที แล้วจึงเริ่มออกไข่ขณะที่ลดความเร็วลงอย่างช้าๆ กุ้งขาวเป็นสัตว์ 2 ระดับน้ำ คือ ระยะโตเต็มวัยอยู่ในทะลแต่ช่วงที่ยังไม่สมบูรณ์เพศจะอยู่บริเวณชายฝั่ง และ

เนื่องจากลักษณะอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียของกุ้งขาวนี้จะมีลักษณะเป็นแบบเปิด (opened thelycum) แตกต่างจากลักษณะอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียของกุ้งกุลาดำและกุ้งแชบ๊วย ซึ่งมีลักษณะเป็นแบบปิด (closed thelycum) ดังนั้นรูปแบบของการสืบพันธุ์และพฤติกรรมในการผสมพันธุ์จึงเป็นไปคนละลักษณะกับกุ้งกุลาดำและกุ้งแชบ๊วย

ระบบสืบพันธุ์และการผสมพันธุ์ ในการผสมพันธุ์ ปกติแล้วกุ้งขาวจะผสมพันธุ์ในเวลากลางคืน หลังจากมีการลอกคราบของตัวเมียจะมีการเกี้ยวพาราสีและผสมพันธุ์กันที่ความลึก 10-15 เมตรถึง 30-50 เมตร ในธรรมชาติ แม่กุ้งที่มีไข่แก่พร้อมที่จะวางไข่นั้น จะสังเกตได้จากจะเห็นรังไข่ เป็นลำทึบมีสีเขียวเกือบดำอยู่บนแถบหลังของลำตัว ตั้งแต่บริเวณหลัง ไปจรดหางและตรงบริเวณด้านข้างของลำตัว ตรงปล้องที่ 1-2 จะเห็นรังไข่แผ่ออกไปเป็นหยักๆ โค้งลงมาทางด้านข้างของลำตัวทั้งสองข้าง โดยมีพฤติกรรมในการผสมพันธุ์แบ่งได้เป็น 3 ระยะ คือ ระยะที่หนึ่ง ตัวเมียจะว่ายน้ำขนานไปกับตัวผู้ ตัวเมียจะว่ายน้ำสูงกว่าประมาณ 30-40 เซนติเมตร แล้วว่ายน้ำวกกลับมาสลับกลับการหยุดพักที่พื้นเป็นระยะๆ มักจะมีตัวผู้ว่ายไล่ตามหลายตัว แต่จะมีเพียงตัวเดียวที่สามารถว่ายน้ำเข้ามาขนานซ้อนอยู่ด้านล่างของตัวเมียพอดีแล้วตัวเมียจะค่อยๆ ใช้ขาเดินโอบรัดที่ส่วนหัว (carapace) ของตัวผู้ ใช้เวลาประมาณ 15-20 นาที ถ้าตัวผู้สามารถจัดตำแหน่งได้เหมาะสมถ้ายังจัดตำแหน่งไม่เหมาะสมหรือมีการหยุดพักนาน อาจใช้เวลานานมากกว่าหนึ่งชั่วโมง ระยะที่สอง ตัวผู้จะพลิกตัวค่อยๆ หงายขึ้นมาติดตัวเมีย พอทั้งคู่ประกบกันได้ตัวผู้จะแนบส่วนต่อของอกกับท้องเข้ากับส่วนนอกด้านล่างของตัวเมีย ซึ่งจะทำให้ตัวผู้ตัวอื่นๆ หมดโอกาสในการเข้าทำการผสมพันธุ์กับตัวเมียในจังหวะนี้ แต่ถ้าในระยะนี้ตัวผู้ยังเข้าทำได้ไม่สำเร็จ ตัวผู้จะกลับมาอยู่ในท่าคว่ำ แล้วจะพยายามว่ายน้ำขนานกับตัวเมียเพื่อสร้างโอกาสใหม่อีกครั้ง และระยะที่สามตัวผู้จะทำตัวเกือบตั้งฉากกับตัวเมีย หลังจากจังหวะที่ประกบตัวได้แล้ว ตัวผู้จะใช้ขาเดินคู่ที่ 5 เขี่ยอวัยวะสืบพันธุ์ (เพศผู้) petasma ซึ่งเห็นง่าย อยู่ด้านข้างเป็นคู่ มีลักษณะคล้ายตะขอ อยู่ที่ขาว่ายน้ำ คู่ที่ 1 ซึ่งเป็นอวัยวะที่ช่วยในการปล่อยน้ำเชื้อแล้วจับ petasma เข้าไปที่ thelycum ของตัวเมียซึ่งลักษณะเป็นแผ่นรูปคล้ายผีเสื้อกางปีก มีรูเปิดอยู่ตรงกลางยาวลงไปเป็นร่องเหมือนรังกระดุมเสื้อเชิ้ต อยู่ตรงกลางระหว่างขาว่ายน้ำคู่ที่ 1 กับขาเดินคู่ที่ 5 ซึ่งเป็นอวัยวะที่มีไว้สำหรับเก็บน้ำเชื้อของกุ้งตัวผู้ ภายหลังการเกาะติดแน่นมากเหมือนทากาวแล้ว ตัวผู้จะโค้งรอบตัวเมีย แล้วกระตุกหัวและหางเป็นจังหวะอย่างต่อเนื่องเพื่อบีบให้น้ำเชื้อออกมา ตัวเมียจะเก็บน้ำเชื้อเข้าไปแล้วปล่อยไข่เลย ซึ่งในกุ้งขาวนี้ไข่ของตัวเมียจะอยู่ข้างใน ส่วนของน้ำเชื้อที่เข้าไปจะอยู่ด้านนอก ซึ่งปากรูของ thelycum ต้องเปิดก่อนถึงจะเก็บน้ำเชื้อที่ได้รับมา ทำให้ปริมาณของเชื้อตัวผู้ที่เข้าปฏิสนธิกับไข่เป็นไปอย่างไม่สมบูรณ์ จึงทำให้โอกาสในการได้ไข่ที่ได้รับการผสมแล้วเจริญต่อไปเป็นตัวอ่อนน้อยกว่ากรณีของกุ้งกุลาดำและกุ้งแชบ๊วย หลังจากนั้นจึงค่อยแยกตัวออกจากกันแล้วว่ายน้ำออกไป

ในเวลา 2-3 วินาที ซึ่งรวมเวลาทั้งสิ้นในการผสมพันธุ์ทั้งหมดประมาณ 1-3 ชั่วโมง แล้วแม่กุ้งทำการปล่อยไข่ขณะที่ลดความเร็วการว่ายน้ำลงอย่างช้าๆ ออกทางช่องเปิดบริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 3 ประมาณ 45-60 วินาที การวางไข่นี้จะใช้เวลา 3-5 นาที ถ้ากุ้งวางไข่ จะสามารถสังเกตเห็นคราบไขมันลอยอยู่บริเวณใกล้เคียง (หรือติดกับขอบบ่อที่ทำการเพาะฟัก)

