3. ผลการทดลองและวิจารณ์

การตรวจนับจำนวนแบคทีเรียแลกติก

จากการนับจำนวนของแบคทีเรียแลกติกทั้งหมดที่พบในทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำปกติ 20 ตัว และกุ้งกุลาดำเป็นโรค 5 ตัว ที่แบ่งทางเดินอาหารออกเป็น 5 ส่วน คือ ส่วนปาก-กระเพาะ ตับ ลำไส้ส่วนต้น ลำไส้ส่วนปลายและส่วนซีกัม จากกุ้งกุลาดำปกติ 20 ตัว พบแบคทีเรียแลกติกอยู่ในช่วง <20 – 1.2 x 10^5 CFU/g พบว่าในส่วนปาก-กระเพาะมีจำนวนแบคทีเรียแลกติกเฉลี่ย 9.2 x 10^3 CFU/g โดยมีปริมาณแบคทีเรียแลกติกอยู่ในช่วง 0.7 x 10^2 - 1.1 x 10^5 CFU/g สำหรับส่วนที่ 2 ซึ่งเป็นส่วนตับพบแบคทีเรียแลกติกเฉลี่ย 5.2 x 10^2 CFU/g โดยมีปริมาณแบคทีเรียแลกติกอยู่ในช่วง <20 - 2.3 x 10^3 CFU/g ในส่วน ลำไส้ส่วนต้นพบปริมาณแบคทีเรียแลกติกเฉลี่ย 1.3 x 10^4 CFU/g โดยมีปริมาณแบคทีเรียแลกติกอยู่ในช่วง 1.7 x 10^2 - 1.2 x 10^5 CFU/g ในลำไส้ส่วนปลายพบปริมาณแบคทีเรีย แลกติกเฉลี่ย 8.9 x 10^3 CFU/g และมีปริมาณแบคทีเรียแลกติกอยู่ในช่วง <20 - 2.8 x 10^4 CFU/g และส่วนสุดท้ายคือส่วนซีกัมพบว่ามีปริมาณแบคทีเรียแลกติกเฉลี่ย 1.0 x 10^4 CFU/g และพบว่ามีปริมาณแบคทีเรียแลกติกอยู่ในช่วง <20 - 6.4 x 10^4 CFU/g ซึ่งจากผลการตรวจนับแบคทีเรียแลกติกจะเห็นได้ว่าจะพบปริมาณแบคทีเรียแลกติกโดยเฉลี่ยสูงสุดที่ลำไส้ส่วนต้นและต่ำสุดในส่วนตับ (ตารางที่ 6)

จากการนับจำนวนของแบคทีเรียแลกติกที่พบในทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำเป็นโรค 5 ตัว พบแบคทีเรียแลกติกอยู่ในช่วง 1.4 x 10^2 - 1.5 x 10^5 CFU/g พบว่าแบคทีเรียแลกติกที่พบในส่วนปาก-กระเพาะเฉลี่ย 2.7 x 10^4 CFU/g โดยมีปริมาณแบคทีเรียแลกติกอยู่ในช่วง 8.1 x 10^2 - 1.5 x 10^5 CFU/g ในส่วนของตับพบแบคทีเรียแลกติกเฉลี่ย 6.3 x 10^2 CFU/g โดยมีปริมาณแบคทีเรียแบคทีเรียแลกติกอยู่ในช่วง 2.9 x 10^2 - 1.7 x 10^3 CFU/g สำหรับในส่วนทางเดินอาหารตอนต้นมีปริมาณแบคทีเรียแลกติกเฉลี่ย 3.7 x 10^4 CFU/g

โดยมีปริมาณแบคทีเรียแลกติกอยู่ในช่วง 1.8×10^3 - 1.2×10^5 CFU/g สำหรับส่วนทางเดินอาหารตอนปลายพบปริมาณแบคทีเรียแลกติกเฉลี่ย 2.3×10^4 CFU/g โดยมีปริมาณแบคทีเรียแลกติกอยู่ในช่วง 1.5×10^4 - 2.8×10^4 CFU/g และส่วนสุดท้ายคือส่วนซีกัมมีปริมาณแบคทีเรียแลกติกเฉลี่ย 2.5×10^4 CFU/g โดยมีปริมาณแบคทีเรียแลกติก อยู่ในช่วง 5.0×10^2 - 6.4×10^4 CFU/g ซึ่งจากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าแบคทีเรียแลกติกในทางเดินอาหารของกุ้งเป็นโรคโดยเฉลี่ยสูงสุดจะพบในส่วนของลำไส้ส่วนต้นและต่ำสุดในส่วนของตับ (ตารางที่ 7)

จากการนำผลการตรวจนับแบคทีเรียแลกติกมาทดสอบทางสถิติซึ่งประมวลผลโดยโปรแกรม SPSS เพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของแบคทีเรียแลกติกที่พบในกุ้งปกติและกุ้งเป็นโรคและความแตกต่างของแบคทีเรียแลกติกที่พบในแต่ละส่วนของกุ้งปกติและกุ้งเป็นโรคที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่าจำนวนของแบคทีเรียแลกติกทั้งหมดที่พบในทางเดินอาหารกุ้งปกติและกุ้งเป็นโรคไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) และจำนวนของแบคทีเรียแลกติกที่พบได้ในแต่ละส่วนของทางเดินของกุ้งปกติและกุ้งเป็นโรคไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) จากการศึกษาของสุรศักดิ์ (2544) พบว่าในกุ้งกุลาดำที่แข็งแรงนั้นจะมีจุลินทรีย์บางสายพันธุ์ครอบครองพื้นที่ในระบบทางเดินอาหารเสมอ ในขณะที่กุ้งที่อ่อนแอหรือกุ้งเป็นโรคจะไม่มีจุลินทรีย์ดังกล่าวหรือมีน้อยมากซึ่งคาดว่าการยึดครองพื้นที่นี้จะช่วยป้องกันการติดเชื้อได้ดียิ่งขึ้นเนื่องจากถ้ามีแบคทีเรียแลกติกเจริญอยู่ในลำไส้ซึ่งแบคทีเรียแลกติกสามารถสร้างกรดแลกติกทำให้ภายในลำไส้มีสภาวะเป็นกรดทำให้เชื้อก่อโรคไม่สามารถทนอยู่ในสภาวะที่เป็นกรดได้

Conway (1996) พบว่าแบคทีเรียแลกติกสามารถเจริญได้ในบริเวณทางเดินอาหารของสัตว์บก (Terrestrial animal) และเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่น (normal flora) ที่สำคัญ และจากการรายงานของ Gournier-Chatean *et al*. (1994) พบว่าแบคทีเรียแกรมบวก facultative anaerobe เป็นจุลินทรีย์ที่มีบทบาทในลำไส้ของคนและสัตว์

ตารางที่ 6 จำนวนแบคทีเรียแลกติกที่พบในทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำปกติแต่ละส่วน

ตัวที่	Lactic acid bacteria (CFU/g)				
	ปาก-กระเพาะ	ตับ	ลำไส้ส่วนต้น	ลำไส้ส่วนปลาย	ซีกัม
1	$8.9x10^3$	$2.3 x10^3$	$1.6 x10^3$	$5.5 x10^3$	$9.3 x10^3$
2	$8.4 x10^3$	$5.1 x10^2$	$7.0 x10^3$	$1.7 x10^4$	$3.7 x10^3$
3	$3.6 x10^3$	$3.1 x10^2$	$6.0 x10^3$	$6.7 x10^2$	$4.2 x10^4$
4	$7.7 x10^3$	$1.9 x10^2$	$2.2 x10^4$	$3.3 x10^3$	$5.9 x10^3$
5	$5.0 x10^3$	$5.1 x10^2$	$1.5 x10^4$	$1.1 x10^4$	$1.5 x10^4$
6	$1.1x10^5$	$2.9 x10^2$	$1.2 x10^5$	$2.0 x10^4$	$5.0 x10^2$
7	$5.0x10^2$	$1.7 x10^3$	$6.2 x10^3$	$1.5 x10^4$	$4.0 x10^4$
8	$1.3x10^4$	$1.4 x10^2$	$3.1 x10^4$	$2.7 x10^4$	$1.3 x10^4$
9	$2.0 x10^4$	$7.1 x10^2$	$2.0 x10^4$	$2.4 x10^4$	$6.4 x10^4$
10	$8.1 x10^2$	$2.9 x10^2$	$1.8 x10^3$	$2.8 x10^4$	$9.1 x10^3$
11	$0.7 x10^2$	$2.1 x10^2$	$2.9 x10^3$	<20	<20
12	$1.2 x10^3$	$6.1 x10^2$	$4.6 x10^3$	$3.6 x10^3$	<20
13	$3.7 x10^2$	$0.1 x10^2$	$2.4 x10^3$	$8.0 x10^3$	<20
14	$1.0 x10^3$	$6.1 x10^2$	$6.3 x10^3$	$3.5 x10^3$	<20
15	$4.7 x10^2$	$3.7 x10^2$	$3.5 x10^3$	$2.2 x10^3$	$2.6 x10^3$
16	$1.9 x10^3$	$1.2 x10^3$	$4.6 x10^3$	$9.2 x10^3$	<20
17	$5.7 x10^2$	<20	$2.5 x10^2$	$8.2 x10^2$	<20
18	$7.7 x10^2$	$1.2 x10^2$	$4.4 x10^3$	$2.5 x10^2$	<20
19	$8.7 x10^2$	$1.5 x10^2$	$1.7 x10^2$	$2.2 x10^2$	<20
20	$7.8 x10^2$	$2.5 x10^2$	$4.4 x10^2$	$2.5 x10^2$	<20
X ± SD	$9.2 x10^3 \pm 2.4 x10^4$	$5.2 x10^2 \pm 5.6 x10^2$	$1.3 x10^4 \pm 2.5 x10^4$	$8.9 x10^3 \pm 9.3 x10^3$	$1.0 x10^4 \pm 1.8 x10^4$

ตารางที่ 7 จำนวนแบคทีเรียแลกติกที่พบในทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำเป็นโรค แต่ละส่วน

ตัวที่	จำนวนแบคทีเรียแลกติก (CFU/g)				
	ปาก-กระเพาะ	ตับ	ลำไส้ส่วนต้น	ลำไส้ส่วนปลาย	ซีกัม
1	1.5×10^5	2.9×10^2	1.2×10^5	2.0×10^4	5.0×10^2
2	5.0×10^2	1.7×10^3	6.2×10^3	1.5×10^4	4.0×10^4
3	1.3×10^4	1.4×10^2	3.1×10^4	2.7×10^4	1.3×10^4
4	2.0×10^4	7.1×10^2	2.0×10^4	2.4×10^4	6.4×10^4
5	8.1×10^2	2.9×10^2	1.8×10^3	2.8×10^4	9.1×10^3
X ±SD	$2.7 \times 10^4 \pm 5.1 \times 10^4$	$6.3 \times 10^2 \pm 6.5 \times 10^2$	$3.7 \times 10^4 \pm 5.2 \times 10^4$	$2.3 \times 10^4 \pm 5.3 \times 10^3$	$2.5 \times 10^4 \pm 2.6 \times 10^4$

ปกติในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ทุกชนิดมีจุลินทรีย์ในปริมาณหนึ่งเพื่อทำหน้าที่ย่อยสลายอาหารและเพิ่มการดูดซึมของอาหารให้ดีขึ้นซึ่งจากการรายงานของ Dempsey *et al*. (1989) ได้ศึกษาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่แยกได้จากตัวอย่างบริเวณ ทางเดินอาหารของกุ้งสีน้ำตาล (*Penaeus aztecus*) มีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง $7.5 \times 10^6 - 2.6 \times 10^7$ CFU/g ซึ่งต่อมา Yuthachi และคณะ (1990) ได้ทำการตรวจนับแบคทีเรียทั้งหมดที่แยกได้จากตัวอย่างบริเวณทางเดินอาหารกุ้งกุลาดำพบว่ามีจำนวนแบคทีเรีย $7.5 \times 10^6 - 1.3 \times 10^7$ CFU/g วรรณนิภา (2539) ได้ศึกษาแบคทีเรียทั้งหมดที่แยกได้จากทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำและน้ำจากบ่อเลี้ยงกุ้งพบว่าในทางเดินอาหารกุ้งกุลาดำมีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด $1.2 \times 10^6 - 3.4 \times 10^7$ CFU/g และในน้ำมีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด $1.0 \times 10^4 - 4.4 \times 10^5$ CFU/ml ลิลา (2540) ได้ทำการศึกษาแบคทีเรียในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำพบว่ามีปริมาณแบคทีเรียรวมอยู่ในน้ำถึง $10^2 - 10^4$ cell/ml และจากการรายงานของ Ringo *et al*. (2000) ได้ทำการศึกษาปริมาณของแบคทีเรียแลกติกที่อยู่ในทางเดินอาหารของปลา

Atlantic Salmon (*Salmo salar L.*) พบว่ามีปริมาณของแบคทีเรียแลกติกอยู่ประมาณ 2 x 10^3 CFU/g

การแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติกให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์

การแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติกจากทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำตัวเต็มวัย 2 ประเภท คือ กุ้งปกติ 20 ตัวและกุ้งเป็นโรค 5 ตัว โดยแบ่งส่วนทางเดินอาหารออกเป็น 5 ส่วนคือ ส่วนปาก-กระเพาะ ตับ ทางเดินอาหารตอนต้น ทางเดินอาหารตอนปลายและส่วนซีกัม โดยใช้วิธี pour plate technique ในอาหารแข็ง MRS ที่เติม 1% แคลเซียมคาร์บอร์เนต และ 1.5% โซเดียมคลอไรด์ บ่มที่ 35°C เป็นเวลา 7 วันคัดเลือกโคโลนีของแบคทีเรียแลกติกที่มีลักษณะเป็นรูปกระสวยขนาดประมาณ 0.5 - 3 มิลลิเมตร มีวงใสรอบโคโลนีเนื่องจากการสร้างกรดของแบคทีเรียแลกติกที่สามารถย่อยแคลเซียมคาร์บอร์เนต สุ่มเลือกโคโลนีเดี่ยว ๆ ที่มีลักษณะต่างกัน เช่น ขนาดของโคโลนี ขอบเรียบ ขอบหยัก หลังจากนั้นนำโคโลนีที่ได้ไป streak บนอาหารแข็ง MRS เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์จากนั้นนำไปทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลสซึ่งจะให้ผลลบและให้ผลการย้อมสีแกรมเป็นแกรมบวก รูปร่างกลม หรือเป็นแท่ง ส่วนการเรียงตัว กระจาย เรียงตัวแบบคู่ เรียงตัวแบบสี่เซลล์หรือเรียงติดกันเป็นสาย และเก็บเชื้อใน 20% กลีเซอรอลที่อุณหภูมิ –70°C

จัดกลุ่มและพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียแลกติกที่ได้จากทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำโดยลักษณะทางสัณฐานทางสรีรวิทยา

แบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำทั้ง 25 ตัวซึ่งแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ กุ้งปกติและกุ้งเป็นโรค ได้แยกแบคทีเรียแลกติกได้ 140 สายพันธุ์จากกุ้งปกติ และ 10 สายพันธุ์จากกุ้งเป็นโรค เมื่อเทียบเคียงชนิดตาม Bergey 's manual determinative bacteriology volume 2 (Kandler and Weiss, 1986) และ The genera of lactic acid bacteria (Wood and Holzapfel, 1995) และ Lactic acid bacteria (Salminen

and Wright, 1993) สามารถจัดจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีได้ 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 (ภาคผนวก ค. ตารางที่ 1) จากกุ้งกุลาดำปกติ และแบคทีเรียแลกติกจากทางเดินอาหารกุ้งเป็นโรคจะพบแต่ *Enterococcus faecium* (10) และเมื่อจัดจำแนกแบคทีเรียแลกติกที่พบในแต่ละส่วนของกุ้งกุลาดำปกติ (ตารางที่ 8) พบว่าในส่วนปากถึงกระเพาะจะมีความหลากหลายของแบคทีเรียแลกติกมากที่สุดถึง 7 สกุลจะเห็นได้ว่าจะพบ *E. faecalis* และ *E. faecium* ในทุกส่วนของกุ้งกุลาดำโดยจะพบ *E. faecalis* 63 สายพันธุ์ รองลงมาคือ *E. faecium* 38 สายพันธุ์ และพบว่าแบคทีเรียแลกติกที่พบในแต่ละส่วนของกุ้งกุลาดำเป็นโรค (ตารางที่ 9) จะพบแบคทีเรียแลกติกได้เฉพาะในส่วนของปาก-กระเพาะ ตับ ลำไส้ส่วนต้น ลำไส้ส่วนปลาย และจะพบแต่ *E. faecium* เท่านั้นหรือไม่พบเลย เนื่องจากในทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำเป็นโรคถูกบุกรุกโดยเชื้อก่อโรคทำให้ จุลินทรีย์ประจำถิ่นเสียสมดุลจากการทดลองสามารถสรุปได้ว่า *E. faecalis* และ *E. faecium* เป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่สำคัญในทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำซึ่งจะเห็นได้ว่า จากกุ้งกุลาดำ ปกติ 20 ตัว พบว่า *E. faecalis* มีความถี่ในกุ้งกุลาดำ 11 ตัว และจะพบ *E. faecium* ในกุ้งกุลาดำปกติ 9 ตัว (ตารางที่ 10) และจะพบ *E. faecium* ในกุ้งกุลาดำป่วย 3 ตัว (ตารางที่ 11)

นอกจากกุ้งแล้วสามารถพบแบคทีเรียแลกติกได้ในลำไส้ของปลาโดยแบคทีเรียแลกติกเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นจึงสามารถจัดได้ว่าเป็นแบคทีเรียที่ไม่ก่อให้เกิดโรค (Verschuere *et al*., 2000; Strom and Olfasen, 1990; Ringo and Strom, 1994; Ringo *et al*., 1998 และ Roberson *et al*., 2000) แบคทีเรียประจำถิ่นในทางเดินอาหารกุ้งที่แยกได้จากกุ้งต่างถิ่นกันจะพบแบคทีเรียแตกต่างกันเนื่องจากอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมที่กุ้งอาศัยอยู่ทั้งนี้แบคทีเรียที่พบได้ในทางเดินอาหารจะพบได้ในน้ำเลี้ยงกุ้งด้วย (Yuthachit *et al*., 1990) จากการรายงานของ Gournier-Chatean *et al*. (1994) ซึ่งได้ศึกษาจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่พบได้ในลำไส้ของ *Penaeus japonicus* เป็นชนิดเดียวกันกับที่พบในน้ำทะเลและกลุ่มจุลินทรีย์อาจมาจากการรับจุลินทรีย์ผ่านทางอาหารนอกจากนี้ในหอย 2 ฝาจะพบจุลินทรีย์ประจำถิ่นมีความใกล้เคียงกับจุลินทรีย์ที่พบได้ในน้ำทะเล และตะกอนดิน (Sugita *et al*., 1981 และ Prieur, *et al*., 1990) และจากการศึกษาของ Cahill *et al*. (1990) พบว่าแบคทีเรียที่พบใน สิ่งแวดล้อมในน้ำมีอิทธิพลต่อองค์ประกอบของจุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้ซึ่งจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่พบในลำไส้มาจากสิ่งแวดล้อม อาหาร ซึ่งจากการรายงานของ Tanasomwang and Muroga (1989) และ Ringo *et al*. (1995) พบว่าจุลินทรีย์ประจำถิ่นในระยะตัวอ่อน และระยะ juvenile ของปลา อาหารจะมีอิทธิพลต่อจุลินทรีย์ประจำถิ่นอย่างชัดเจนเนื่องมาจากการได้รับ live food organisms โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระหว่าง first feeding (Munro *et al*., 1993 และ Bergh *et al*., 1994) นอกจากนี้ยังพบว่าการเปลี่ยนแปลงความเค็มอาจจะมีผลต่อจุลินทรีย์ประจำถิ่นเนื่องจากพวก marine finfish จำเป็นต้องมีการนำน้ำเข้าสู่ร่างกายตลอดเวลาเพื่อป้องกันการสูญเสียน้ำออกจากร่างกาย การไหลของน้ำผ่าน filter-feeder ของหอย 2 ฝา ตัวอ่อนของกุ้งและ live food organisms เป็นอิทธิพลที่มีความสำคัญอย่างยิ่งในตัวอ่อนที่ยังไม่มี gastric barrier ดังนั้น จุลินทรีย์ในลำไส้ของสัตว์น้ำอาจเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วเมื่อถูกบุกรุกด้วยจุลินทรีย์ที่มาจากน้ำและอาหาร

คัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีสมบัติในการเป็นโปรไบโอติก

นำแบคทีเรียแลกติกทั้ง 150 สายพันธุ์ที่แยกได้จากทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำมาทดสอบการทนต่อ pH ต่ำ คือ 1 – 5 พบว่าแบคทีเรียแลกติกสามารถเจริญได้ดีที่ pH 5 และ pH 4 แต่ไม่เจริญที่ pH 3 2 และ 1 และพบว่า แบคทีเรียแลกติกทั้ง 150 สายพันธุ์ ไม่สามารถย่อยโปรตีนได้ แต่สามารถย่อยแป้งได้ 7 สายพันธุ์ ย่อยไขมันได้ 21 สายพันธุ์ และเจริญในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนได้ 150 สายพันธุ์ (ภาคผนวก ค. ตารางที่ 2) เนื่องจากในระบบทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำมี pH ประมาณ 5.5 – 6.0 (มนตรี และ เกศินี, 2545) ซึ่งค่าปกตินี้จะทำให้เอนไซม์น้ำย่อยรวมถึงจุลินทรีย์ประจำถิ่นต่าง ๆ ภายในลำไส้ทำงานได้อย่างดี การย่อยและการดูดซึมอาหารเป็นไปได้อย่างมีประสิทธิภาพเชื้อก่อโรคต่าง ๆ ซึ่งไม่ใช่จุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้ไม่สามารถเจริญเติบโตได้เต็มที่เพราะไม่สามารถทนต่อสภาวะความเป็นกรดภายในลำไส้ได้ซึ่งสภาวะความเป็นกรดในลำไส้นั้นค่อนข้างจะคงที่แต่จะลดความเป็นกรดภายในลำไส้ก็เมื่อกุ้งกินอาหารเข้าไป ซึ่งความสามารถในการทนกรดของเชื้อแต่ละสายพันธุ์นั้นพบว่าสายพันธุ์ของเชื้อมีผลต่อการทนกรดซึ่งจากการรายงานของ Conway (1987) พบว่า *Lactobacillus acidophilus* เป็นสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการทนกรดได้ดีกว่าแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์อื่น ๆ นอกจากนี้แบคทีเรียแลกติกสามารถย่อยแป้งซึ่งเป็นสารคาร์โบไฮเดรตที่ซับซ้อนพวกโพลี่แซกคาไรด์ (polysaccharide) โดยแบคทีเรียแลกติกจะใช้เอนไซม์อะไมเลส (amylase) ในการย่อยแป้ง (กรรณิกา และคณะ, 2531) และสามารถย่อยไขมันได้เนื่องจากแบคทีเรียแลกติกใช้เอนไซม์ลีซิทิเนส (lecitinase) หรือ ฟอสฟาทิเดส (phosphatidase) ในการตัดพันธะฟอสเฟตเอสเทอร์ (phosphate ester bond) การที่แบคทีเรียแลกติกสามารถย่อยแป้งและไขมันได้นั้นจะส่งผลดีต่อการทำงานในกระบวนการย่อยอาหารของกุ้งกุลาดำทำให้กุ้งกุลาดำสามารถดูดซึมสารอาหารไปใช้ได้เร็วขึ้นซึ่งส่งผลต่อการการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำและน้ำหนักกุ้งซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Austin *et al*. (1995) พบว่าแบคทีเรียแลกติกที่สามารถสร้างเอนไซม์ในการย่อย

โปรตีน ไขมัน และแป้ง จะช่วยส่งเสริมการเจริญของสัตว์น้ำ และยังสามารถเจริญได้ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนเนื่องจากแบคทีเรียแลกติกสามารถเจริญเติบโตได้ทั้งในที่มีออกซิเจนไม่มีออกซิเจน และมีออกซิเจนน้อย (Salminen and Wright, 1993) ซึ่งจะเป็นผลดีเมื่อมีการนำแบคทีเรียแลกติกไปใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำสามารถทำให้แบคทีเรียแลกติกสามารถเจริญได้ในลำไส้ของกุ้งกุลาดำ

ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยวิธี agar spot

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยแบคทีเรียแลกติก 150 สายพันธุ์ ที่คัดเลือกได้โดยใช้แบคทีเรียอินดิเคเตอร์ 21 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus cereus*, *Enterobacter aerogenes*, *Edwardsiellar tarda, Escherichia coli* ATCC25922, *E. coli* O157: H7, *Klebsiella pneumoniae*, *M. morgarnii*, *Proteus rettgeri*, *P. mirabilis*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescen*, *Shigella sonei*, *S. flexneri*, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Vibrio parahaemoluticus*, *V. harveyi, V. alginolyticus*, *V. mimicus*, *V. salmonicida*, *V. marinus* และ *V. mediterranei* พบว่าแบคทีเรียแลกติก 150 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้แตกต่างกันและได้ inhibition zone ที่มีขนาดแตกต่างกัน (ภาคผนวก ค. ตารางที่ 5) ซึ่งในการทดลองครั้งนี้สามารถคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกจากทางเดินอาหารกุ้งปกติได้ 9 สายพันธุ์ ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ทั้ง 21 สายพันธุ์และให้ inhibition zone ที่กว้างมากกว่า 5 มิลลิเมตรกับแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ทุกตัวได้แบคทีเรีย 9 สายพันธุ์นั้นได้แก่ *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 (ตารางที่ 12) ซึ่งการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยแบคทีเรียแลกติกนั้นเนื่องจากแบคทีเรียแลกติกสามารถเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสที่เป็นส่วนประกอบปริมาณสูงในอาหาร MRS เป็นกรดแลกติก (กรดอินทรีย์) และบ่มในสภาวะที่มีมีออกซิเจนทำให้แบคทีเรียแลก

ติกสามารถสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ซึ่งทั้งกรดแลกติกและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ (มลิวรรณ, 2542)

ตารางที่ 12 แบคทีเรียแลกติก 9 สายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติก

Strain	**code number**
L. dextranicum	AM20
E. faecalis	AM35
P. halophilus	AM46
E. faecalis	AM92
L. salivarius	AM101
E. faecalis	AM107
L. salivarius	AM111
L. farciminis	AM115
E. faecium	AM119

