5. สรุป

ตรวจนับจำนวนแบคทีเรียแลกติกที่พบในทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำปกติและกุ้งกุลาดำเป็นโรคพบว่าจำนวนของแบคทีเรียแลกติกในทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำปกติอยู่ในช่วง <20 – 1.2 x 10^5 CFU/g และปริมาณของแบคทีเรียแลกติกที่พบในระบบทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำเป็นโรคอยู่ในช่วง1.4 x 10^2 - 1.5 x 10^5 CFU/g และเมื่อนำข้อมูลมาทดสอบทางสถิติพบว่าปริมาณแบคทีเรียแลกติกที่พบในทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำปกติและแบคทีเรียแลกติกที่พบในทางเดินอาหารกุ้งเป็นโรคไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) และปริมาณแบคทีเรียแลกติกที่พบในทางเดินอาหารแต่ละส่วนของกุ้งกุลาดำปกติและกุ้งเป็นโรคไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P < 0.05) จากผลการตรวจนับแบคทีเรียแลกติกจากทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำปกติและทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำเป็นโรคพบว่าจะพบแบคทีเรียแลกติกมากที่สุดในส่วนของทางเดินอาหารตอนต้นและต่ำสุดในส่วนตับ จากการเก็บตัวอย่างแบคทีเรียแลกติกซึ่งคัดเลือกได้โดยการสังเกตลักษณะโคโลนีจะมีขนาดต่างกัน รวมทั้งทดสอบการย้อมสี แกรม พบว่าติดสีแกรมบวก รูปร่างกลม แท่ง เรียงตัวเป็นคู่ สี่เซลล์ และกระจาย และไม่สร้างเอนไซม์คะตาเลสได้จำนวน 140 สายพันธุ์ จากทางเดินอาหารกุ้งกุลาดำปกติ 20 ตัว และ 10 สายพันธุ์จากกุ้งกุลาดำเป็นโรค 5 ตัว ทำการเทียบเคียงชนิดของแบคทีเรียแลกติกทั้ง 140 สายพันธุ์ จากกุ้งปกติโดยอาศัยคุณสมบัติทางชีวเคมี พบว่าสามารถแบ่งได้ 11 กลุ่มคือ *Lactobacillus salivarius* 18 สายพันธุ์, *Lactobacillus farciminis* 3 สายพันธุ์, *Enterococcus faecalis* 66 สายพันธุ์, *Enterococcus faecium* 38 สายพันธุ์, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 1 สายพันธุ์, *Leuconostoc mesenteroid* 1 สายพันธุ์, *Leuconostoc lactis* 3 สายพันธุ์, *Leuconostoc dextranicum* 2 สายพันธุ์, *Pediococcus halophilus* 4, สายพันธุ์ *Pediococcus pentosaceus* 2 สายพันธุ์ และ *Streptococcus duran* 2 สายพันธุ์ ทั้งนี้พบว่า *Enterococcus faecium* พบได้ทั้งในกุ้งปกติและกุ้งเป็นโรค โดยพบ *E. faecium* 10 สายพันธุ์จากกุ้งกุลาดำเป็นโรค 3 ตัว และ 38 สายพันธุ์จากกุ้งกุลาดำปกติ 9 ตัว อย่างไรก็ตามจะพบ *E. faecalis* 66 สายพันธุ์ จากกุ้ง