1.4 การเจริญเติบโตและการลอกคราบ

อัตราการเจริญของกุ้งขึ้นอยู่กับปัจจัยสำคัญ 2 ปัจจัย คือ ความถี่ในการลอกคราบ (ระยะเวลาระหว่างการลอกคราบแต่ละครั้ง) และขนาดที่เพิ่มขึ้น (น้ำหนักและความยาวที่เพิ่มขึ้นในการลอกคราบแต่ละครั้ง) เพราะตัวกุ้งจะถูกหุ้มด้วยเปลือกซึ่งมีโครงร่างแข็ง ดังนั้นจึงต้องลอกคราบเก่าออกและสร้างคราบใหม่ที่ใหญ่ขึ้นเพื่อรองรับการขยายขนาดที่เพิ่มขึ้น ในช่วงก่อนการลอกคราบกุ้งจะสร้างคราบใหม่ที่ยังนิ่มอยู่ไว้ภายในระหว่าง ชั้นของ cuticle และ intercalary sclerite เมื่อถึงเวลาลอกคราบกุ้งจะสลัดตัวหลุดออกจากคราบเก่าโดยใช้หางที่แข็งแรง คราบใหม่จะยังนิ่มอยู่ในช่วงแรก แต่จะแข็งขึ้นเรื่อยๆ พร้อมกับขนาดของกุ้งที่ใหญ่ขึ้น ในกุ้งเล็กจะใช้เวลาเพียง 2-3 ชั่วโมง แต่ในกุ้งใหญ่ อาจต้องใช้เวลา 1-2 วัน คราบใหม่จึงจะแข็งเหมือนเดิม ในวัยอ่อนกุ้งจะลอกคราบทุกๆ 30-40 ชั่วโมง (ที่ 28 องศาเซลเซียส) กุ้งระยะวัยรุ่น (juvenile) ขนาด 1-5 กรัม อาจลอกคราบทุกๆ 4-6 วัน แต่กุ้งขนาด 15 กรัม ระยะเวลาระหว่างการลอกคราบแต่ละครั้งจะห่างออกไปเป็นทุกๆ 2 สัปดาห์

สภาพแวดล้อม สารอาหารและความเครียดก็เป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อความถี่ในการลอกคราบและการเจริญเติบโตของกุ้งด้วย โดยอุณหภูมิที่สูงขึ้นมีผลทำให้ความถี่ในการลอกคราบเพิ่มขึ้นและมีผลต่อการเจริญเติบโตของกุ้ง โดยกุ้งขาวจะตายถ้าอยู่ในน้ำที่มีอุณหภูมิต่ำกว่า 15 องศาเซลเซียส หรือสูงกว่า 33 องศาเซลเซียส เป็นเวลานานกว่า 24 ชั่วโมงหรือมากกว่า ช่วงอุณหภูมิที่อาจทำให้เกิดอาการเครียดจนถึงตายได้ (sublethal stress) คือ 15-22 องศาเซลเซียส และ 30-33 องศาเซลเซียส ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโต คือ 22-30 องศาเซลเซียส กุ้งขนาดเล็กประมาณ 1 กรัม จะเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ 30 องศาเซลเซียส ในขณะที่กุ้งขนาดกลาง (12 กรัม) และกุ้งขนาดใหญ่ (18 กรัม) จะเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิน้ำต่ำลง โดยกุ้งขนาดกลางและใหญ่ที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส จะโตเร็วกว่าที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำที่ระดับต่ำกว่า 5-7 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลทำให้ประสิทธิภาพการลอกคราบลดลง ขณะที่กุ้งลอกคราบการดูดซึมออกซิเจนของกุ้งจะมีประสิทธิภาพต่ำลง จึงอาจทำให้กุ้งตายได้ง่ายระหว่างลอกคราบได้เนื่องจากการขาดออกซิเจน (hypoxia) ดังนั้น

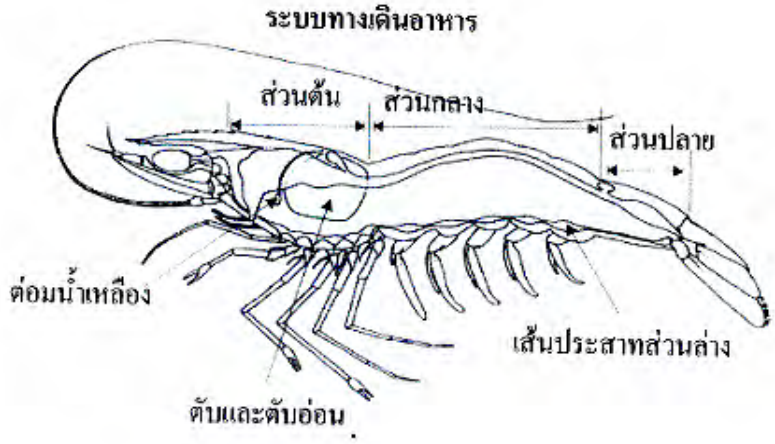
ช่วงลอกคราบจะเป็นช่วงที่อันตรายที่สุดของกุ้งเพราะกุ้งจะอ่อนแอช่วยเหลือตัวเองแทบไม่ได้ ต้องการออกซิเจนในน้ำสูง ใช้พลังงานสูง และตัวที่ลอกคราบมักจะหลบเข้าไปในแนวเลน ถ้าจัดการพื้นบ่อไม่ดีก็จะเจ็บป่วยติดเชื้อได้ง่าย

ความเค็มก็มีผลต่อการเจริญเติบโตเหมือนกัน แม้ว่ากุ้งชนิดนี้จะสามารถทนต่อการเปลี่ยนแปลงของความเค็มในช่วงกว้างตั้งแต่ 2-40 พีพีที ได้ แต่จะโตเร็วที่ระดับความเค็มซึ่งเท่ากับความเข้มข้นของแร่ธาตุในน้ำเท่ากับเลือดกุ้ง (isosmotic) ซึ่งกุ้งขาวจะเจริญเติบโตได้ดีที่ความเค็ม 33 พีพีทีซึ่งใกล้เคียงกับความเค็มของน้ำทะเล นอกจากนี้ความเค็มของน้ำยังมีอิทธิพลต่อรสชาติกุ้ง โดยกุ้งที่เลี้ยงในความเค็มสูงจะมีกรดอะมิโนอิสระ เช่น ไกลซีน อะลานีน ซีรีน และทรีโอนีน ในกล้ามเนื้อมากทำให้มีรสหวาน ดังนั้นในช่วงสุดท้ายของการเลี้ยงก่อนจับจึงควรเลี้ยงน้ำที่มีความเค็มสูง ทำให้กุ้งมีรสหวานเหมือนกุ้งในธรรมชาติ (ภิญโญ เกียรติภิญโญ, 2545; สุรศักดิ์ ดิลกเกียรติ, 2546; แลบอินเตอร์, 2547; สุทธวัฒน์ เบญจกุล, 2548)