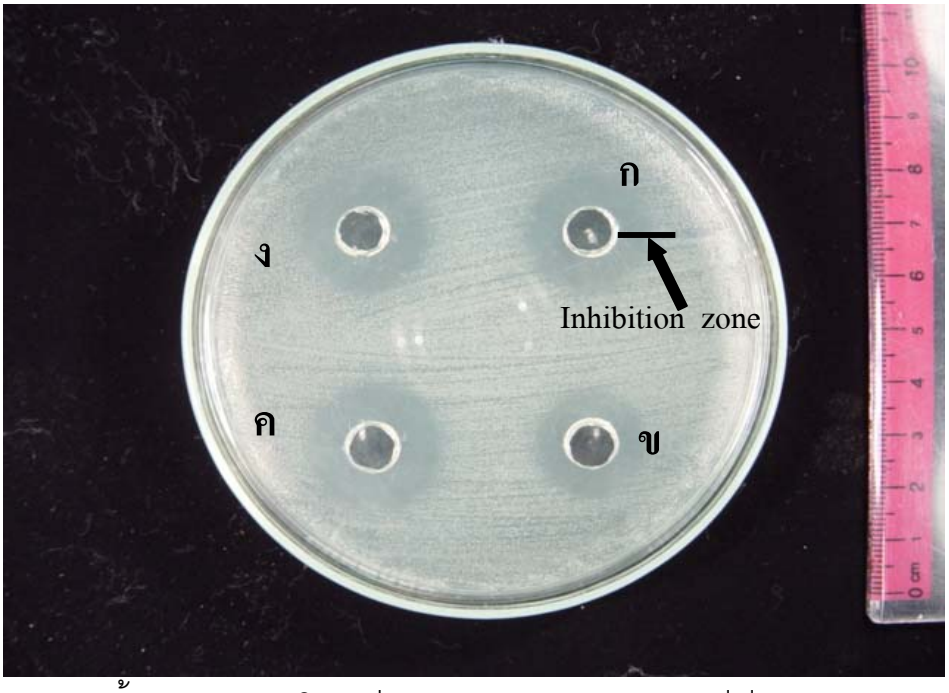
ซึ่งในกระบวนการ metabolisms ของแบคทีเรียแลกติกสามารถผลิต extracelullar product ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อโรคได้แก่ กรดแลกติก (lactic acid) (Lindgeen and Eleustrom, 1978 และ Alakomi *et al*., 2000) กรดอินทรีย์ (organic acid) ได้แก่ อะซิติกแอซิด (Midolo *et al*., 1995) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) (Naidu *et al*., 1999) และ แบคเทอริโอซิน (bacteriocin) (Barefoot and Klaenhammer, 1983 และ Biwas *et al*., 1991) ไดอะซิทิล (diacetyl) (Saarela *et al*.,

2000) สารยับยั้งที่แบคทีเรียแลกติกสร้างขึ้นนั้นสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้หลายชนิด เช่น *Salmonella*, *E. coli*, *Clostridium* และ *Helicobacter* (Saarela *et al*., 2000) ซึ่งทั้งกรดแลกติกและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์นั้นสามารถสร้างได้โดยแบคทีเรียแลกติกทุกสายพันธุ์ (Helander *et al*., 1997) นอกจากนี้แบคเทอริโอซินที่สร้างโดยแบคทีเรียแลกติกสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อื่น ๆ จากรายงานการยับยั้งของแบคเทอริโอซินพบว่าสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ไม่เฉพาะแต่แบคทีเรียแกรมบวกเท่านั้นยังรวมถึงแบคทีเรียแกรมลบอีกด้วยซึ่งโดยส่วนใหญ่เชื้อก่อโรคในสัตว์น้ำจะเป็นแบคทีเรียแกรมลบจึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำแบคทีเรียแลกติกมาใช้ในสัตว์น้ำ (Verschuere *et al*., 2000) จากการศึกษาของ Skytta *et al*. (1992); Helander *et al* . (1997) และ Niku- Paavola *et al*. (1999) พบว่า secondary metabolites ของแบคทีเรียแลกติกสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่เป็นอันตราย ได้แก่ *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Clostridium* และ *Helicobacter* นอกจากนี้ Silva *et al*. (1987) ยังพบว่า *Lactobacillus* สายพันธุ์ GG สามารถผลิตสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำเป็นกรดไขมันสายสั้น ๆ แตกต่างจาก กรดแลกติก และกรดอะซิติก สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียพวก anaerobe ได้แก่ *Clostridium*, *Bacteroid* และพบว่า *Bifidobacterium* สามารถสารยับยั้ง *Enterobacteraceae*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* และ *Streptococcus*

ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยวิธี well diffusion

จากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยวิธี well diffusion โดยใช้แบคทีเรียแลกติกจำนวน 9 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยวิธี agar spot โดยใช้ *V. harveyi* และ *V. parahaemolyticus* เป็นแบคทีเรียอินดิเคเตอร์พบว่าแบคทีเรียแลกติกทั้ง 9 สายพันธุ์สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ทั้ง 2 สายพันธุ์ ดังแสดงผลในรูปที่ 3 และ 4 จาก

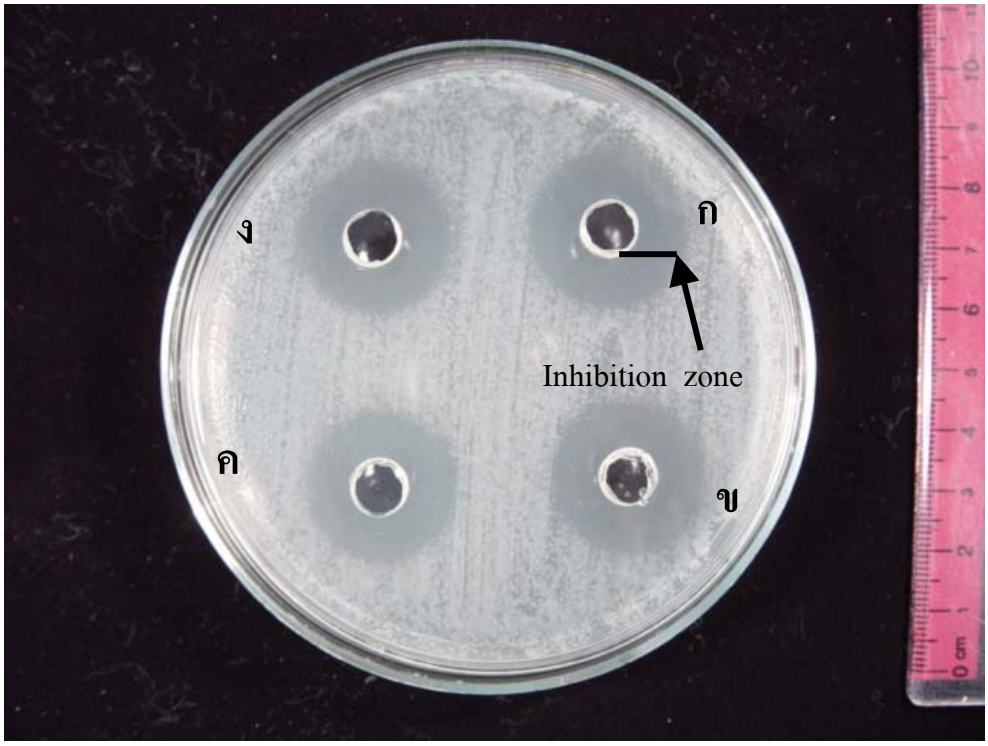
การทดลองของ Villami *et al*. (2002) ได้ทำการศึกษาผลของกรดแลกติกต่อการยับยั้งการเจริญของ *V. alginolyticus* 2 สายพันธุ์ที่แยกจากการเพาะเลี้ยงอาร์ทีเมียและแยกจากตัวอ่อนของปลา turbot ที่เป็นโรคพบว่ากรดแลกติกที่ความเข้มข้น 0.1 และ 0.05 กรัม/ลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของ *V. alginolyticus* ได้นอกจากนี้ Strom (1998); Byun *et al*. (1997) และ Joborn *et al*. (1997) พบว่า *Carnobacterium divergen* และ *Lactobacillus* sp. สามารถต่อต้านเชื้อก่อโรคในปลาซึ่งให้ผลเหมือนกับการทดลองของ Ringo *et al*. (2004) พบว่า *Carnobacterium divergen* สายพันธุ์ 6251 ที่แยกได้จากลำไส้เล็กของปลา Arctic charr (*Salvelinus alpinus L*.) เมื่อทดสอบในห้องปฏิบัติการพบว่าสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถยับยั้งการเจริญ *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, *Vibrio anguillarum* และ *V. viscocus* ได้



รูปที่ 3 ผลการยับยั้ง *V. harveyi* โดยวิธี well diffusion ของแบคทีเรียแลกติก

ก. *L. dextranicum* AM20 ข. *E. faecalis* AM35

ค. *P. halophilus* AM46 ง. *E. faecalis* AM92



รูปที่ 4 ผลการยับยั้ง *V. parahaemolyticus* โดยวิธี well diffusion ของแบคทีเรียแลกติก

ก. *L. dextranicum* AM20 ข. *E. faecalis* AM35

ค. *P. halophilus* AM46 ง. *E. faecalis* AM92

การเจริญและสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของแบคทีเรียแลกติก

นำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ในขั้นต้น 9 สายพันธุ์ มาศึกษาการเจริญในอาหาร MRS broth พบว่าแบคทีเรียแลกติกทั้ง 9 สายพันธุ์มีช่วง lag phase ที่ช่วงเวลาประมาณ 3 ชั่วโมงแล้วจึงเจริญเข้าสู่เข้าระยะ log phase จนถึงชั่วโมงที่ 18 และเจริญเข้าสู่ระยะ stationary phase เมื่อดู generation time ของแบคทีเรียแลกติกพบว่าสายพันธุ์ *L. farciminis* AM115 มี generation time น้อย ที่สุดคือ 1.12 ชั่วโมง และพบว่าแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *P. halophilus* AM 46 มี generation time สูงสุด 2.14 ชั่วโมง แสดงว่าแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *L. farciminis* AM115 สามารถเจริญได้กว่าดีแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์อื่น ๆ ซึ่งมี generation time อยู่ในช่วง 1.54 - 2.14 ชั่วโมง (ตารางที่ 13) จากผลการทดลองการเจริญของแบคทีเรียแลกติกพบว่าที่เวลาชั่วโมงที่ 36 แบคทีเรียแลกติกจะมีค่าดูดกลืนแสง (OD 660 nm) สูงสุดโดยแบคทีเรียแลกติกแลกติกสายพันธุ์ *L. farciminis* AM115 มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด ซึ่งแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ดังกล่าวมีค่า generation time ต่ำสุดและมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (ตารางที่ 13) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของเกรียงศักดิ์ (2535) ได้กล่าวถึงคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกที่สามารถเจริญเติบโตได้รวดเร็ว คือ ต้องมีเวลาในการเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่าน้อย จากนั้นเมื่อนำส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อไปทดสอบการยับยั้งกับ *V. harveyi* และ *V. parahaemolyticus* โดยวิธี well diffusion พบว่าแบคทีเรียแลกติกจะให้ผลการยับยั้งสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 36 (รูปที่ 5-13) แต่อย่างไรก็ตามเมื่อนำผลการทดลองที่ได้ไปวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างในการสร้างสารยับยั้งของแบคทีเรียแลกติกต่อ *V. harveyi* และ *V. parahaemolyticus* ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)ในการสร้างสารยับยั้งของแบคทีเรียแลกติกต่อ *V. harveyi* และ *V. parahaemolyticus* จะเห็นได้ว่าการเจริญของแบคทีเรียแลกติกในอาหาร MRS เป็นเวลา 36 ชั่วโมง เป็นเวลาที่เหมาะสมที่สุดต่อการเจริญและการสร้าง

สารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์จึงใช้ค่านี้ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างสารยับยั้งของแบคทีเรียแลกติกในลำดับต่อไป

ตารางที่ 13 generation time และค่าการดูดกลืนแสงของแบคทีเรียแลกติกที่เวลา 36 ชั่วโมง

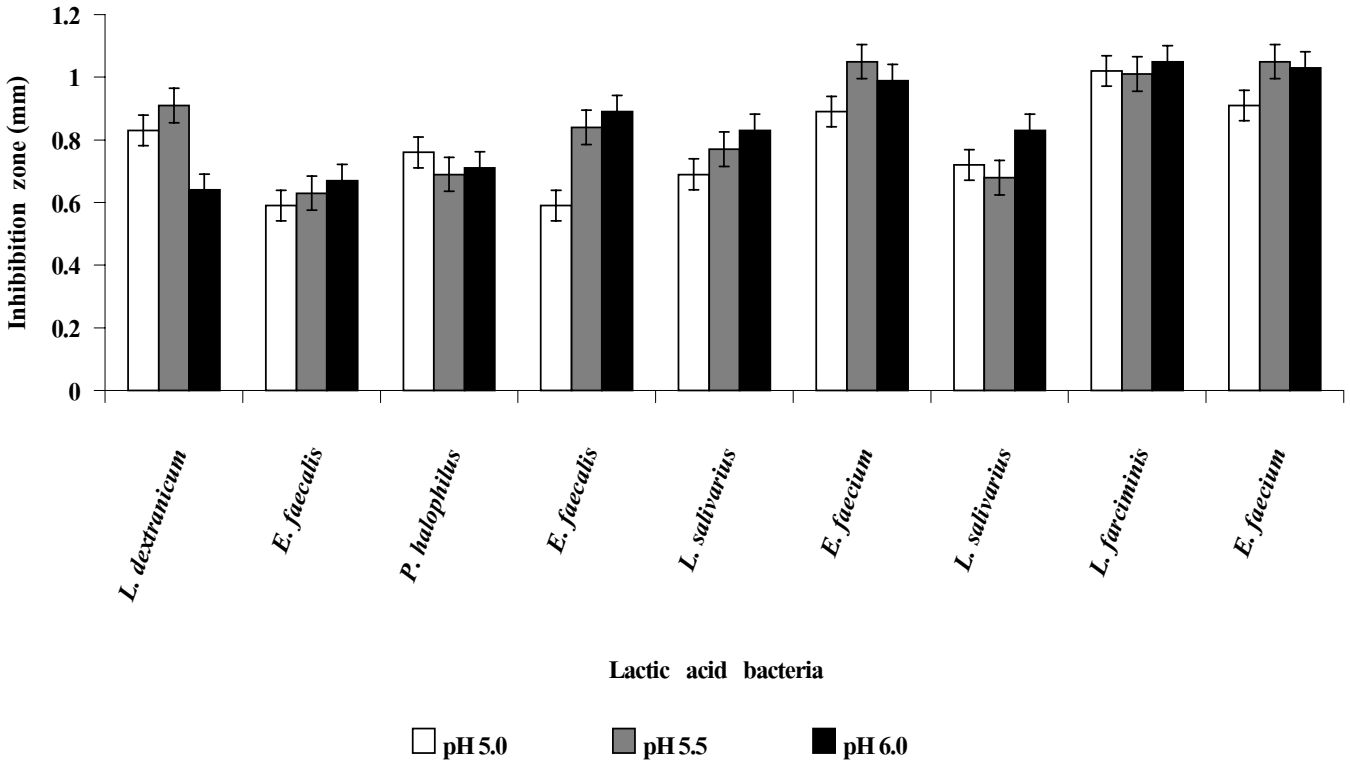
Strain	Generation time (min.)	OD (660 nm) (36 h)
L. dextranicum AM20	126	2.74
E. faecalis AM35	126	2.37
P. halophilus AM46	134	2.41
E. faecalis AM92	114	3.08
L. salivarius AM101	126	2.96
E. faecalis AM107	126	2.60
L. salivarius AM111	126	2.66
L. farciminis AM115	72	3.73
E. faecium AM119	126	2.48

สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

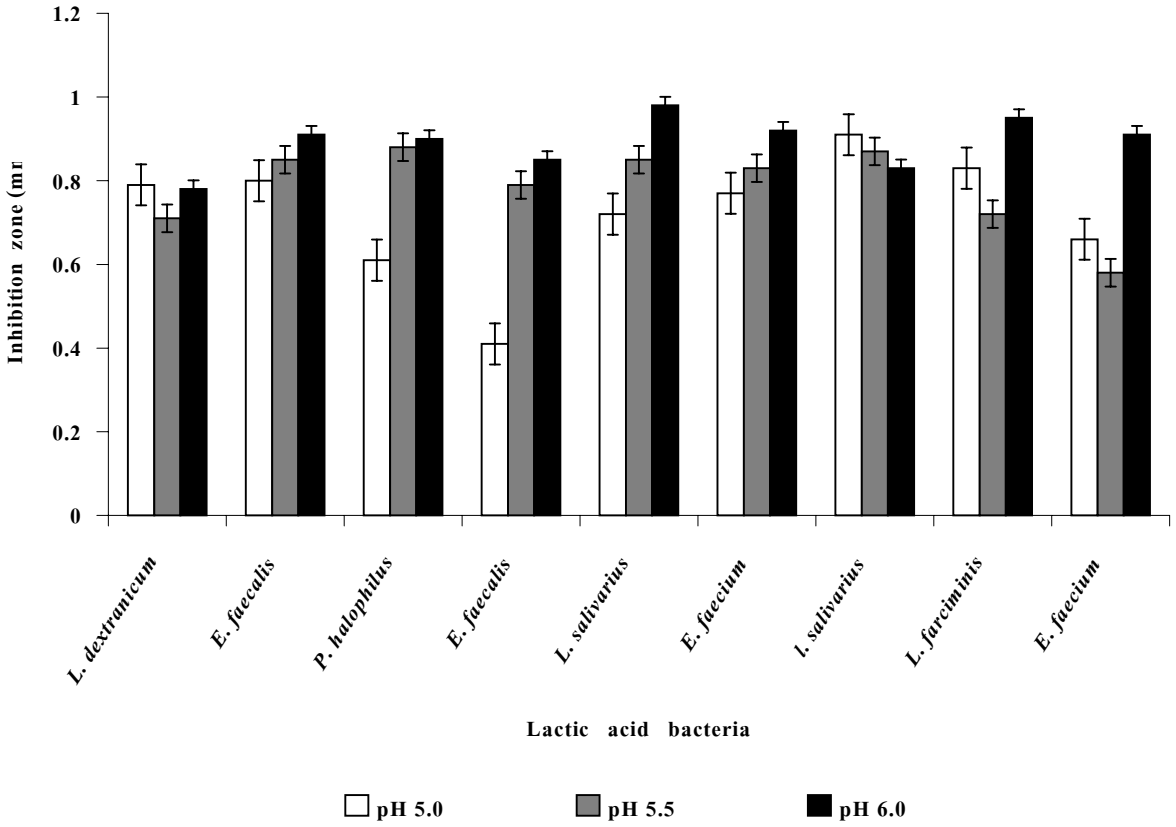
ผลของ pH เริ่มต้นต่อการเจริญและสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

จากการศึกษาผลของ pH ที่เหมาะสมต่อการสร้างสารยับยั้งของแบคทีเรียแลกติกทั้ง 9 สายพันธุ์ต่อ *V. harveyi* และ *V. parahaemolyticus* โดยวิธี well diffusion โดยการปรับ pH ของอาหาร MRS เป็น 5.0 5.5 และ 6.0 ในขั้นต้นได้ทราบถึงความสัมพันธ์ของการเจริญและการยับยั้งของแบคทีเรียแลกติก จากการทดลองพบว่าที่เวลา 36 ชั่วโมง แบคทีเรียแลกติกทั้ง 9 สายพันธุ์สามารถยับยั้ง *V. harveyi* ได้ทั้งที่ pH 5, 5.5 และ 6.0 โดยแต่ละสายพันธุ์จะมีการสร้างสารยับยั้งได้สูงที่ pH แตกต่างกันไป จะเห็นได้ว่าที่ pH 6.0 มีแบคทีเรียแลกติก 5 สายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารยับยั้งต่อ *V. harveyi* ได้สูงสุดคือ สายพันธุ์ *E.faecalis* AM35, *E. faecalis* AM92 , *L. salivarius* AM101, *L. salivarius* AM111, *L. farciminis* AM115 รองลงมาคือ pH 5.5 มีแบคทีเรียแลกติก 3 สายพันธุ์คือ *L. dextranicum* AM20, *E. faecalis* AM107, *E. faecium* AM119 สามารถสร้างสารยับยั้งได้สูงสุด สำหรับที่ pH 5.0 มีแบคทีเรียแลกติกเพียงสายพันธุ์เดียวที่สามารถสร้างสารยับยั้งต่อ *V. harveyi* ได้สูงสุดคือ *P. halophilus* AM46 (รูปที่ 14) จากผลการทดลองเมื่อนำมาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าที่ pH 5, 5.5 และ 6.0 ให้ผลในการสร้างสารยับยั้ง *V. harveyi* ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) สำหรับผลของการศึกษา pH ที่เหมาะสมต่อการสร้างสารยับยั้ง *V. parahaemolyticus* พบว่าแบคทีเรียแลกติกทั้ง 9 สายพันธุ์สามารถสร้างสารยับยั้ง *V. parahaemolyticus* ได้สูงสุดที่ pH 6.0 มี 7 สายพันธุ์ คือ *E. faecalis* AM35, *P. halophilus* AM46, *E. faecalis* AM92, *L. salivarius* AM101, *E. faecalis* AM107, *L. farciminis* AM115 และ *E. faecium* AM119 มีแบคทีเรียแลกติก 2 สายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารยับยั้ง *V. parahaemolyticus* ได้สูงสุดที่ pH 5.0 คือ *L. dextranicum* AM20 และ *L. salivarius* AM111 (รูปที่ 15) และเมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ที่ pH 5, 5.5 และ 6.0 ในสายพันธุ์ L25 2 b2 พบว่ามีความแตกต่างกันของ

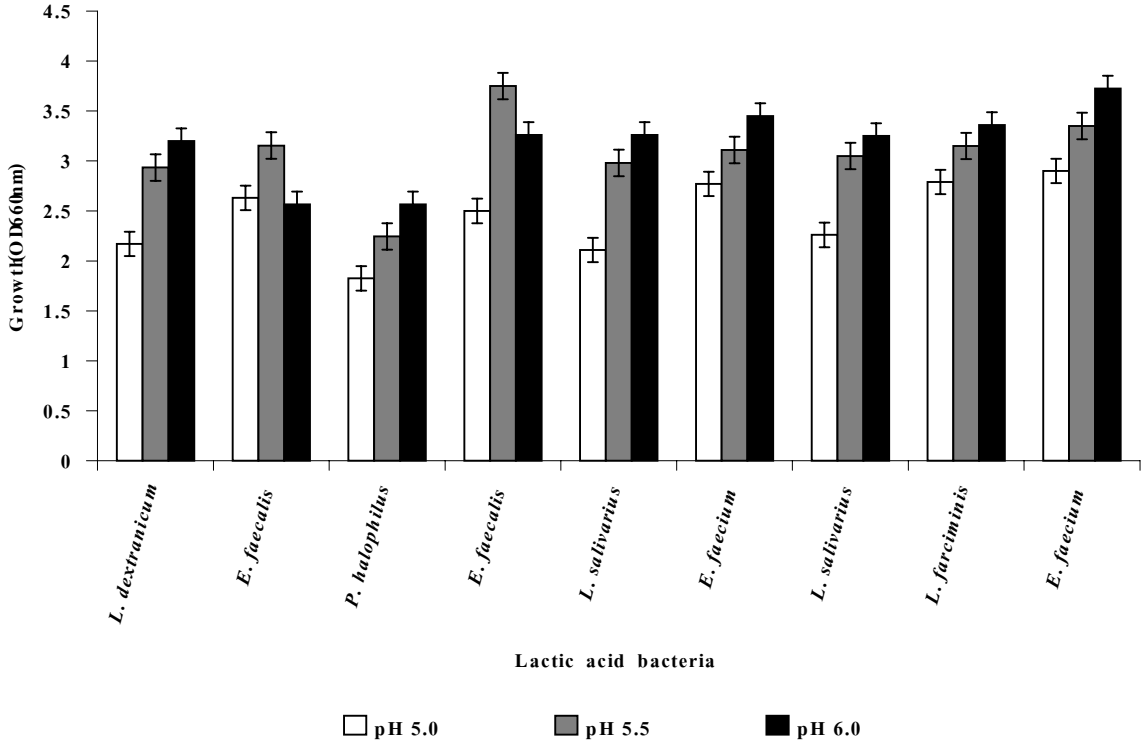
inhibition zone ระหว่าง pH 5 และ6 อย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) สำหรับสายพันธุ์อื่น ๆ พบว่าที่ pH 5, 5.5 และ6 ให้ผลในการสร้างสารยับยั้ง *V. parahaemolyticus* ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) เมื่อศึกษาผลของ pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียแลกติกโดยวัดอัตราการเจริญของแบคทีเรียแลกติกทั้ง 9 สายพันธุ์พบว่ามีแบคทีเรียแลกติก 7 สายพันธุ์ที่สามารถเจริญได้สูงสุดที่ pH 6.0 คือ *L. dextranicum* AM20, *P. halophilus* AM46, *L. salivarius* AM101, *E. faecalis* AM107, *L. salivarius* A26/1, *L. farciminis* AM115 และ *E. faecium* AM119 มีแบคทีเรียแลกติก 2 สายพันธุ์ที่สามารถเจริญได้สูงสุดที่ pH 5.5 คือ *E. faecalis* AM35)และ *E. faecalis* AM92 (รูปที่ 16) และเมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าค่า OD ที่วัดได้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) ระหว่าง pH 5 กับ 5.5 และระหว่าง pH 5 กับ 6 ในแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *P. halophilus* AM46 กับแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *E.faecalis* AM92, *E. faecalis* AM107, *L. farciminis* AM115 และ *E. faecium* AM119



รูปที่ 14 ผลของ pH 5.0, 5.5 และ 6.0 ต่อการสร้างสารยับยั้ง *V. harveyi* โดยวิธี well diffusion ที่เวลา 36 ชั่วโมง ของแบคทีเรียแลกติก



รูปที่ 15 ผลของ pH 5.0, 5.5 และ6.0 ต่อการสร้างสารยับยั้ง *V. parahaemolyticus* โดยวิธี well diffusion ที่เวลา 36 ชั่วโมง ของแบคทีเรียแลกติก