กุลาดำปกติ 11 ตัว หลังจากนั้นนำแบคทีเรียแลกติกทั้ง 150 สายพันธุ์มาทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกคือ สามารถทนต่อ pH ต่ำ สามารถย่อย แป้ง ไขมัน เจริญในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน การยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ 21 สายพันธุ์ โดยวิธี agar spot สามารถคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกได้ 9 สายพันธุ์ได้แก่ *L. dextranicum* AM20, *E. faecalis* AM35, *P. halophilus* AM46, *E. faecalis* AM92, *L. salivarius* AM101, *E. faecalis* AM107, *L. salivarius* AM111, *L. farciminis* AM115 และ *E. faecium* AM119 นำมาทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยวิธี well diffusion โดยใช้ *V. harveyi* และ *V. parahaemolyticus* เป็นแบคทีเรียอินดิเคเตอร์พบว่าแบคทีเรียแลกติกทั้ง 9 สายพันธุ์สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ จากการศึกษาการเจริญและความสัมพันธ์ในการการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์พบว่าแบคทีเรียแลกติกทั้ง 9 สายพันธุ์มี generation time อยู่ในช่วง 72 - 134 นาที โดยที่สายพันธุ์ *L. farciminis* AM115 มี generation time น้อยที่สุดคือ 72 นาทีและพบว่าในชั่วโมงที่ 36 ของการเจริญ ซึ่งอยู่ในช่วง satationary phase แบคทีเรียแลกติกทั้ง 9 สายพันธุ์จะให้ Inibition zone ต่อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์สูงสุด

จากการศึกษา pH และ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างสารยับยั้งของแบคทีเรียแลกติกทั้ง 9 สายพันธุ์ พบว่าที่ pH 6.0 และที่อุณหภูมิ 35 $^{\circ}$C ให้ผลการเจริญและสร้างสารยับยั้งได้ดี เนื่องจากที่ pH และอุณหภูมิดังกล่าวแบคทีเรียแลกติกจะให้ผลการเจริญสูงสุดโดยวัดจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตรและการสร้างสารยับยั้ง *V. harveyi* และ *V. parahaemolyticus* ได้ศึกษาชนิดของสารยับยั้งของแบคทีเรียแลกติกต่อ *V. harveyi* ในสภาวะต่าง ๆ โดยวิธี well diffusion พบว่าแบคทีเรียแลกติกสามารถยับยั้ง *V. harveyi* ได้ทุกสภาวะแต่ที่ดีที่สุดคือสภาวะที่ไม่จำกัดน้ำตาลและอากาศ เมื่อนำแบคทีเรียแลกติกทั้ง 9 สายพันธุ์ ไปผสมในอาหารกุ้งกุลาดำสำเร็จรูปโดยใช้แบคทีเรียแลกติกที่มีปริมาณ 10^8 CFU/ml ในอัตราส่วน 1 มิลลิลิตร/อาหารกุ้ง 25 กรัม โดยให้กุ้งกุลาดำได้รับอาหารที่ผสมแบคทีเรียแลกติกเป็นเวลา 30 วัน พบว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *E. faecalis* AM35 และ *L. salivarius* AM111 มีอัตรา

การรอดตาย 100% สำหรับกุ้งกุลาดำกลุ่มควมคุมซึ่งไม่ได้รับแบคทีเรียแลกติกมีอัตรา การรอดตาย 76.66% แต่เมื่อทดสอบทางสถิติพบว่าอัตราการรอดตายของกุ้งกุลาดำทั้ง สองกลุ่มไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) และพบว่าอัตราการเจริญต่อวันของ กุ้งกุลาดำอยู่ในช่วง 4.16-4.66 กุ้งกุลาดำที่ได้รับแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *L. salivarius* AM101 มีอัตราการเจริญต่อวันสูงสุด 4.66 และในกลุ่มควบคุมมีอัตราการเจริญต่อวัน ต่ำสุด 4.16 แต่เมื่อทดสอบทางสถิติพบว่าอัตราการเจริญของกุ้งกุลาดำทั้งสองกลุ่มไม่ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) และเมื่อทำการตรวจนับแบคทีเรียแลกติกจาก ทางเดินอาหารกุ้งกุลาดำที่ได้รับแบคทีเรียแลกติกพบว่าปริมาณแบคทีเรียแลกติกอยู่ใน ช่วง 2.4×10^2 - 1.0×10^5 CFU/g พบว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *L. salivarius* AM111 พบปริมาณแบคทีเรียแลกติกสูงสุด 1.0×10^5CFU/g กลุ่มควบคุมมี ปริมาณแบคทีเรียแลกติกน้อยสุด 1.1×10^2 CFU/g เมื่อทดสอบทางสถิติพบว่าจำนวน แบคทีเรียแลกติกทั้งสองกลุ่มไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) และเมื่อ ตรวจนับจำนวน *Vibrio sp.*จากทางเดินอาหารกุ้งกุลาดำที่ได้รับแบคทีเรียแลกติกพบว่ามี *Vibrio sp.* อยู่ในช่วง 1.6×10^4 - 1.9×10^5 CFU/g ในกลุ่มควบคุมมีปริมาณ *Vibrio sp.* 1.1×10^5 CFU/g เมื่อทดสอบทางสถิติพบว่าจำนวน *Vibrio sp.* ที่พบในทางเดินอาหาร ของกุ้งกุลาดำกลุ่มควบคุมมากกว่ากลุ่มที่ได้รับโปรไบโอติกกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ในชุดทดลองที่ 2 และ 5 ซึ่งได้รับแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *E. faecalis* AM35 และ *L. salivarius* AM101 หลังจากนั้นนำแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากทางเดิน อาหารของกุ้งกุลาดำทั้ง 10 ชุดทดลอง มาทดสอบเอกลักษณ์พบว่าติดสีแกรมบวก รูปร่างกลม แท่ง เรียงตัวเป็นคู่และกระจาย ไม่สร้างเอนไซม์คะตาเลส ซึ่งมีลักษณะ คล้ายคลึงกับแบคทีเรียแลกติกที่ผสมในอาหารให้แก่กุ้งกุลาดำ