2. ระบบทางเดินอาหารของกุ้ง

2.1 บริเวณลำไส้ที่สำคัญและหน้าที่ทั่วไป

บริเวณลำไส้ส่วนหน้าและส่วนกลางทำหน้าที่สำคัญในการย่อย ลำไส้ส่วนหน้าและส่วนหลังเกิดจากชั้นของเอคโตเดิร์ม (ectoderm) และบุด้วยผิวนอก (cuticles) ส่วนลำไส้ส่วนกลาง (midgut) เกิดจากชั้นเอนโดเดิร์ม (endoderm) เซลล์ที่เกาะติดกับช่องว่างในลำไส้ ส่วนอาหารที่เก็บ (storage) การบดให้ละเอียด (triturition) และการย่อย (digestion) จะเกิดที่บริเวณลำไส้ส่วนหน้า (foregut) ประมาณ 12% ของน้ำตาลที่ได้จากบริเวณนี้ผ่านไปและถูกดูดซึมที่ลำไส้ส่วนกลาง มีต่อมหลายอันเริ่มจากหลอดอาหาร (esophagus) มาทำหน้าที่ในการสร้างตัวหล่อลื่นมากกว่าการย่อยโดยตรง มีการขับเอนไซม์เฉพาะชนิดจากลำไส้ส่วนกลาง ส่วนสิ่งขับถ่ายจะรวมที่บริเวณลำไส้ส่วนหลัง (hindgut) เพื่อจะถ่ายออกไป (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 ระบบทางเดินอาหารของกุ้งขาว

Figure 2 Digestive tract of *Penaeus vannamei*

ที่มา: แลบอินเตอร์ (2547)

2.2 กลไกที่เกี่ยวข้องกับการย่อยอาหารของครัสเตเซียมีอยู่ 2 วิธีคือ การบีบตัวของลำไส้ (peristalsis) และการบดให้ละเอียด (triturition)

การบีบตัวของลำไส้เริ่มจากหลอดอาหาร (esophagus) ต่อไปที่ลำไส้ส่วนกลาง (midgut) และลำไส้ส่วนหลัง (hindgut) ตามลำดับ การบีบตัวของลำไส้เกิดขึ้น 3-5 ครั้งต่อนาที หรืออาจจะถูกกระตุ้นให้เกิดขึ้นได้ด้วยระบบประสาท บางครั้งมีการต่อต้านการบีบตัวของลำไส้ซึ่งเกิดขึ้นในลำไส้ส่วนกลาง (midgut) เนื่องจากการดูดซึมจะเกิดขึ้นที่ส่วนหน้าของลำไส้ส่วนหลัง (hindgut) ภายหลังการย่อยแล้ว การบีบตัวของลำไส้เพื่อไล่อาหารเกิดจากการหดตัวของกล้ามเนื้อตามยาวและไฟเบอร์ที่อยู่รอบๆ ช่องทวาร (anus) ต่อมาที่ลำไส้ (intestine) แรงกระตุ้นจะเกิดจากด้านหลังของประสาทซึ่งอยู่ด้านล่าง

การบดอาหารให้ละเอียด (triturition) โดยแกสตริกมิลซึ่งมีลักษณะเป็นฟันที่โยกได้ 3 อันจนถึงแผ่นกระดูกชิ้นเล็กๆ (ossicle) โดยเฉพาะในส่วนของ cardiac stomach ซึ่งแกสตริกมิล ทำหน้าที่คล้ายๆ ฟันบด อาหารที่ถูกบดจะผ่านเข้าไปที่อวัยวะสำหรับการกรอง การเคี้ยวอาหารชิ้นใหญ่ๆ จะเกิดที่ลำไส้ส่วนกลาง (midgut) ส่วนอาหารที่เคี้ยวชิ้นเล็กๆ เข้าไปในท่อเพื่อย่อยในถุงตัน ที่ปากท่อถุงตันจะมีตะแกรงไว้กรองอาหารที่มีขนาดเล็กเท่านั้นที่สามารถผ่านตะแกรงเข้าไปในท่อได้

การดูดซึมจะเกิดขึ้นภายในเฮพพาโตแพนเครียสและในลำไส้ส่วนกลาง (midgut) ซึ่งมีขนาดสั้นๆ การดูดซึมจะเกิดขึ้นที่ต่อมสร้างน้ำย่อย และที่ส่วนต่างๆ ของลำไส้คือ ลำไส้ส่วนหน้า (foregut) เป็นลำไส้ส่วนที่มีไคติน ทำหน้าที่คล้ายเนื้อเยื่อแผ่นบางที่สารสามารถซึมผ่านได้บ้าง (semipermeable membrane) ลำไส้ส่วนกลาง (midgut) ทำหน้าที่ดูดซึมอย่างแท้จริงภายในเซลล์ที่มีไขมัน เฮพพาโตแพนเครียสมี iron lactate หรือ iron storage cell ทำหน้าที่ดูดซึมไขมันและสารอื่นๆ (ประจวบ หลำอุบล, 2537)

วรรนิภา เพี้ยนภักตร์ (2539) ศึกษาแบคทีเรียทั้งหมดที่อยู่ในระบบทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำ โดยแยกทางเดินอาหารนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร TSA เพื่อหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด พบว่า สามารถแยกแบคทีเรียได้ ทั้งหมด 6 สกุล คือ *Vibrio* sp., *Bacillus* sp., *Aeromonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Klebsiella* sp. และ *Staphylococcus* sp. และได้คัดเลือก *Bacillus* S11 เป็นโปรไบโอติกเสริมในอาหารกุ้งเพื่อใช้เลี้ยงกุ้งกุลาดำ ต่อมาจำแนกชนิดเชื้อ *Bacillus* S11 คือ *Bacillus mycoides*

3. โปรไบโอติก (Probiotic)

คำว่า “Probiotic” มีรากศัพท์มาจากภาษากรีก ที่มีความหมายว่า เพื่อชีวิต (For life) ต่อมาหมายถึง สารที่จุลินทรีย์ชนิดหนึ่งขับออกมาและช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่ง ซึ่งเป็นการทำงานที่ตรงข้ามกับการทำงานของยาปฏิชีวนะ (antibiotic) ที่จะทำลายจุลินทรีย์เกือบทุกชนิด (Lilly and Stillwell, 1965) ต่อมาได้มีการนำสิ่งที่สกัดจากเนื้อเยื่อ (tissue extract) ที่ช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (Sperti, 1971) สิ่งมีชีวิตและสารใดๆ ก็ตามที่มีส่วนช่วยเหลือในการทำให้เกิดภาวะสมดุลของจำนวนจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในลำไส้ จึงถูกนำไปใช้เพื่อประโยชน์ในการควบคุมจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในลำไส้ (microflora) (Parker, 1974) อาหารเสริมซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตสามารถก่อประโยชน์ต่อร่างกายของสิ่งมีชีวิตที่มันอาศัยอยู่ โดยการปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในร่างกาย (Fuller, 1989)