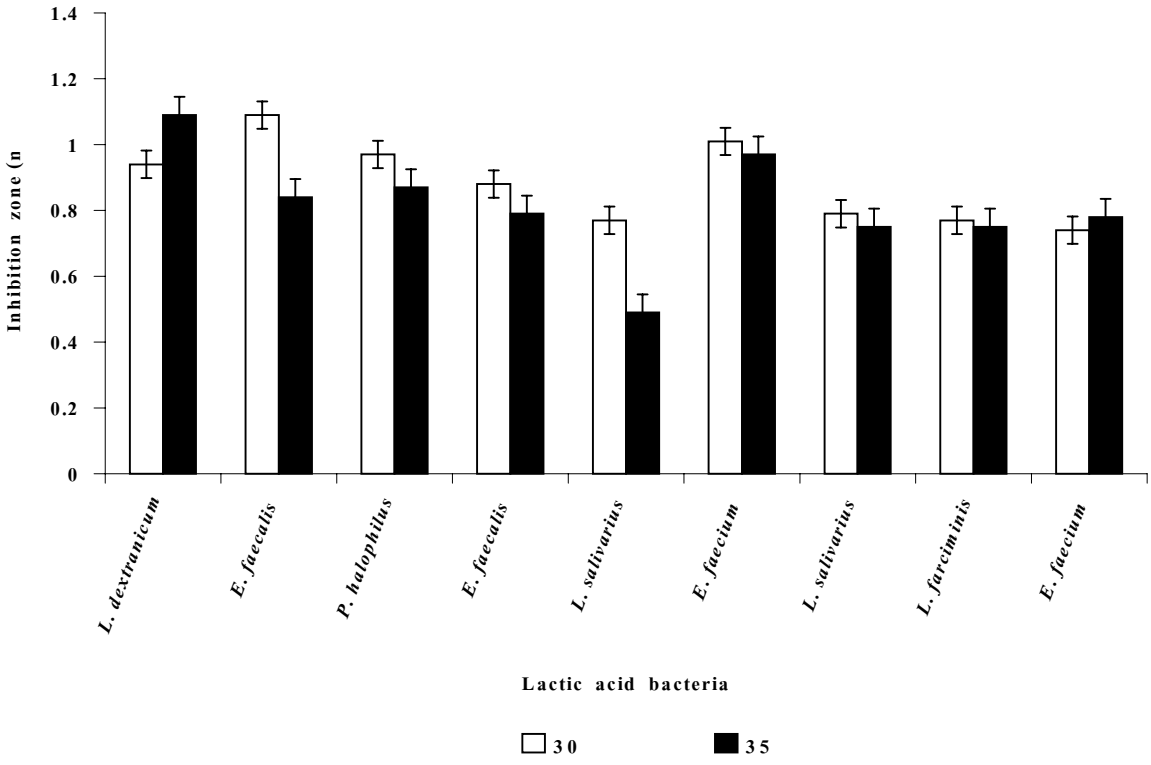


รูปที่ 16 ผลของ pH 5.0, 5.5 และ6.0 ต่อการเจริญของแบคทีเรียแลกติกที่เวลา 36 ชั่วโมง

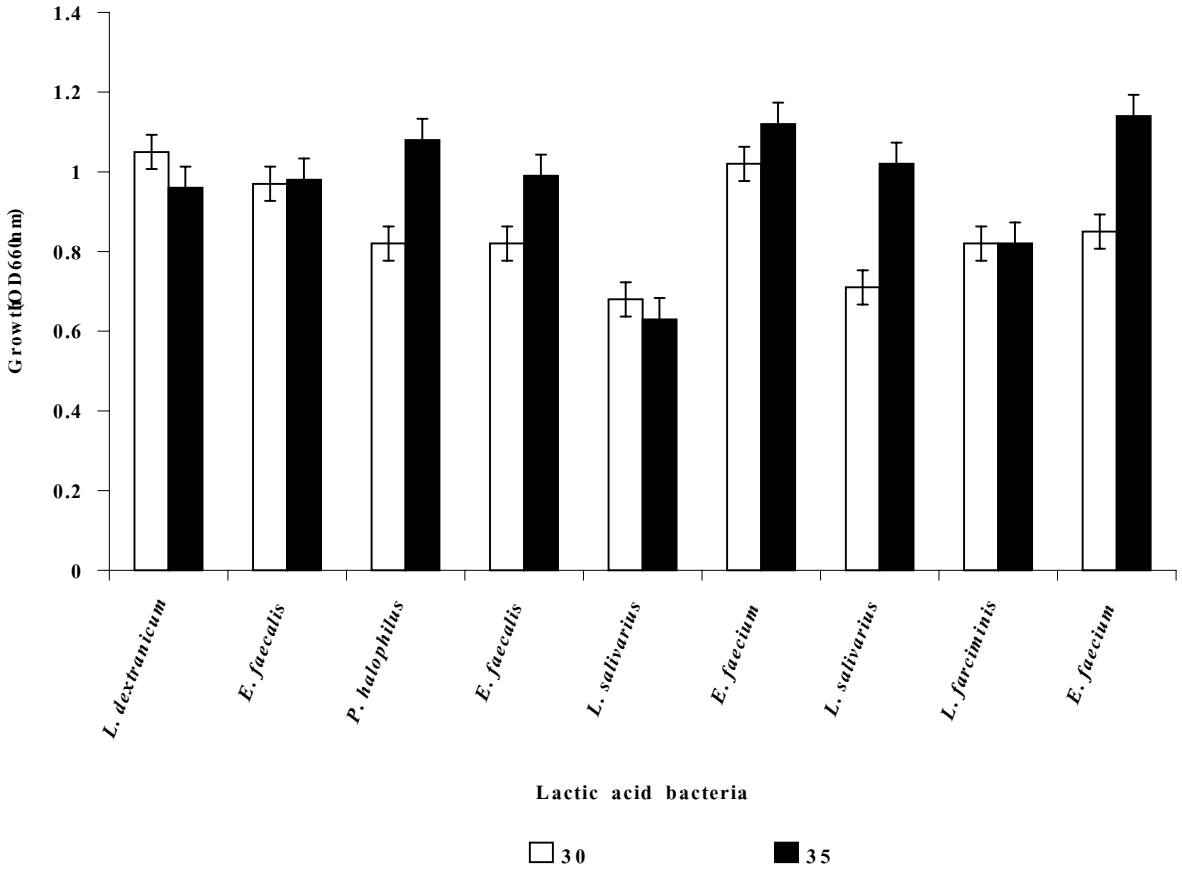
ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

จากการทดสอบใช้แบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ 9 สายพันธุ์ โดยการถ่ายเชื้อเริ่มต้น 1% ลงในอาหารเหลว MRS โดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิต่างกันคือที่อุณหภูมิ 30 และ 35°C เพื่อศึกษาการเจริญและสร้างสารยับยั้ง *V. harveyi* และ *V. parahaemolyticus* โดยวิธี well diffusion พบว่าที่เวลา 36 ชั่วโมง แบคทีเรียแลกติก 7 สายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของ *V. harveyi* ได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 30°C คือแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *E.faecalis* AM35, *P. halophilus* AM46, *E. faecalis* AM92, *L. salivarius* AM101, *E. faecalis* AM107, *L. salivarius* AM111 และ *L. farciminis* AM115 มีแบคทีเรียแลกติก 2 สายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารยับยั้ง *V. harveyi* ได้ดีที่ 35°C คือ *L. dextranicum* AM20 และ *E. faecalis* AM119 (รูปที่ 17) และเมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าผลการสร้างสารยับยั้ง *V. harveyi* โดยแบคทีเรียแลกติกทั้ง 9 สายพันธุ์ ระหว่างอุณหภูมิ 30 และ 35°C ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) และเมื่อศึกษาผลของอุณหภูมิเหมาะสมต่อการสร้างสารยับยั้ง *V. parahaemolyticus* พบว่ามีแบคทีเรียแลกติก 6 สายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารยับยั้ง *V. parahaemolyticus* ได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 35°C คือ *E. faecalis* AM35, *P. halophilus* AM46, *E. faecalis* AM92, *E. faecalis* AM107, *L. salivarius* AM111 และ *E. faecium* AM119 มีแบคทีเรียแลกติก 3 สายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารยับยั้ง *V. parahaemolyticus* ได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 30°C คือ *L. dextranicum* AM20, *L. salivarius* AM101 และ*L. farciminis* AM115 (รูปที่ 18) เมื่อนำข้อมูลไปวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) ระหว่างอุณหภูมิ 30 และ 35°C แสดงว่าการสร้างสารยับยั้งของแบคทีเรียแลกติกต่อ *V. parahaemolyticus* เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 และ 35°C ไม่มีความแตกต่างกันและเมื่อศึกษาการเจริญของแบคทีเรียแลกติกพบว่ามีแบคทีเรียแลกติก 5 สายพันธุ์ที่สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30°C คือ *L. dextranicum* AM20, *P. halophilus* AM46, *E. faecalis* AM92, *E. faecalis* AM107 และ *E. faecium* AM119 และมีแบคทีเรียแลกติก 4 สายพันธุ์ที่สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 35°C คือ *E. faecalis* AM35,

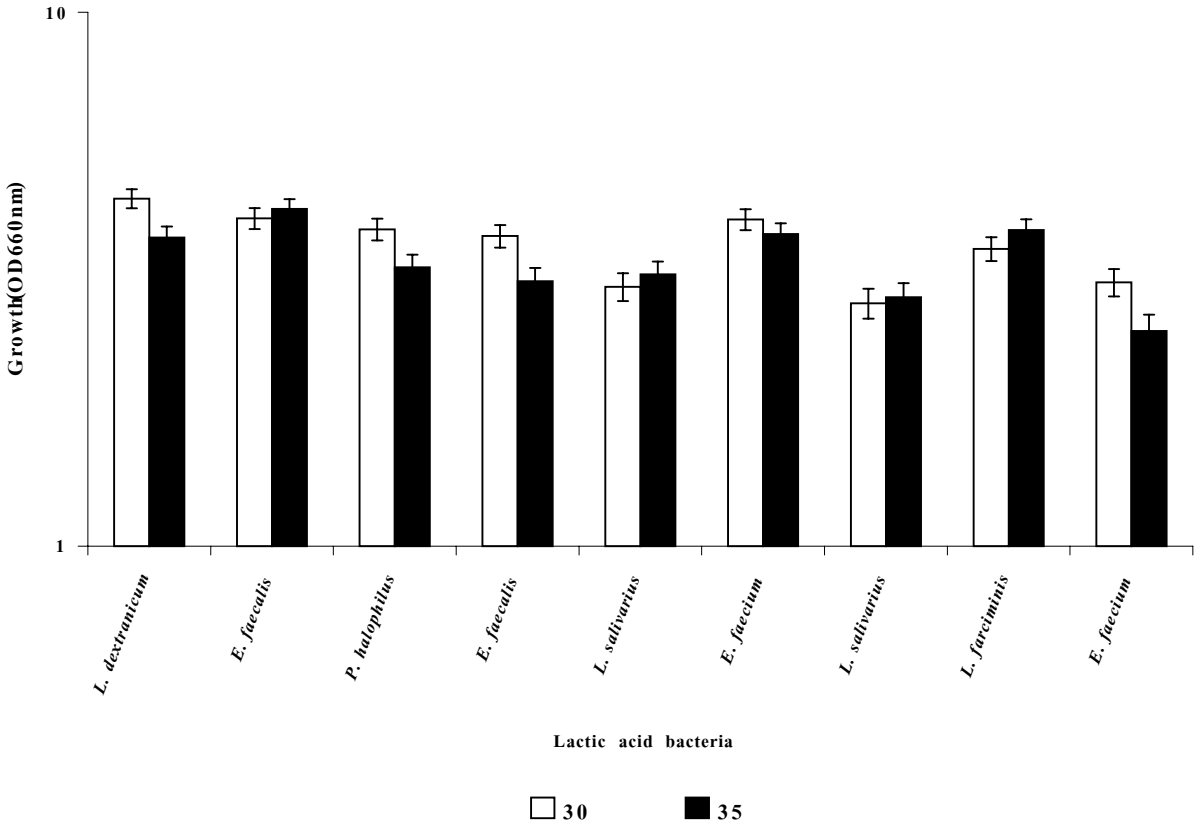
L. salivarius AM101, *L. salivarius* AM111 และ *L. farciminis* AM115 (รูปที่ 19) อย่างไรก็ตามเมื่อข้อมูลไปวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ของค่า OD ที่วัดได้ที่อุณหภูมิ 30 และ 35°C



รูปที่ 17 ผลของอุณหภูมิ 30°C และ 35°C ต่อการสร้างสารยับยั้ง *V. harveyi* โดยวิธี well diffusion ที่เวลา 36 ชั่วโมง ของแบคทีเรียแลกติก



รูปที่ 18 ผลของอุณหภูมิ 30°C และ 35°C ต่อการสร้างสารยับยั้ง *V. parahaemolyticus* โดยวิธี well diffusion ที่เวลา 36 ชั่วโมง ของแบคทีเรียแลกติก

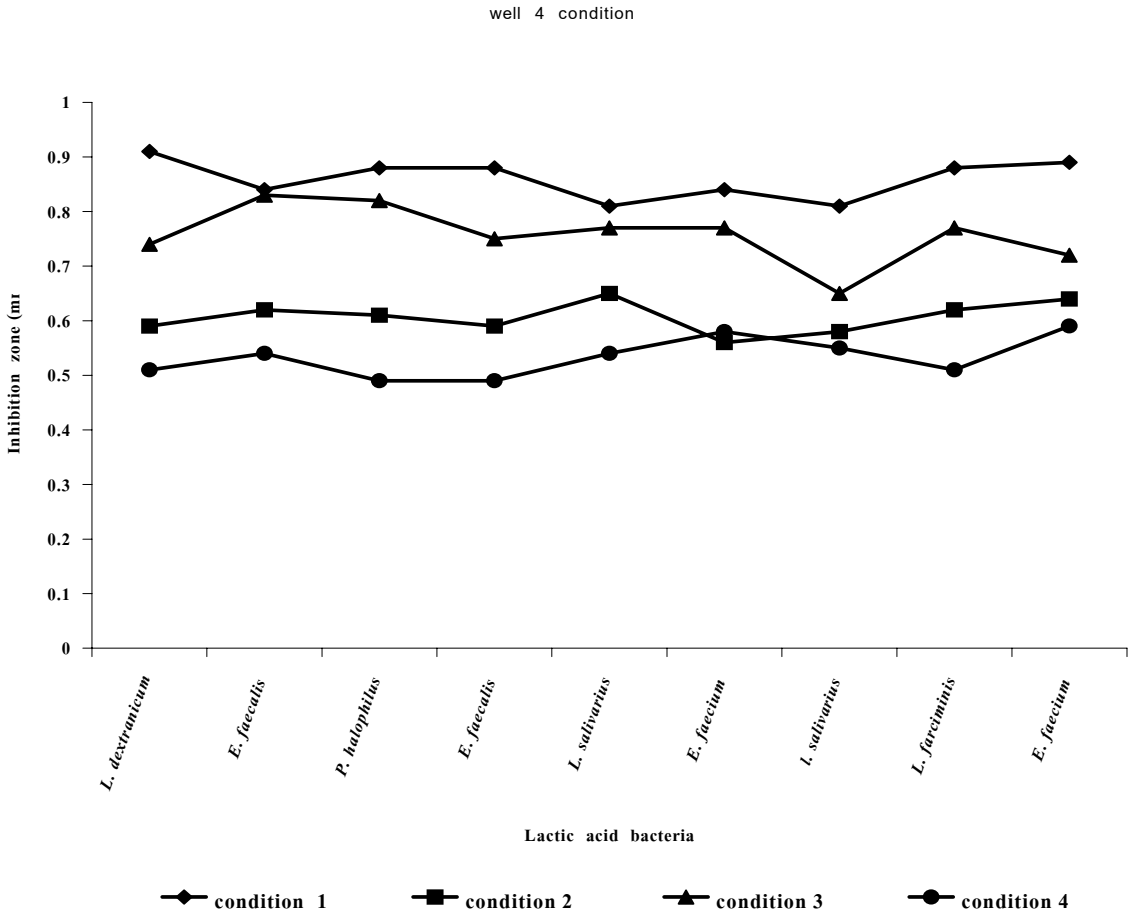


รูปที่ 19 ผลของ อุณหภูมิ 30°C และ 35°C ต่อการเจริญของแบคทีเรียแลกติกที่เวลา 36 ชั่วโมง