จากการทดสอบความต้านทานของกุ้งกุลาดำต่อการเกิดโรคจากการฉีดเชื้อ *V. harveyi* ที่มีปริมาณเชื้อ 10^7 CFU/ml ปริมาตรตัวละ 0.1 มิลลิลิตร ต่อกุ้งกุลาดำ 1 ตัว หลังจากนั้นติดตามอัตราการรอดตายของกุ้งกุลาดำพบว่ากุ้งกุลาดำ 9 ชุดการ ทดลองที่ได้รับแบคทีเรียแลกติกมี 4 ชุดทดลองมีอัตราการรอดตาย 100% คือชุดการ ทดลองที่ 2, 6, 7 และ 8 ซึ่งได้รับแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *E. faecalis* AM35,

E. faecium AM107, *L. salivarius* AM111 และ *L. farciminis* AM115 ตามลำดับ สำหรับกลุ่มควบคุมมีอัตราการรอดตาย 50% เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าอัตราการรอดตายของกุ้งกุลาดำทั้งสองกลุ่มแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ในทุกชุดการทดลองที่ได้รับแบคทีเรียแลกติก และพบว่ากุ้งที่ตายติดเชื้อ *V. harveyi* จะมีลักษณะอ่อนเพลียไม่กินอาหาร ว่ายน้ำอยู่บริเวณผิวน้ำ ตับมีสีซีดลง ซี่เหงือกมีสีดำ สีลำตัวขุ่น เมื่อทำการแยกเชื้อ *V. harveyi* จากส่วนของทางเดินอาหารและกล้ามเนื้อของกุ้งกุลาดำที่ตายมาตรวจสอบพบว่าติดสีแกรมลบ รูปร่างแท่งโค้งเล็กน้อย สามารถเจริญและให้โคโลนีสีเขียวบนอาหาร TCBS และเรืองแสงบนอาหาร TSA ที่เติม 1.5% โซเดียมคลอไรด์

จากการทดลองในครั้งนี้สรุปได้ว่าแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ทั้ง 9 สายพันธุ์มีคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกเมื่อนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำพบว่ามี 4 สายพันธุ์ คือ *E. faecalis* AM35, *E. faecium* AM107, *L. salivarius* AM111 และ *L. farciminis* AM115 มีอัตราการรอดตายหลังจากการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคโดย *V. harveyi* 100% จึงมีความเหมาะสมที่จะนำแบคทีเรียแลกติกทั้งสี่สายพันธุ์ดังกล่าวไปพัฒนาเพื่อให้มีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำให้ดียิ่งขึ้น