Hammes และ Hertel (1998) ได้ให้ความหมายของโปรไบโอติกคือ การเลี้ยงจุลินทรีย์ที่มีชีวิตเพียงชนิดเดียวหรือหลายชนิดในสัตว์หรือมนุษย์ แล้วส่งผลให้เกิดประโยชน์ต่อเจ้าบ้านโดยจุลินทรีย์โปรไบโอติก จะเข้าไปทำให้จุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ในลำไส้เกิดความสมดุล

Kontula และคณะ (1998) ให้ความหมายของโปรไบโอติกคือ จุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารที่มีประโยชน์ต่อเจ้าบ้าน (host) มีผลต่อสมดุลจุลินทรีย์ภายในลำไส้ โปรไบโอติก

สามารถผลิตกรดแลคติกและสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นได้ ทั้งยังทำให้เกิดสมดุลในระบบการย่อยการขับถ่าย และยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค

สำหรับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำนั้นการใช้โปรไบโอติกจะให้ความสำคัญทั้งในระบบการย่อยอาหารของสัตว์และสภาวะแวดล้อมต่างๆ ในน้ำที่อยู่รอบตัวสัตว์ Gatesoupe (1999) ได้ให้ความหมายของโปรไบโอติกคือ เซลล์ของจุลินทรีย์ที่เข้าไปในระบบทางเดินอาหารและสามารถมีชีวิตอยู่ได้ โดยมีจุดมุ่งหมายในการปรับปรุงสุขภาพของสัตว์ที่เป็นเจ้าบ้าน ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับ Gram และคณะ (1999) ที่ให้ความหมายของโปรไบโอติกคือ การเติมจุลินทรีย์ที่มีชีวิตซึ่งมีประโยชน์ต่อสัตว์เจ้าบ้าน โดยจุลินทรีย์ชนิดนั้นจะไปปรับปรุงจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารให้เกิดความสมดุล Debach และ Rosen (1991) ได้กล่าวถึงจุลินทรีย์ที่ควบคุมระบบทางชีวภาพ โดยการใช้สารที่เป็นอันตรายในสภาวะแวดล้อมต่างๆ ในน้ำที่อยู่รอบตัวสัตว์ เพื่อลดสาเหตุของความเสียหายต่อเซลล์ของสัตว์

สำหรับลักษณะที่ดี บทบาท และการทำงานของแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไปโอติก มีดังนี้

แบคทีเรียที่เป็นโปรไบโอติกที่ดีควรมีลักษณะดังนี้

1. ต้องไม่ก่อให้เกิดโรคและควรเป็นตัวยับยั้งที่ดี
2. เจริญเติบโตง่าย เพิ่มจำนวนได้เร็ว และสามารถมีชีวิตอยู่ในลำไส้ได้
3. ควรเป็นแบคทีเรียชนิดแกรมบวก (Gram-positive)
4. มีความคงทนต่อสภาพแห้งได้นาน สามารถนำมาผลิตหรือผสมในอาหารสัตว์
5. ทนต่อยาปฏิชีวนะได้หลายชนิดซึ่งมักพบหรือใช้ในการผลิตอาหารสัตว์
6. ต้องไม่มีคุณสมบัติในการถ่ายทอดกรรมพันธุ์การต้านยา
7. ช่วยย่อยสลายกากอาหารแล้วให้ผลผลิตเป็นกรดอะมิโน กรดไขมันและวิตามิน
8. มีการเจริญเติบโตที่ช่วงอุณหภูมิกว้างคือระหว่าง 20-60 องศาเซลเซียส

(เกรียงศักดิ์ พูนสุข, 2535; Gomez-Gil and Roque, 1998; Phianphak *et al.*, 1997)

แบคทีเรียที่ใช้เป็นโปรไบโอติกเมื่ออยู่ในร่างกายคนหรือสัตว์ควรมีบทบาท ดังนี้

1. เพิ่มจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ ลดปริมาณจุลินทรีย์ที่ก่อโรค
2. อาจมีการสร้างสารปฏิชีวนะซึ่งสามารถควบคุมกลุ่มจุลินทรีย์ที่ก่อโรคได้

3. จะไปแย่งจับกับเยื่อบุลำไส้ ทำให้จุลินทรีย์ที่ก่อโรคมาจับกับเยื่อบุลำไส้ไม่ได้ จึงทำให้ไม่แสดงอาการของโรค
4. จะไปกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรคในระบบทางเดินอาหารให้สูงขึ้น
5. สร้างเอนไซม์หลายชนิดที่ร่างกายสร้างไม่ได้ เช่น เบต้า-กาแลกโตซิเดส, เพคติเนส และ เซลลูเลส
6. สามารถสร้างสารที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายสัตว์ เช่น กรดไขมัน, กรดอะมิโน และวิตามิน เป็นต้น

(เกรียงศักดิ์ พูนสุข, 2535; Fuller, 1992; Gibson and Roberfroid, 1995)

การทำงานของโปรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจะให้ความสำคัญทั้งระบบการย่อยอาหาร และการปรับปรุงคุณภาพน้ำที่อยู่รอบตัวสัตว์น้ำ คือในระบบการย่อยอาหารแบคทีเรียที่เป็นโปรไบโอติกสามารถมีอัตราการอยู่รอดสูง ทนต่อเชื้อก่อโรคมีการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค และช่วยส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำให้ดีขึ้น และการปรับปรุงคุณภาพน้ำ ทำให้น้ำที่ปล่อยสู่สิ่งแวดล้อมมีการปนเปื้อนน้อยลง เช่น ควบคุมความเข้มข้นของแอมโมเนีย, ไนไตรท์ และไฮโดรเจนซัลไฟด์ โดยการสร้างเอนไซม์บางชนิด (exoenzyme) ที่ทำให้ความเป็นพิษของสารดังกล่าวลดลง ช่วยเพิ่มปริมาณของออกซิเจน เพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำ ส่งเสริมการเจริญของสาหร่ายที่มีประโยชน์และยับยั้งการเจริญของสาหร่ายที่เป็นพิษ เช่น สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเพิ่มปริมาณอาหารมีชีวิต เช่น แพลงก์ตอนสัตว์ (zooplankton) และโปรไบโอติกบางชนิด เช่น *Bacillus* sp. สามารถสร้างเอนไซม์ที่ย่อยสารโมเลกุลใหญ่ เช่น พอลิเมอร์ ทำให้สามารถเจริญในน้ำได้ดีกว่าเชื้อก่อโรค เช่น *Vibrio* sp. ที่ไม่สร้างเอนไซม์ (Boyd and Gross, 1998; Phianphak *et al.*, 1997; Moriaty, 1997)

Holzapfel และคณะ (2002) และ Fuller และ Gibson (1998) ได้รายงานเกี่ยวกับจุลินทรีย์ที่นำมาใช้เป็นโปรไบโอติก ดังแสดงไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 จุลินทรีย์ที่นำมาใช้เป็นโปรไบโอติก

Table 1 Microbial species from which strains find application in probiotic products