การศึกษาชนิดสารยับยั้งของแบคทีเรียแลกติก

จากผล Inhibition zone ของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ 9 สายพันธุ์ โดยวิธี well diffusion ต่อ *V. harveyi* ในสภาวะต่าง ๆ 4 สภาวะ (รูปที่ 20) พบว่าในสภาวะที่ไม่จำกัดน้ำตาลและอากาศแบคทีเรียแลกติกทั้ง 9 สายพันธุ์ สามารถยับยั้ง *V. harveyi* ได้โดยจะให้ Inhibition zone สูงสุด เนื่องจากการยับยั้งของ กรดแลกติก ไฮโดรเจนเปอร์-ออกไซด์ และ แบคเทอริโอซิน ในสภาวะที่จำกัดน้ำตาลกลูโคสแต่ไม่จำกัดอากาศให้ผลการยับยั้ง *V. harveyi* ใกล้เคียงกับในสภาวะที่ไม่จำกัดน้ำตาลและอากาศ เนื่องจากการยับยั้งของ ไฮโดรเจนเปอร์-ออกไซด์ และแบคเทอริโอซิน สำหรับสภาวะที่ไม่จำกัดน้ำตาลแต่จำกัดอากาศให้ผลการยับยั้ง *V. harveyi* น้อยกว่าในสภาวะที่ไม่จำกัดน้ำตาลและอากาศ และสภาวะที่จำกัดน้ำตาลกลูโคสแต่ไม่จำกัดอากาศ เนื่องจากการยับยั้งของกรดแลกติก และ แบคเทอริโอซิน สำหรับสภาวะที่จำกัดน้ำตาลและอากาศให้ผลการยับยั้ง *V. harveyi* น้อยที่สุดเนื่องจากการสร้างสารยับยั้งของแบคเทอริโอซิน

จากการศึกษาชนิดของสารยับยั้งของแบคทีเรียแลกติกต่อ *V. harveyi* ที่สภาวะต่าง ๆ พบว่าแบคทีเรียแลกติกสามารถยับยั้ง *V. harveyi* ได้เนื่องจากสามารถเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสที่มีอยู่ 2% ในน้ำตาลกลูโคสเป็นกรดแลกติกและการบ่มในสภาวะที่มีออกซิเจนทำให้แบคทีเรียแลกติกสามารถสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งได้เนื่องจากแบคเทอริโอซินและสารยับยั้งอื่น ๆ จะเห็นได้ว่าในสภาวะที่ไม่จำกัดกรดแลกติกและอากาศให้ผลดีที่สุดเนื่องจากการทำงานร่วมกันของกรดแลกติกและไฮโดรเจนเปอร์-ออกไซด์ แบคเทอริโอซิน และสารยับยั้งอื่น ๆ กรดแลกติกและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ (มลิวรรณ, 2542) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Villamil (2002) พบว่าการยับยั้งของแบคทีเรียแลกติกอาจมาจากการทำงานร่วมกันของสารประกอบที่แบคทีเรียแลกติกสร้างขึ้นไม่ใช่เพียงแต่กรดแลกติกเพียงอย่างเดียว



รูปที่ 20 ผลการศึกษาชนิดของสารยับยั้งของแบคทีเรียแลกติกต่อ *V. harveyi* ในสภาวะต่าง ๆ ดังนี้ condition 1 : ไม่จำกัดน้ำตาลกลูโคสและและอากาศ, condition 2 : จำกัดน้ำตาลแต่ไม่จำกัดอากาศ, condition 3 : ไม่จำกัดน้ำตาลแต่จำกัดอากาศ, condition 4 จำกัดน้ำตาลและอากาศ

การเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำที่ได้รับแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้

จากการคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีคุณสามบัติในการปั่นโปรไบโอติกทั้ง 9 สายพันธุ์ โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 10 ชุดการทดลอง (แต่ละชุดการทดลองทำ 3 ซ้ำ) คือ

T1 คือ ชุดการทดลองที่ได้รับแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *L. dextranicum* AM20

T2 คือ ชุดการทดลองที่ได้รับแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *E. faecalis* AM35

T3 คือ ชุดการทดลองที่ได้รับแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *P. halophilus* AM46

T4 คือ ชุดการทดลองที่ได้รับแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *E. faecalis* AM92

T5 คือ ชุดการทดลองที่ได้รับแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *L. salivarius* AM101

T6 คือ ชุดการทดลองที่ได้รับแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *E. faecalis* AM107

T7 คือ ชุดการทดลองที่ได้รับแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *L. salivarius* AM111

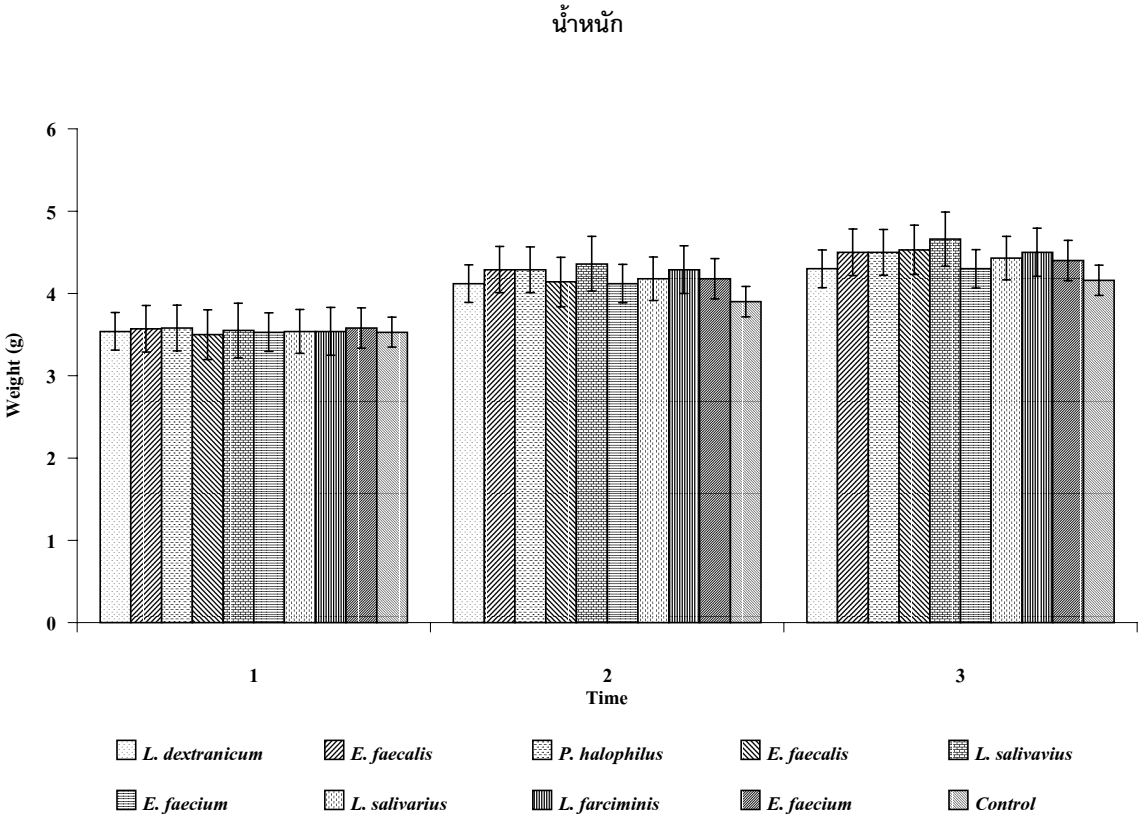
T8 คือ ชุดการทดลองที่ได้รับแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *L. farciminis* AM115

T9 คือ ชุดการทดลองที่ได้รับแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *E. faecium* AM119

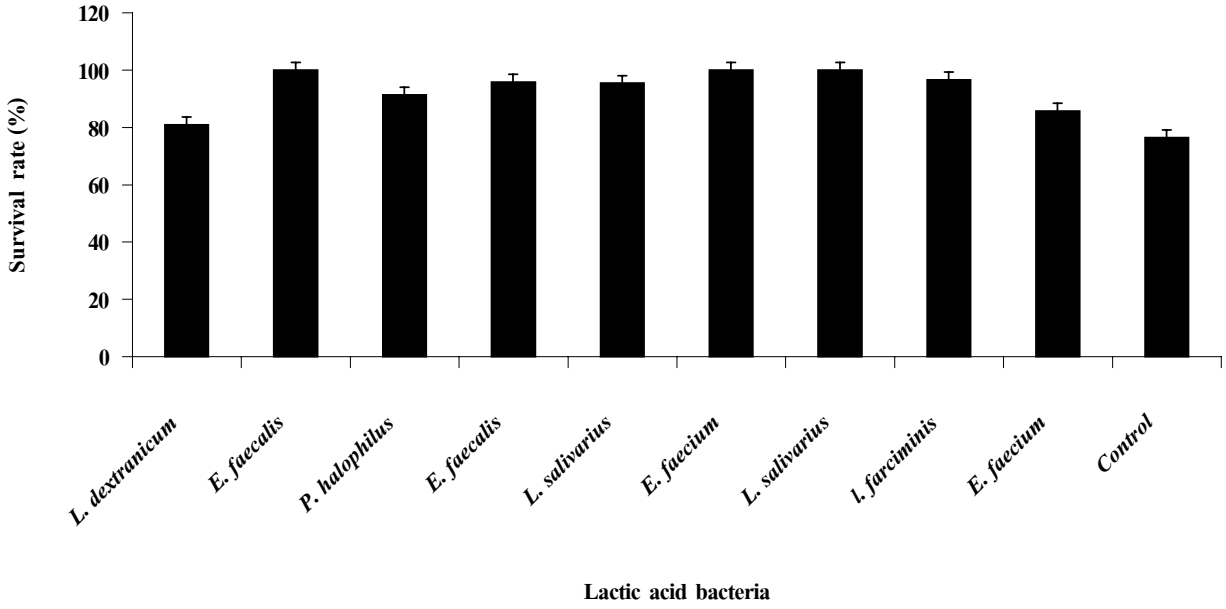
T10 คือ ชุดการทดลองที่ได้รับอาหารกุ้งกุลาดำเพียงอย่างเดียวเป็นชุดควบคุม

โดยนำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ไปผสมรวมกับอาหารเม็ดสำเร็จรูปที่ใช้เลี้ยงกุ้งกุลาดำหลังจากนั้นเคลือบทับด้วยน้ำมันปลา ซึ่งกุ้งกุลาดำที่นำมาเลี้ยงมีน้ำหนักตัวประมาณ 3.46 – 3.58 กรัม เลี้ยงในระบบน้ำเปิด โดยที่กุ้งกุลาดำได้รับอาหารวันละ 4 มื้อ แต่ละมื้อห่างกัน 4 ชั่วโมง แต่หลังจากที่ให้มื้อที่ 4 เสร็จแล้วจะให้อาหารมื้อที่ 1 อีกครั้งเมื่อผ่านไป 7 ชั่วโมง ในอัตราประมาณ 6 – 7% ของน้ำหนักตัว กุ้งกุลาดำจะได้รับอาหารที่ผสมโปรไบโอติกเป็นเวลา 30 วัน โดยชั่งน้ำหนักของกุ้งกุลาดำก่อนเริ่มการทดลอง 1 ครั้ง และเมื่อเริ่มการทดลองจะชั่งทุก 2 สัปดาห์ จากผลการทดลองหลังจากชั่งน้ำหนักกุ้งกุลาดำ 3 ครั้งพบว่ากลุ่มทดลองที่ 5 ซึ่งได้รับแบคทีเรียแลกติก *L. salivarius* AM101 มีน้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งกุลาดำสูงสุด และกลุ่มทดลองที่มีน้ำหนักเฉลี่ยน้อยสุดคือกลุ่มทดลองที่ 10 นั่นคือกลุ่มควบคุม (รูปที่ 21) แต่อย่างไรก็ตามเมื่อนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า

