



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การคัดเลือกจุลินทรีย์สายพันธุ์ธรรมชาติที่มีประโยชน์จากระบบ
ทางเดินอาหารกุ้งกุลาดำ

**Selection of beneficial microflora from digestive tracts of
black tiger shrimps**

นางสาวอำไพทิพย์ สุขหอม

กันยายน 2554

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การคัดเลือกจุลินทรีย์สายพันธุ์ธรรมชาติที่มีประโยชน์จาก
ระบบทางเดินอาหารกุ้งกุลาดำ

**Selection of beneficial microflora from digestive tracts of
black tiger shrimps**

นางสาวอำไพทิพย์ สุขหอม
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: PDF/57/2544

ชื่อโครงการ: การคัดเลือกจุลินทรีย์สายพันธุ์ธรรมชาติที่มีประโยชน์จากระบบทางเดินอาหารกุ้งกุลาดำ

ชื่อนักวิจัย: นางสาวอำไพทิพย์ สุขหอม

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา

E-mail Address : ampaithip.s@psu.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี +

ศึกษาจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำ 3 กลุ่มคือ กุ้งแข็งแรง กุ้งติดเชื้อแบคทีเรีย และไวรัส อย่างละ 13 ตัว พบว่าปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนอาหาร Tryptic soy agar (TSA) และปริมาณเชื้อไวรัสที่เจริญบนอาหาร TCBS แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ระหว่างกุ้งทั้งสามกลุ่ม ทั้งนี้พบว่ากุ้งที่ติดเชื้อไวรัสมีปริมาณแบคทีเรียและไวรัสทั้งหมดสูงกว่ากุ้งอีกสองกลุ่ม กล่าวคือมีปริมาณ 9.01 ± 0.45 และ $6.56 \pm 0.06 \log_{10} \text{ cfu/g}$ ตามลำดับ ส่วนกุ้งติดเชื้อแบคทีเรียมีปริมาณ 8.80 ± 0.30 และ $6.15 \pm 0.37 \log_{10} \text{ cfu/g}$ และกุ้งปกติมีปริมาณ 8.44 ± 0.32 และ $6.36 \pm 0.37 \log_{10} \text{ cfu/g}$ ตามลำดับ บนอาหาร TSA พบแบคทีเรีย 8 ชนิด ที่พบสูงสุด 3 อันดับแรกคือ *Micrococcus* spp., *Corynebacterium* spp. และ *Staphylococcus* spp. ชนิดอื่น ๆ ที่พบได้แก่ คือ *Bacillus* spp., *Enterobacter* spp., *E. coli*, *Flavobacterium* spp. และ *Vibrio* spp. จากการเทียบเคียงเฉพาะกลุ่ม *Vibrio* spp. จากอาหาร TCBS พบทั้งหมด 15 สปีชีส์ ที่พบสูงสุด 3 อันดับแรกคือ *V. cincinnatiensis*, *V. vulnificus* B₂ และ *V. carchariae* ส่วนชนิดอื่น ๆ ที่พบได้แก่ คือ *V. alginolyticus*, *V. cambellii*, *V. damsela*, *V. harveyi*, *V. logei*, *V. marinus*, *V. mediterranei*, *V. mimicus*, *V. natriegens*, *V. orientalis*, *V. pelagius* I และ *V. pelagius* II ส่วนการศึกษาชนิดของแบคทีเรียแลคติกจากระบบทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำที่เจริญบนอาหาร MRS โดยอาศัยความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการพบว่าส่วนใหญ่เป็นเชื้อในกลุ่ม *Enterococcus* spp.