Microbial	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*
***Clostidium* sp.**	*C. butyricum*
***Enterococcus* sp.**	*Enterococcus* sp.
Yeast	
***Saccharomyces* sp.**	*S. cerevisiae*
***Candida* sp.**	*C. pentoiepessi (Torulopsis bovina)*
Fungi	
***Aspergillus* sp.**	*A. oryzae, A. niger*

ที่มา : Modified from Holzapfel *et al.*, (2002); Fuller and Gibson, (1998)

3.1 ความต้องการโปรไบโอติกในสัตว์

ในสภาวะปกติเดิมซึ่งสภาวะแวดล้อมไม่เปลี่ยนแปลงมาก คนหรือสัตว์จะไม่มีความต้องการโปรไบโอติก แต่ในสภาพปัจจุบันการดำรงชีวิตในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เป็นธรรมชาติ จึงต้องมีการปฏิบัติตนอย่างระมัดระวัง การดูแลอนามัยที่ดีจึงเป็นสิ่งที่จำเป็น ซึ่งมีข้อจำกัดมากมายเกี่ยวกับการบริโภคหรือการกินอาหารที่ไม่เป็นธรรมชาติ มีโอกาสสัมผัสภาวะที่มีการใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อทำลายจุลินทรีย์ ภาวะกดดันรวมทั้งความเครียดล้วนมีผลต่อจุลินทรีย์ภายในลำไส้ทั้งสิ้น โดยมีผลทั้งทางตรงและทางอ้อมคือ อาจทำให้จุลินทรีย์มีองค์ประกอบที่ผิดไปจากเดิม มีบางอย่างที่บกพร่อง อันมีผลต่อการแสดงออกถึงความต้านทานโรคลดลง มีความไวต่อการติดเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคมีผลต่อการเจริญเติบโตในวัยอ่อนให้ลดลง ดังนั้นการใช้โปรไบโอติกจึงมีจุดมุ่งหมายเพื่อให้มีการเสริมสร้างหรือซ่อมแซม ฟื้นฟูส่วนที่บกพร่องต่างๆ เหล่านี้ให้กลับคืนสู่สภาพปกติเดิมและปกป้องควบคุมจุลินทรีย์อื่นๆ ที่ก่อโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ

การใช้โปรไบโอติกมีจุดประสงค์ที่แตกต่างกับการใช้ยาปฏิชีวนะคือ การใช้โปรไบโอติกเพื่อควบคุมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ก่อโรคไม่ให้มีปริมาณมากเกินไป อันก่อให้เกิดโทษ เพื่อป้องกันหรือซ่อมแซมโดยเพิ่มจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ เพื่อให้ผู้บริโภคมีความต้านทานโรคเพิ่มขึ้น ใช้เป็น Growth promoter ได้ในวัยอ่อนทั้งในคนและสัตว์ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 24 (พ.ศ. 2538) ในรูปอาหารผสม มีผลกระตุ้นและส่งเสริมการเจริญเติบโตในสัตว์ ด้านเกษตรกรรม ซึ่งได้รับการยกเว้นจากการเป็นยา ใช้เป็นระบบการป้องกันและกระตุ้นให้เกิดความต้านทานโรคเพิ่มขึ้น ปลอดภัยและได้รับการยอมรับโดยไม่มีผลเสียทั้งทางตรงและทางอ้อมแบบยาปฏิชีวนะ แต่ยังไม่มีการยืนยันผล หรืออาการต่างๆ ทางคลีนิคที่ชัดเจนว่าการออกฤทธิ์มีความสัมพันธ์ต่อขนาดและปริมาณการบริโภคต่อการรอดชีวิตในระบบทางเดินอาหาร ระบบการย่อยและการดูดซึมของผู้บริโภคซึ่งให้ผลแตกต่างกัน ต้นทุนการผลิตสูงกว่าสำหรับการใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อลดจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโทษแต่ละชนิดโดยทางตรงตามอาการและบริเวณที่มีการติดเชื้อ โดยใช้สารปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์ได้จำเพาะซึ่งมีกลไกการออกฤทธิ์แน่นอนและชัดเจน ใช้เป็น Growth promoter ได้ทั้งในคนและสัตว์ ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 3 (พ.ศ. 2522) ว่าเป็นยาและมีขนาดปริมาณการใช้รักษาโรคแน่นอนตามหลักวิชาการ ซึ่งการใช้ยาปฏิชีวนะมีผลต่อเชื้อจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในสภาวะแวดล้อมโดยมีผลทำให้ความไว (sensitivity) ของเชื้อเปลี่ยนแปลงไปอาจทำให้เชื้อบางชนิด ไวต่อยาหรือบางชนิดทนต่อยาได้จึงต้องเพิ่ม dose ในการใช้รักษา ผู้ใช้อาจแพ้ยา และยังพบกับความเป็นพิษของยาแต่ละชนิดที่ใช้รักษาต่อตับ ไต ระบบทางเดินอาหารและยังเป็นการรักษาที่ปลายเหตุ (ดัดแปลงจาก Fuller, 1989, 1992, 1997)

3.2 ความสำคัญของจุลินทรีย์ประจำถิ่น

การที่สัตว์น้ำมีสุขภาพที่ดีนั้นเกิดจากความสมดุลระหว่างจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่มีประโยชน์และจุลินทรีย์ที่ก่อโรค แบคทีเรียแกรมลบที่ไม่ต้องการอากาศมีอยู่ทั่วไปในระบบทางเดินอาหารของปลาและสัตว์น้ำพวกที่มีเปลือก เช่น หอย, กุ้ง และปู ที่อาศัยกันแบบพึ่งพาอาศัยกันอย่างถาวรในสภาพที่ไม่มีอากาศและส่วนท้ายของลำไส้ของพวกปลากินพืชเป็นอาหารที่อาศัยอยู่ในเขตร้อน ซึ่งพวก *Vibrio* spp. และ *Pseudomonas* spp. ที่อาศัยอยู่ในสัตว์ทะเลพวกกุ้ง, หอย และปูมากที่สุด รวมทั้งปลาทะเล และหอย 2 ฝา (Clements, 1997 อ้างโดย Gatesoupe, 1999)

ปัจจัยของระบบนิเวศในทะเลที่มีผลต่อจุลินทรีย์ ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิและความเค็มก็ล้วนส่งผลต่อจุลินทรีย์ นอกจากนั้นความเค็มก็ยังทำให้ปลาทะเลต้องรักษาระดับของความเค็มให้คงที่เพื่อป้องกันไม่ให้น้ำสูญเสียไปจากร่างกาย และการไหลของน้ำอย่างต่อเนื่องที่เพิ่มขึ้นก็มีผลต่อสารอาหารในบริเวณนั้น จึงทำให้สิ่งมีชีวิตจำเป็นต้องมีการปรับตัวให้เข้ากับระบบนิเวศที่พวกมันอาศัยอยู่เพื่อดำรงชีวิตต่อไป (Ringo and Strom, 1994 อ้างโดย Gatesoupe, 1999)