น้ำหนักของกุ้งกุลาดำที่ได้ใน 10 ชุดการทดลองไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) และจากการศึกษาอัตราการรอดของกุ้งกุลาดำหลังจากที่เลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือนพบว่าอัตราการรอดตายของกุ้งกุลาดำที่ได้รับแบคทีเรียแลกติกในกลุ่มทดลองที่ 2 และ 7 ซึ่งได้รับแบคทีเรียแลกติก *E. faecalis* AM35 และ *L. salivarius* AM111 ตามลำดับมีอัตราการรอดตาย 100% รองลงมาคือ กลุ่มทดลองที่ 8 มีอัตราการรอดตาย 96.67% สำหรับกลุ่มอื่น ๆ และกลุ่มควบคุมมีอัตราการรอดตายใกล้เคียงกัน (รูปที่ 22) แต่อย่างไรก็ตามเมื่อนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าอัตราการรอดตายของกุ้งกุลาดำใน 10 ชุดการ ทดลองไม่ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)



รูปที่ 21 ผลการชั่งน้ำหนักเฉลี่ย 3 ครั้ง ของกุ้งกุลาดำที่ได้รับแบคทีเรียแลกติกและไม่ได้รับแบคทีเรียแลกติก



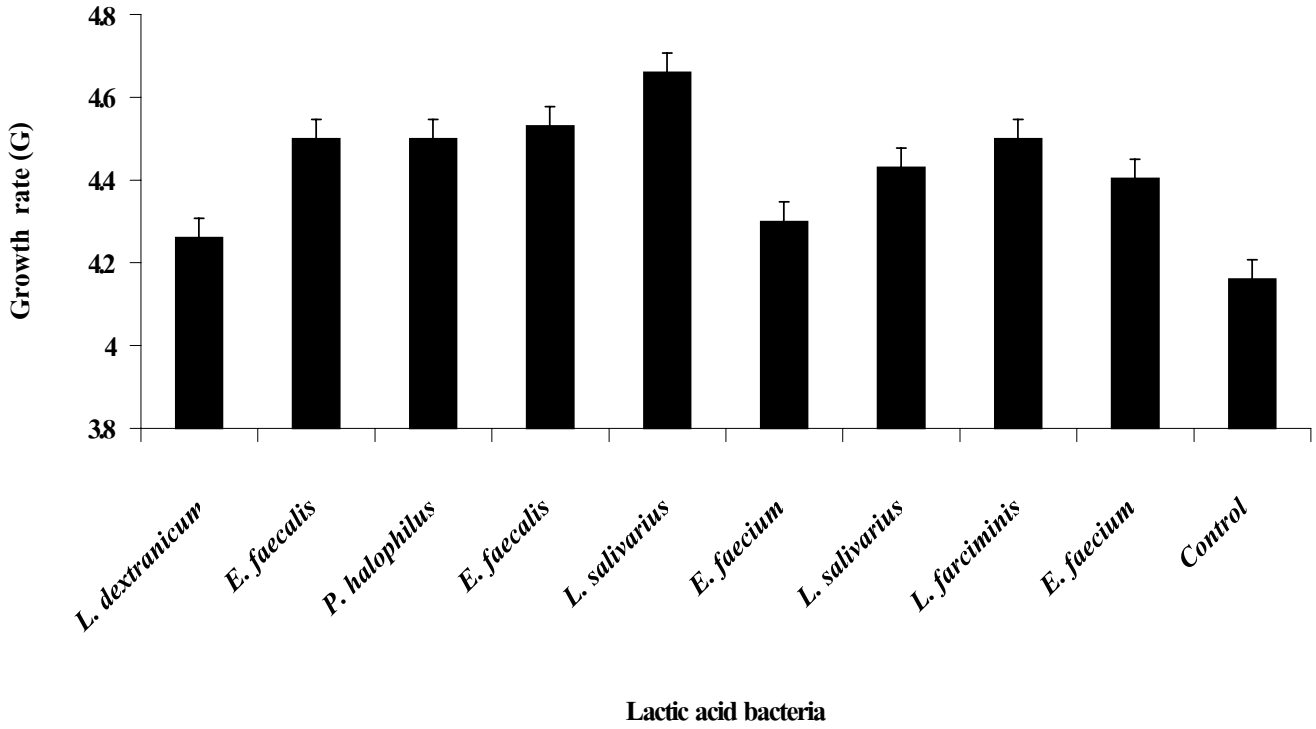
รูปที่ 22 อัตราการรอด(%) ของกุ้งกุลาดำที่ได้รับแบคทีเรียแลกติกและไม่ได้รับแบคทีเรียแลกติกเป็น เวลา 30 วัน

อัตราการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำต่อวัน

จากการทดลองในทุกกลุ่มการทดลองพบว่าอัตราการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำต่อวัน อยู่ในช่วง 4.16 – 4.66 จะเห็นได้ว่ากลุ่มทดลองที่ 5 ซึ่งได้รับ *L. salivarius* AM101 มีอัตราการเจริญต่อวันสูงสุดคือ 4.66 สำหรับกลุ่มอื่นมีค่าใกล้เคียงกัน (รูปที่ 23) ยกเว้นในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกได้รับแต่อาหารกุ้งกุลาดำที่เคลือบทับด้วยน้ำมันปลามีอัตราการเจริญต่อวันต่ำที่สุดคือ 3.14 แต่อย่างไรก็ตามเมื่อ นำข้อมูลไปวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าอัตราการเจริญต่อวันของกุ้งกุลาดำทั้ง 10 ชุดการทดลองไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05)

การตรวจนับแบคทีเรียแลกติกที่พบในทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำ

หลังจากที่ให้โปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกผสมกับอาหารกุ้งกุลาดำแก่กุ้งกุลาดำทั้ง 9 กลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมได้รับอาหารเพียงอย่างเดียวเป็นระยะเวลา 30 วัน หลังจากนั้นสุ่มตัวอย่างกุ้งกุลาดำแต่ละกลุ่มทดลองมาตรวจนับแบคทีเรียแลกติกและตรวจนับจำนวน *Vibrio* sp. ที่พบในเดินอาหารของกุ้งกุลาดำโดยนำแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำทั้ง 10 ชุดการทดลองมาทดสอบสมบัติการติดสี แกรม รูปร่าง การสร้างเอนไซม์คะตะเลส ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียแลกติกจากการตรวจนับแบคทีเรียแลกติกที่พบในทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำที่ได้รับแบคทีเรียแลกติกโดยสุ่มกุ้งกุลาดำจากทุกชุดการทดลองและจากทุกซ้ำมาตรวจนับแบคทีเรียแลกติกทั้งหมด จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าจาก 10 ชุดการทดลองจะพบแบคทีเรียแลกติกมากที่สุด 1.0×10^5 CFU/g ในชุดการทดลองที่ 7 ที่ได้รับแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *L. salivarius* AM111 และพบแบคทีเรียแลกติกน้อยที่สุด 1.1×10^2 CFU/g ในชุดการทดลองที่ 10 ซึ่งเป็นชุดควบคุมที่ไม่ได้รับแบคทีเรียแลกติก (ตารางที่ 15)



รูปที่ 23 การเจริญเติบโตต่อวัน (G) ของกุ้งกุลาดำที่ได้รับแบคทีเรียแลกติกและไม่ได้รับแบคทีเรียแลกติก เป็นเวลา 30 วัน

ตารางที่ 15 จำนวนแบคทีเรียแลกติกทั้งหมดและจำนวน *Vibrio* sp. ทั้งหมดที่พบในทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำหลังจากที่ได้รับแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ต่าง ๆ

Strain	**จำนวนแบคทีเรียแลกติกทั้งหมด (CFU/g) (X±SD)**	**จำนวน *Vibrio* sp. ทั้งหมด (CFU/g) (X±SD)**
L. dextranicum AM20	$2.0 \times 10^3 \pm 1.1 \times 10^3$	$7.2 \times 10^4 \pm 6.5 \times 10^4$
E. faecalis AM35	$6.7 \times 10^3 \pm 1.2 \times 10^4$	$2.1 \times 10^4 \pm 1.3 \times 10^4$*
P. halophilus AM46	$1.6 \times 10^4 \pm 1.9 \times 10^4$	$1.4 \times 10^5 \pm 1.1 \times 10^4$
E. faecalis AM92	$8.3 \times 10^3 \pm 1.0 \times 10^4$	$1.9 \times 10^5 \pm 1.2 \times 10^5$
L. salivarius AM101	$2.4 \times 10^2 \pm 1.5 \times 10^2$	$1.6 \times 10^4 \pm 1.2 \times 10^4$*
E. faecalis AM107	$8.7 \times 10^4 \pm 1.1 \times 10^5$	$4.4 \times 10^4 \pm 3.7 \times 10^4$
L. salivarius AM111	$1.0 \times 10^5 \pm 1.6 \times 10^5$	$1.3 \times 10^5 \pm 5.8 \times 10^4$
L. farciminis AM115	$6.8 \times 10^4 \pm 7.6 \times 10^4$	$1.0 \times 10^5 \pm 3.2 \times 10^4$
E. faecium AM119	$7.2 \times 10^2 \pm 1.0 \times 10^3$	$3.5 \times 10^4 \pm 3.5 \times 10^4$
Control	$1.1 \times 10^2 \pm 2.9 \times 10^2$	$1.1 \times 10^5 \pm 5.7 \times 10^4$
X ±SD	$2.8 \times 10^4 \pm 3.7 \times 10^4$	$8.5 \times 10^4 \pm 5.4 \times 10^4$

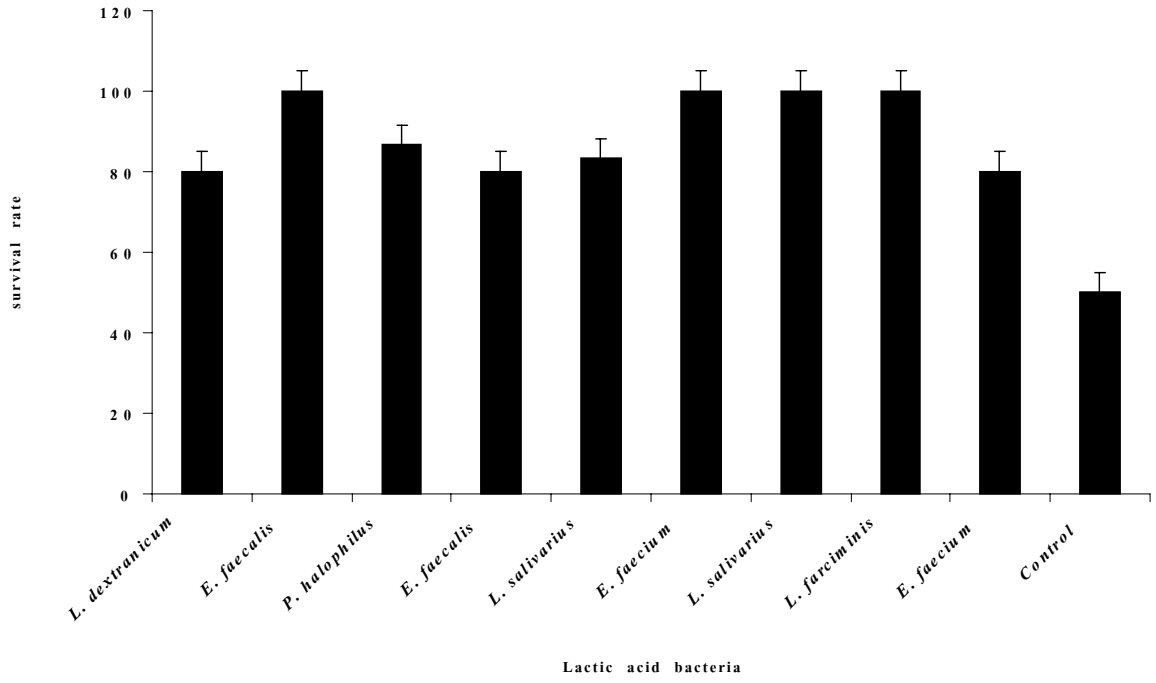
*มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05)

จากผลการทดลองการตรวจนับจำนวน *Vibrio* sp. ที่พบในทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำทั้ง 10 ชุดการทดลอง พบว่าจำนวน *Vibrio* sp. ทั้งหมดจะพบมากที่สุด 1.9 x10^5 CFU/g ในชุดการทดลองที่ 4 ซึ่งได้รับโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *E. faecalis* AM92 และพบจำนวน *Vibrio* sp. ทั้งหมดน้อยที่สุด 1.6 x10^4 CFU/g ในชุดการทดลองที่ 5 ซึ่งได้รับแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *L. salivarius* AM101 เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของจำนวนแบคทีเรียแลกติกทั้งหมดและจำนวน *Vibrio* sp. ทั้งหมดพบว่าจำนวนของแบคทีเรียแลกติกทั้งหมดกับจำนวนของ *Vibrio* sp. ทั้งหมดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) แต่อย่างไรก็ตามเมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของจำนวนของแบคทีเรียแลกติกทั้งหมดที่พบในทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำในชุดการทดลองที่ได้รับโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกกับชุดควบคุมพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) และเมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของจำนวน *Vibrio* sp. ทั้งหมดที่พบในทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำในชุดการทดลองที่ได้รับโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกกับชุดควบคุมพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในชุดการทดลองที่ 2 และ5 ซึ่งได้รับแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *E. faecalis* AM35 และ *L. salivarius* AM101 นั่นคือพบจำนวน *Vibrio* sp. ในชุดการทดลองที่ 2 และ 5 น้อยกว่าในชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05)

การทดสอบกับเชื้อก่อโรค (pathogen challenge test)