3.3 ผลกระทบของความเครียดที่มีต่อจุลินทรีย์ประจำถิ่น

ความเครียดในสัตว์เป็นสาเหตุหลักในการลดลงของจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่มีประโยชน์ในระบบทางเดินอาหาร เมื่อสัตว์ถูกกำหนดให้อยู่ในสภาวะแวดล้อมที่กดดัน ทำให้เกิดความเครียด จำนวนเชื้อก่อโรคจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และจำนวนแบคทีเรียที่มีประโยชน์ซึ่งได้แก่ *Lactobacillus* spp. ดั้งเดิม ในระบบทางเดินอาหารจะลดน้อยลงไป สาเหตุที่ทำให้เกิดความเครียดสามารถเกิดขึ้นได้จากการเคลื่อนย้าย การเปลี่ยนแปลงอัตราการให้อาหาร สภาพอากาศอย่างรุนแรง และการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ เป็นต้น

การเกิดโรคแทรกซ้อนและสาเหตุมาจากสิ่งอื่นๆ ก่อให้เกิดการสูญเสียจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่มีประโยชน์ทำให้ปริมาณจุลินทรีย์ก่อโรคเพิ่มขึ้น ส่งผลให้เกิดการแสดงอาการของโรคสุดท้ายย่อมเกิดปัญหาและผลผลิตลดลงในที่สุด

ดังนั้นในการใช้โปรไบโอติกในตั้งแต่ระยะตัวอ่อนของสัตว์น้ำควรคำนึงถึงระดับความต้องการ ซึ่งจะช่วยลดผลกระทบจากความเครียดได้ นอกจากนี้ในการใช้โปรไบโอติกต้องรู้ระดับของความต้องการของสัตว์น้ำ เนื่องจากต้องคำนึงถึงต้นทุนเพื่อก่อให้เกิดประสิทธิภาพมากที่สุด (Gomez-Gil *et al*., 2000)

3.4 การประยุกต์ใช้โปรไบโอติกกับการเลี้ยงสัตว์น้ำโดยการผสมกับอาหารสำเร็จรูป อาหารเม็ดหรือผสมกับอาหารมีชีวิต

Austin และคณะ (1995) พบว่าโปรไบโอติกแบคทีเรียสายพันธุ์ *Vibrio alginolyticus* ซึ่งไม่เป็นอันตรายต่อปลาแซลมอนและสามารถลดอัตราการตายของปลาแซลมอนจากเชื้อ *Aeromonas salmonicida*, *V. anguillarum* และ *V. ordalii* ได้โดยทำการทดลองแบ่งเป็น 2 ชุด คือ 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* ซ้ำอีกครั้งในปริมาณเชื้อและเวลาเท่าเดิม เมื่อตรวจอัตราการตายจากผลการทดลองพบว่า ชุดควบคุม ปลาแซลมอนมีอัตราการตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนชุดทดลองมีอัตราการตายเนื่องจากเชื้อ *A. salmonicida*, *V. anguillarum* และ *V. ordalii* เท่ากับ 18, 74 และ 74 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Douillet และ Langdon (1994) ใช้โปรไบโอติกในทางการค้า (CA 2) ซึ่งผลิตจากเชื้อแบคทีเรีย จำนวน 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใช้ร่วมกับอาหารในระยะวัยอ่อน พบว่าสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตในหอยนางรมได้

Rengpipat และคณะ (1998a) รายงานว่า เมื่อใช้ *Bacillus* S11 ในลักษณะต่างกัน คือ เซลล์สด เซลล์สดในน้ำเกลือ และเซลล์แห้ง (lyophylized cell) ผสมอาหารสำหรับเลี้ยงกุ้งกุลาดำอายุ 30 วัน (PL 30) เปรียบเทียบกับสูตรอาหารปกติ เมื่อให้อาหารครบ 100 วัน นำกุ้งกุลาดำในแต่ละชุดมาแช่เชื้อ *Vibrio haveyi* D331 ที่มีปริมาณเชื้อ 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้น อีก 7 วัน แช่เชื้อ *V. haveyi* D331 ซ้ำอีกครั้งโดยมีปริมาณเชื้อ 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ผลการทดลองพบว่า กุ้งกุลาดำที่กินอาหารผสม *Bacillus* S11 มีอัตรารอด 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกุ้งกุลาดำที่กินอาหารปกติมีอัตรารอดเพียง 26 เปอร์เซ็นต์

Rengpipat และคณะ (1998b) ใช้ *Bacillus* S11 ที่แยกได้จากระบบทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำเป็นอาหารเลี้ยงอาร์ทีเมีย เพื่อให้เกิดเป็น probiotic encapsulation เพื่อใช้เลี้ยงลูกกุ้งกุลาดำ พบว่าจะให้ผลผลิตสูงขึ้นและทนต่อโรคดีกว่าที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมียที่กินอาหารปกติ

4. การใช้โปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติก (Lactic acid Bacteria) และบาซิลัส (*Bacillus* sp.) ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

4.1 แบคทีเรียแลกติก (Lactic acid Bacteria)

เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase) ไม่สร้างสปอร์ ไม่ต้องการอากาศในการเจริญ (Axelsson, 1993) มีความสามารถในการสร้างกรดจากน้ำตาล (Perez *et al*., 1996) แบ่งเป็น ชนิดที่สร้างกรดแลคติกอย่างเดียว หรือกรดแลกติกกับกรดอะซิติก กรดฟอร์มิก และเอธิลแอลกอฮอล์ ซึ่งแบ่งเป็น 2 กลุ่ม (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2536) คือ

กลุ่มโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ (homofermentative) หมายถึง พวกที่หมักน้ำตาลกลูโคสแล้วให้กรดแลกติก ประมาณร้อยละ 90 ไม่ต้องการไทอะมีน (thiamine) ในการเจริญ ผลิตเอนไซม์อัลโดเลส (aldolase) และเอนไซม์เฮกโซสไอโซเมอเรส (haxose isomerase) แต่ไม่ผลิตเอนไซม์ฟอสโฟคีโตเลส (phosphoketolase) และใช้ Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) pathway ทำให้ได้กรดแลกติก 2 โมเลกุลต่อกลูโคส 1 โมเลกุล ได้แก่ *Lactobacillus acidilactica*, *L. casei*, *L. plantarum*, *Pediococcus cerevisiae* และ *Lactococcus lactis* เป็นต้น

กลุ่มเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ (heterofermentative) คือ พวกที่หมักน้ำตาลกลูโคสแล้วให้กรดอะซิติก เอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์ ใช้ไทอะมีนในการเจริญสร้างเอนไซม์ฟอสโฟคีโตเลส แต่ไม่สร้างเอนไซม์อัลโดเลส และเอนไซม์เฮกโซสไอโซเมอเรส และใช้ hexose monophosphate หรือ pentose phosphate pathway ได้แก่ *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus brevis* และ *L. fermentum* เป็นต้น (Axelsson, 1993)

แบคทีเรียแลกติกพบทั่วๆ ไปในลำไส้และกระเพาะของสัตว์ต่างๆ ในผลิตภัณฑ์นมและผลิตภัณฑ์อาหารทะเล และพืชผิวน้ำบางชนิด โดยทั่วไปจะใช้ในการถนอมอาหาร เนยโยเกิร์ต (Lin and Ayres, 1989)

ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำก็พบว่าได้มีการแยกแบคทีเรียแลกติกมาใช้ในการกำจัดโรคโดย Gildberg และคณะ (1997) ได้ศึกษาการรอดชีวิตและการเจริญของลูกปลาคอดที่จับได้จากมหาสมุทรแอตแลนติกโดยนำ *Carnobacterium divergens* มาผสมกับอาหาร มีการชั่งน้ำหนัก และตรวจดูจำนวนเชื้อ *Vibrio anguillarum* ซึ่งเป็นสาเหตุที่เกิดโรคและการตายของลูกปลาคอด พบว่า 12 วันหลังการให้อาหารในลูกปลาจะมีจำนวนเชื้อ *V. anguillarum* ลดลง อัตราการตายของลูกปลาคอดลดลงจาก 10 เปอร์เซ็นต์ เป็น 2.5 เปอร์เซ็นต์ และหลังจาก 16 วัน อัตราการตายของลูกปลาคอดจะคงที่ ในด้านการเจริญพบว่าลูกปลาคอดที่ได้รับอาหารผสม *C. divergens* จะมีอัตราการเจริญเพิ่มจาก 2.35 เปอร์เซ็นต์ เป็น 2.68 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับลูกปลาที่ได้รับอาหารปกติ

Garcia-de-la-Banda และคณะ (1992) ศึกษาอัตราการรอดตายของลูกปลาเทอร์บอท (*Scophthalmus maximus*) โดยการเติมแบคทีเรียแลคติก (*Streptococcus lactis* และ *Lactobacillus bulgaricus*) ในการเลี้ยงอาร์ทีเมียเพื่อเป็นอาหารของลูกปลาเทอร์บอท โดยพบว่าสามารถเพิ่มอัตราการรอดตายของปลาเทอร์บอท 66 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เติมแบคทีเรียแลกติกมีอัตราการรอดตายเพียง 34 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งคล้ายคลึงกับ Gatesoupe (1994) ได้ปรับปรุงอัตราการรอดตายของลูกปลาเทอร์บอท โดยการเติมแบคทีเรียแลกติกลงในโรติเฟอร์ เพื่อเป็นอาหารของลูกปลาเทอร์บอท โดยพบว่าสามารถลดอัตราการตายเมื่อนำไปทดสอบการต้านทานเชื้อก่อโรค *Vibrio* sp. ในปลา เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

Nikoskelainen และคณะ (2001) ศึกษาการป้องกันโรคฟูรันคูโลซีส (furunculosis) ในปลาเรนโบว์เทร้าท์ (*Oncorhynchus mykiss*) โดยใช้ *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 53103) ที่แยกได้จากมนุษย์ 10^9 และ 10^{12} CFU/g ผสมในอาหาร นำมาเลี้ยงในปลาเรนโบว์เทร้าท์ หลังจากนั้น 16 วันนำมาทดสอบความต้านทานเชื้อ *Aeromonas salmonicida* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคฟูรันคูโลซีส พบว่าสามารถลดอัตราการตายจาก 52.6 เปอร์เซ็นต์ในกลุ่มควบคุมเป็น 18.9 เปอร์เซ็นต์ในกลุ่มที่ใช้เชื้อ 10^9 CFU/g ผสมในอาหารและ 46.3 เปอร์เซ็นต์ในกลุ่มที่ใช้เชื้อ 10^{12} CFU/g ผสมในอาหาร

4.2 บาซิลัส (*Bacillus* spp.)

เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างเป็นท่อนที่สร้างสปอร์ ต้องการออกซิเจน (aerobic) หรือสามารถเติบโตได้ทั้งในสภาพมีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) มีหลายชนิดที่สร้างเอกโซเอนไซม์ (exoenzyme) ย่อยโปรตีนหรือคาร์โบไฮเดรตที่ซับซ้อน (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ, 2539)

ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้มีการศึกษาโดย ชลิต โนระดี (2535) รายงานว่า โปรไบโอติกแบคทีเรียที่ใช้คือ *Bacillus subtilis* มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอินทรีย์ ช่วยปรับสภาพน้ำในบ่อซีเมนต์ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่พื้นเป็นดินเหนียวและยังมีส่วนในการเพิ่มอัตราการรอดตายของกุ้งกุลาดำด้วย

สนธิ แดงสกุล และ ลิลา เรืองแป้น (2541) รายงานว่า โปรไบโอติกที่เตรียมจาก *Bacillus* spp.ที่แยกจากดินในบ่อกุ้ง สายพันธุ์ PO27 เป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในด้านอัตราการรอดตายของกุ้งกุลาดำสูงอย่างสม่ำเสมอในทุกชุดการทดลอง ส่วนประสิทธิภาพในด้านการเพิ่มน้ำหนักและอัตราการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำนั้น พบว่า *Bacillus* สายพันธุ์ PO26 และ PO27 มีอัตราการเพิ่มน้ำหนักสูงในทุกชุดการทดลอง และการใช้ *Bacillus* spp. จะทำให้อัตราการรอดตาย

ของกุ้งเพิ่มขึ้น และลดแบคทีเรียเรืองแสงในตะกอนดินและในน้ำ นอกจากนี้การใช้ *Bacillus* spp. ยังสามารถย่อยสลายอินทรีย์สารได้ด้วย

Moriarty (1997) ได้กล่าวถึงอัตรารอดตายของกุ้งที่เพิ่มขึ้นจากการใช้แบคทีเรีย *Bacillus* spp. ซึ่งสามารถต้านทานต่อเชื้อก่อโรคเรืองแสงได้จึงใช้เป็นเหตุผลในการตัดสินใจเลือกเป็นโปรไบโอติก

Kennedy และคณะ (1998 อ้างโดย Gomez-Gil *et al.*, 2000) ได้ศึกษาโดยแยก *Bacillus subtilis* จากปลาคอมมอนสนุค (Common snook, *Centropomus undecimalis*) แล้วเติมลงในน้ำที่ใช้เลี้ยงผลปรากฏว่าสามารถกำจัดเชื้อ *Vibrio* sp. ได้

Queiroz และ Boyd (1998) ได้ยืนยันว่าเชื้อ *Bacillus* spp. ทางการค้าสามารถเพิ่มอัตราการรอดตายและผลผลิตของปลากดอเมริกัน (Channel catfish) ได้

5. Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH)

Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) เป็นเทคนิคที่ระบุชิ้นส่วนของ DNA หรือ RNA อย่างจำเพาะเจาะจงโดยตรงภายในเซลล์ ซึ่ง probes จะเชื่อมต่อกับโมเลกุล เช่น biotin หรือ fluorescein ทำให้สามารถมองเห็นเป้าหมายที่จะศึกษา (target) ได้ ซึ่งได้แก่ chromosome, interphase nuclei หรือเนื้อเยื่อที่ใช้ในการตรวจสอบหรือศึกษา (tissue biopsy) จากตารางที่ 2 probes แต่ละชนิดจะมีความจำเพาะเจาะจงกับจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์และอุณหภูมิที่ทำให้ probe จับคู่สมกับ DNA ของโครโมโซมของเซลล์ (hybridization) และการล้างชิ้นส่วนของ DNA หรือ RNA ที่ไม่ต้องการออกไป (washing)

ข้อดีและข้อเสียของเทคนิค FISH

1. เป็นเทคนิคที่มีความรวดเร็วและว่องไว
2. ไม่จำเป็นต้องมีการเลี้ยงเซลล์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ
3. อธิบายผลได้ง่ายกว่า karyotype
4. สามารถใช้ร่วมกับ immunostaining
5. เทคนิค FISH จะให้ข้อมูลเกี่ยวกับ probe ที่ใช้ทดสอบเท่านั้น

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบ, ความจำเพาะ, อุณหภูมิที่ทำให้ probe จับคู่สมกับ DNA ของโครโมโซมของเซลล์ (hibridization) และอุณหภูมิที่ใช้ในการล้าง (washing) ของ rRNA-targeted oligonucleotide probes ที่ใช้สำหรับจำแนกสปีชีส์ต่างๆ ของ *Lactobacillus* sp.

Table 2 Composition, specificities, hybridization, and washing temperatures of rRNA olignucleotide probes used for identifying the *Lactobacillus* sp. at the species level

Probe	5′-Sequence-3′	Target	Specificity	Temperature (°C) for	
				Hybridization	Washing
Lba	TCTTTCGATGCATCCACA	23S	*L. acidophilus*	42	49
Lbcp	CAATCTCTTGGCTAGCAC	23S	*L. crispatus*	42	50
Lbam	GTAAATCTGTTGGTTCCGC	16S	*L. amylovorus*	60	50
Lbg	TCCTTTGATATGCATCCA	23S	*L. gasseri*	42	50
Lbj	ATAATATATGCATCCACAG	23S	*L. johnsonii*	40	49
Lbh	ACTTACGTACATCCACAG	23S	*L. helveticus*	42	50

ที่มา : Roy *et al.*, (2000)

ปัจจุบันเทคนิค rRNA approach ซึ่งอาศัยข้อมูลจากยีน rRNA โดยเฉพาะอย่างยิ่ง 16S และ 23S rRNA ของโปรคาริโอต (prokaryotes) เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูงในการศึกษาชุมชนแบคทีเรีย เทคนิคดังกล่าวนอกจากจะทำให้สามารถนับปริมาณหรือสัดส่วนของแบคทีเรียได้แล้วยังสามารถจำแนกประเภทของแบคทีเรียได้จากความสัมพันธ์ตามสายวิวัฒนาการ (phylogenetics) ในระบบนิเวศต่างๆ ได้ (Amann *et al.*, 1995) เทคนิค Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) เป็นส่วนหนึ่งของเทคนิค rRNA approach โดยอาศัยข้อมูลจากฐานข้อมูลยีน rRNA เป็นจำนวนมากที่สามารถเข้าไปใช้ได้อย่างสะดวกโดยผ่านระบบเครือข่ายคอมพิวเตอร์ เช่น Ribosomal Database Project (RDP) ที่มีความทันสมัยในการออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์โพรบ (Oligonucleotide probe) (Amann *et al.*, 1997) โอลิโกนิวคลีโอไทด์โพรบที่ใช้มักจะเป็น DNA ที่มีความยาวประมาณ 20 นิวคลีโอไทด์ ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง (fluorochrome) เรียกสั้นๆ ว่า โพรบ มีความจำเพาะกับแบคทีเรียตั้งแต่ระดับไฟลัมไปจนถึงสปีชีส์ โดยมีเป้าหมายอยู่ที่ rRNA ซึ่งอยู่บนไรโบโซมที่มีปริมาณมากคือ ประมาณ 10,000 หน่วยต่อเซลล์ (Amann *et al.*, 1997) เมื่อโพรบจับกับเป้าหมายก็สามารถตรวจสอบได้จากการเรืองแสง ดังนั้นการศึกษานิเวศวิทยาของจุลินทรีย์โดยใช้เทคนิคชีวโมเลกุลจะทำให้ทราบถึงชนิด และจำนวนของจุลินทรีย์ในที่อยู่อาศัยอย่างแท้จริง ซึ่ง

ปัจจุบันเทคนิค FISH เป็นเทคนิคที่ได้รับการยอมรับและใช้ในการศึกษาจุลินทรีย์ในสภาพแวดล้อมต่างๆ อย่างแพร่หลาย เช่น ระบบบำบัดน้ำเสีย, ตะกอนดิน, แหล่งน้ำธรรมชาติ หรือศึกษาจุลินทรีย์ที่อาศัยร่วมกับสิ่งมีชีวิตอื่น (symbiosis) เป็นต้น (Amann *et al*., 2001; Moter and Gobel, 2000)

ปัจจุบันมีการนำเทคนิค FISH ไปประยุกต์ใช้ตรวจสอบแบคทีเรียบนเนื้อเยื่อโดยตรงในงานหลายด้าน เช่น การตรวจสอบแบคทีเรีย *Helicobacter pylori* ที่ดื้อยาในกระเพาะอาหารมนุษย์ (Trebesius *et al*., 2000) แบคทีเรีย *Brachyspira* (*Serpulina*) *pilosicoli* ที่ก่อโรคในลูกสุกร (Jensen *et al*., 2000) แบคทีเรียที่ก่อโรค Lyme borreliosis ในไรซึ่งเป็นพาหะนำโรคไปสู่สัตว์มีกระดูกสันหลัง (Hammer *et al*., 2001) และแบคทีเรียในฟองน้ำ (Manz *et al*., 2000) เป็นต้น อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังไม่มีรายงานการนำเอาเทคนิค FISH มาใช้ในการศึกษาแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารของกุ้งมีเพียงรายงานถึงการใช้เทคนิค FISH ในการตรวจสอบการติดโรคที่เกิดจากแบคทีเรีย Necrotizing Hepatopancreatitis bacterium ในเซลล์ตับอ่อนของกุ้งขาวในสหรัฐอเมริกา (Loy *et al*., 1996)

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาวิธีเตรียมลำไส้บดและเนื้อเยื่อลำไส้ของกุ้งขาวโดยใช้เทคนิค Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

2. คัดเลือกเชื้อ *Bacillus* sp. และ *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อ *V. harveyi* และ *V. parahaemolyticus*

3. ศึกษาประสิทธิภาพและผลการประยุกต์ใช้โปรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งขาว รวมถึงติดตามการคงอยู่ของโปรไบโอติกในระบบทางเดินอาหารของกุ้งขาวโดยใช้เทคนิค FISH