นำกุ้งที่เหลือจากการทดลองในขั้นต้นมาทดสอบความต้านทานต่อการเกิดโรคจาก *V. harveyi* โดยวิธีการฉีด โดยฉีดเชื้อ *V. harveyi* ที่มีความเข้มข้น 10^7 CFU / ml ให้แก่กุ้งกุลาดำทุกตัวตัวละ 0.1 ml ในทุกชุดการทดลอง ติดตามการตายของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ *V. harveyi* เป็นเวลา 7 วัน ผลการทดลองพบว่ามีกลุ่มการทดลองที่มีอัตรารอด 100% อยู่ 4 กลุ่มทดลองคือกลุ่มทดลองที่ 2, 6, 7 และ 8 นั่นคือกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียแลกติก *E. faecalis* AM35 , *E. faecium* AM107, *L. salivarius* AM111 และ *L. farciminis* AM115

สำหรับกลุ่มควบคุมมีอัตราการรอด 50% (รูปที่ 24) เมื่อนำข้อมูลไปวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของอัตราการรอดตายของกุ้งกุลาดำที่ได้รับโปรไบโอติกและกลุ่มที่ควบคุมพบว่าอัตราการรอดตายของกุ้งกุลาดำหลังจากการเหนี่ยวนำกับเชื้อก่อโรค *V. harveyi* ทั้ง 9 ชุดการทดลองแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มควบคุม ($P < 0.05$) หลังจากนั้นนำกุ้งกุลาดำที่ตายมาตรวจดูลักษณะภายนอกและมาผ่าตัดเอาส่วนทางเดินอาหารและกล้ามเนื้อมาแยกเชื้อ *V. harveyi* โดยนำมาตรวจสอบสมบัติการย้อมสีแกรม



รูปที่ 24 อัตราการรอดตาย (%) ของกุ้งกุลาดำที่ได้รับแบคทีเรียแลกติกและไม่ได้รับแบคทีเรียแลกติกหลังจากเหนี่ยวนำให้เกิดโรคโดย *V. harveyi* (10^7CFU/ml) ตัวละ 0.1 ml

รูปร่าง การเรียงตัว การเรืองแสงบนอาหาร TSA ที่เติม 1.5% โซเดียมคลอไรด์ และการหมักน้ำตาลซูโครสในอาหาร TCBS ที่เติม 1.5% โซเดียมคลอไรด์ เพื่อยืนยันว่ากุ้งกุลาดำตายเนื่องจากการติดเชื้อ *V. harveyi* ที่ฉีดเข้าไปในตัวกุ้งเหนี่ยวนำให้เกิดโรคเรืองแสงและตรวจสอบลักษณะภายนอกของกุ้งกุลาดำพบว่ากุ้งที่ติดเชื้อจะมีลักษณะอ่อนเพลียไม่กินอาหาร ว่ายน้ำอยู่บริเวณผิวน้ำ ตับมีสีซีดลง ซี่เหงือกมีสีดำ สีลำตัวขุ่น ตัวหลวม ตัวกุ้งเริ่มมีสีแดง เวลากลางคืนจะสังเกตุเห็นลักษณะเรืองแสงจากตัว

การนำโปรไบโอติกมาใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำยังมีน้อยมากซึ่งก่อนหน้านี้ได้มีการนำโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกมาใช้ในการเลี้ยงสุกรพบว่าสามารถทำให้สัตว์มีสุขภาพแข็งแรง ช่วยในการเจริญเติบโตและป้องกันโรคในสุกรโดยจุลินทรีย์ซึ่งจุลินทรีย์จะต้องสามารถทนต่อน้ำย่อยและกรดต่าง ๆ ในระบบทางเดินอาหารและสามารถเกาะในลำไส้และเพิ่มจำนวนในลำไส้ได้เพื่อไปแข่งขันการเจริญกับเชื้อก่อโรค และเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในในทางเดินอาหารของสุกร ได้แก่ *Lactobacillus* sp., *Streptococcus* sp., *Enterococcus* sp., *Bacillus* sp., และ *Bifidobacterium* sp. เป็นต้น (เพิ่มพงษ์, 2524) ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ได้นำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากระบบทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำที่มีคุณสมบัติในการเป็นโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกมาใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ เนื่องจากการรายงานของ Tanner (1994) และ Kenworthy (1973) พบว่าจุลินทรีย์ที่นำมาใช้เสริมในอาหารสัตว์นั้นควรจะใช้จุลินทรีย์ที่เป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นของสัตว์ นั้น ๆ และจะต้องมีลักษณะที่เป็นโปรไบโอติกที่ดี (Fuller, 1989) จะทำให้สัตว์ที่ได้รับโปรไบโอติกเจริญ เติบโตมีสุขภาพดี มีน้ำหนักเพิ่ม และต้านทานการเกิดโรคได้ (วิโรจน์, 2522) จากการให้โปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกที่อยู่ในรูปของ Suspension ที่มีจำนวนของแบคทีเรียแลกติก อยู่ 10^8 CFU/ml โดยผสมกับอาหารกุ้งกุลาดำในอัตราส่วนอาหาร 25 กิโลกรัม / 1 ลิตร ของแบคทีเรียแลกติกแล้วเคลือบทับด้วยน้ำมันปลาให้อาหารที่ผสมแบคทีเรียแลกติกแก่กุ้งกุลาดำเป็นเวลา 1 เดือนโดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกได้รับอาหารกุ้งกุลาดำที่เคลือบทับน้ำมันปลาเพียงอย่างเดียวจะเห็นได้ว่ากลุ่มที่ได้

รับโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกจะมีน้ำหนักเฉลี่ยอัตราการเจริญเติบโตต่อวัน และอัตราการรอดตายสูงกว่ากลุ่มควบคุม และเมื่อตรวจนับจำนวนของแบคทีเรียแลกติกที่พบในทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำเมื่อได้รับโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกครบเวลา 1 เดือนพบว่าจะพบแบคทีเรียแลกติกทั้งหมดอยู่ในช่วง 10^2-10^5 CFU/g ซึ่งจะพบแบคทีเรียแลกติกในชุดการทดลองที่ได้รับโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกสำรับชุดควบคุมจะพบแบคทีเรียแลกติกน้อยมากคือ 1.1 x 10^2 CFU/g จากการทดลองของ Gastesoupe (1991) ได้ทำการตรวจนับจำนวนของแบคทีเรียแลกติกที่แยกจากลำไส้ของปลา Atlantic cod ที่ได้รับอาหารที่ผสม *Carnobacterium divergens* พบว่าสามารถตรวจนับจำนวนแบคทีเรียแลกติกใน pyloric caeca ได้ 10^4 CFU/g และพบว่าใน Atlantic cod ที่ไม่ได้รับแบคทีเรียแลกติกจะตรวจไม่พบแบคทีเรียแลกติกใน pyloric caeca

สำหรับการตรวจนับจำนวน *Vibrio* sp. ในทุกชุดการทดลองนั้นพบว่า *Vibrio* sp. ที่ตรวจพบนั้นให้โคโลนีสีเหลืองมากกว่าโคโลนีสีเขียวนั่นหมายความว่า *Vibrio* sp. ที่พบนั้นสามารถที่จะหมักน้ำตาลซูโครสในอาหารแข็ง TCBS จากการรายงานของ Garriques and Wyban (1993) พบว่า *V.* alginolyticus ที่สามารถหมักน้ำตาลซูโครสได้ถือว่าเป็น “good vibrio” และจากการทดลองของ Lightner (1993) พบว่าการใช้จุลินทรีย์ควบคุมปริมาณเชื้อ *Vibrio* sp.ให้น้อยลงโดยการใช้น้ำตาลทราย 3 กิโลกรัมต่อไร่ ใส่ลงในบ่อเลี้ยงเพื่อให้เชื้อจุลินทรีย์กลุ่มที่สามารถใช้น้ำตาลทรายได้เพิ่มจำนวนมากขึ้นทำให้แบคทีเรียก่อโรค เช่น *V. parahaemolyticus* และ *V. harveyi* ซึ่งเป็นกลุ่มที่ไม่สามารถใช้น้ำตาลทรายเป็นแหล่งอาหาร ทำให้เจริญได้น้อยลง จากการรายงานของ Clements (1997) พบว่าแบคทีเรียแกรมลบ facultative anaerobe ที่พบได้ทั่วไปในทางเดินอาหารของปลา หอย กุ้ง ปู จะมีจำนวนของแบคทีเรียแกรมลบมากในส่วนของลำไส้ส่วนหลัง และเมื่อนำกุ้งที่เหลือมาทดสอบกับเชื้อก่อโรคซึ่งในการทดลองใช้ *V. harveyi* ที่ความเข้มข้น 10^7 CFU/ml ฉีดให้กุ้งกุลาดำทุกตัวในทุกชุดการทดลองพบว่ากลุ่มที่ได้รับโปรไบโอติก

แบคทีเรียแลกติกจะมีอัตราการรอดตายหลังจากการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคมากกว่า 50% ทุกชุดการทดลองแต่พบว่าในชุดควบคุมมีอัตราการรอดตายเพียง 50% จากผลการทดลองพบว่ากลุ่มทดลองที่ได้รับโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติก 4 ชุดการทดลองมีอัตราการรอดตาย 100% นั่นคือชุดทดลองที่ได้รับโปไบโอติกแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *E. faecalis* AM35 , *E. faecium* AM107, *L. salivarius* AM111 และ *L. farciminis* AM115 ไม่มีการติดเชื้อ *V. harveyi* และเมื่อนำกุ้งที่ตายมาทดสอบว่ามีสาเหตุการตายมาจาก *V. harveyi* หรือไม่โดยนำกุ้งที่ตายมาเพาะเชื้อบนอาหารแข็ง TCBS และแข็ง TSA ที่เติม 1.5% โซเดียมคลอไรด์ พบว่าจะให้โคโลนีสีเขียวบนอาหาร TCBS และเรืองแสงบนอาหารแข็ง TSA แสดงว่ากุ้งที่ตายมีสาเหตุการตายมาจากการติดเชื้อ *V. harveyi* ที่ฉีดเข้าไปเนื่องจาก *V. harveyi* เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคเรืองแสงในกุ้งกุลาดำ (มณเฑียร และคณะ, 2533) และในกุ้งแชบ๊วย (*Penaeus merguiensis*) ในประเทศไทย (ดารุณี และคณะ, 2530) จากการรายงานของ Chen *et al*. (1992) พบว่า *V. harveyi* จำนวน 1.3×10^6 CFU/ml ทำให้เกิดการตายอย่างมีนัยสำคัญของกุ้งกุลาดำระหว่างกลุ่มทดลองกับชุดควบคุมและจากการรายงานของ Prayitno และ Latchford (1995) พบว่า *V. harveyi* จำนวน 10^3 CFU/ml ทำให้ตัวอ่อนของกุ้งกุลาดำและกุ้งขาวอินเดีย (*Penaeus incidus*) แสดงอาการของโรคได้แต่ความรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับอายุของกุ้งกุลาดำด้วยจากการทดลองของ Gildberg *et al*. (1995) ได้ทำการทดลองเลี้ยงปลา Atlantic salmon ด้วยอาหารที่แบ่งได้ 3 ชุดการทดลองนั่นคืออาหารปลาที่ผสม 10% cod muscle protein, 10% hydrolysate cod muscle protein และ 10% hydrolysate ของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากทางเดินอาหารของปลา Atlantic salmon พบว่าทุกชุดการทดลองมีการเจริญเติบโตเท่า ๆ กันโดยมีอัตราการเจริญเติบโตต่อวันเท่ากับ 2.5% ต่อวัน และเมื่อตรวจนับจำนวนแบคทีเรียในลำไส้ปลาพบว่ามีจำนวนแบคทีเรียน้อยมากในชุดการทดลองที่ 1 และ 2 แต่ในชุดการทดลองที่ 3 จะพบแบคทีเรียแลกติกเจริญได้ในลำไส้ของ Atlantic salmon และเมื่อให้อาหารเป็นเวลา 5 สัปดาห์ จึงทำการทดลอง

การเหนี่ยวนำให้เกิดโรคโดยใช้ *Aeromonas salmonicida* (10^8 Cell/ml) เมื่อครบ 4 อาทิตย์ พบว่ามีอัตราการตายของ Atlantic salmon อยู่ระหว่าง 42 - 75% และพบว่ามีอัตราการตายของ Atlantic salmon สูงในชุดการทดลองที่มีแบคทีเรียแลกติกแต่เมื่อทดสอบทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) กับชุดการทดลองที่ได้รับ cod muscle protein และ hydrolysate cod muscle protein และจากการทดลองของ Gildberg and Mikkelsen (1998) ได้นำ *Carnobacterium divegens* ที่แยกได้จาก Atlantic cod และ Atlantic salmon และเมื่อนำมาทดสอบในห้องปฏิบัติการพบว่า *C. divegens* สามารถยับยั้งการเจริญของ *V. anguillarum* ได้จึงนำ *C. divegens* (10^8 CFU/g) มาผสมกับอาหารเพื่อนำไปเลี้ยง Atlantic cod เป็นเวลา 3 สัปดาห์หลังจากนำ Atlantic cod นั้นมาทดสอบกับเชื้อก่อโรคโดยนำไปแช่ด้วย *V. anguillarum* (10^7 CFU/ml) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังนั้น 12 วัน พบว่าปลาที่ได้รับ *C. divegens* ที่แยกได้จาก Atlantic salmon จะมีอัตราการตายลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (P <0.05)

จากการทดลองในครั้งนี้พบว่าสามารถคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีคุณสมบัติในการเป็นโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกได้ 9 สายพันธุ์แต่เมื่อนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำพบว่ามีแบคทีเรียแลกติก 4 สายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติเด่นกว่าแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์อื่น ๆ นั่นคือแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *E. faecalis* AM35, *E. faecium* AM107, *L. salivarius* AM111 และ *L. farciminis* AM115 ให้ผลอัตราการรอดตายหลังจากการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคโดย *V. harveyi* 100% ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีอัตราการรอดตาย 50%