เมื่อนำเชื้อที่แยกได้จากกุ้งกุลาดำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคเรืองแสง *V. harveyi* พบว่ามีการยับยั้งจาก filamentous actinomycetes, lactic acid bacteria, *Bacillus* spp., และ *V. alginolyticus* แต่ไม่พบการยับยั้งจากยีสต์

จากการคัดเลือกจุลินทรีย์โปรไบโอติกด้วยการเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่มีการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคเรืองแสงด้วยอาหารที่ผสมเชื้อแบคทีเรียแลคติกและยีสต์พบว่าแบคทีเรียแลคติกจำนวน 4 สายพันธุ์ และยีสต์จำนวน 1 สายพันธุ์ ที่ทำให้กุ้งกุลาดำมีอัตราการรอดตายถึง 100%

การศึกษาในครั้งนี้ยืนยันได้ว่าระบบทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำมีเชื้อจุลินทรีย์ที่หลากหลายอาศัยอยู่ร่วมกัน และการเสริมจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่เป็นประโยชน์ลงในอาหารเลี้ยงกุ้งสามารถช่วยให้กุ้งมีชีวิตรอดจากการรุกรานของเชื้อก่อโรคได้

คำหลัก : กุ้งกุลาดำ จุลินทรีย์ประจำถิ่น โปรไบโอติกของกุ้ง

Abstract

Project Code : : PDF/57/2544

Project Title : Selection of beneficial microflora from digestive tracts of black tiger shrimps

Investigator : MS. Ampaitip Sukhoom

Department of Microbiology, Faculty of Science Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla.

E-mail Address : ampaithip.s@psu.ac.th

Project Period : 2 years +

Microorganisms from digestive tracts of 3 groups of black tiger shrimps have been investigated from 13 each of healthy, bacterial and viral infected shrimps. The results showed that the total bacterial count TSA medium and the total vibrio count from TCBS medium were not significantly different ($P < 0.05$) between the three groups of shrimps. However, the highest number of both groups was found from viral infected shrimps; 9.01 ± 0.45 and $6.56 \pm 0.06 \log_{10}$ cfu/g, respectively. While in bacterial infected and healthy shrimps were 8.80 ± 0.30 , $6.15 \pm 0.37 \log_{10}$ cfu/g and 8.44 ± 0.32 , $6.36 \pm 0.37 \log_{10}$ cfu/g, respectively. Eight genus of bacteria were found from the TSA medium; *Bacillus* spp., *Corynebacterium* spp., *Enterobacter* spp., *E. coli*, *Flavobacterium* spp., *Micrococcus* spp., *Staphylococcus* spp. and *Vibrio* spp. There were 15 species of vibrios isolated from the TCBS medium; *V. cincinnatiensis*, *V. vulnificus* B₂, *V. carchariae*, *V. alginolyticus*, *V. cambellii*, *V. damsela*, *V. harveyi*, *V. logei*, *V. marinus*, *V. mediteranei*, *V. mimicus*, *V. natriegens*, *V. orientalis*, *V. pelagius* I and *V. pelagius* II. The phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences showed that *Enterococcus* spp. was the dominant group of lactic acid bacteria in the digestive tracts of black tiger shrimps.

Microorganisms isolated from black tiger shrimps were tested for inhibition activity against *V. harveyi*, the causative agent of luminous disease. The inhibition activity was found from actinomycetes, lactic acid bacteria, *Bacillus* spp. and *V. alginolyticus* but not from yeast.

Selection of probiotic bacteria and yeast were conducted by mixing them with shrimp commercial feed for black tiger shrimps cultivation system. There were 4 and 1 isolates of lactic acid bacteria and yeast, respectively that shrimps could survive for 100% when *V. harveyi* was added for challenging.

This study confirmed that there were diverse species of microflora occupied in digestive tracts of black tiger shrimps and supplemented shrimp feed with beneficial probiotics could help shrimps to survive well from invasion of harmful bacteria.

Keywords : black tiger shrimp, normal flora, shrimp probiotics

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ รศ.ดร. กิจการ สุภมาตย์ ภาควิชาวาริชศาสตร์/ ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ปรึกษาและผู้ริเริ่มโครงการวิจัยเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ที่มีคุณภาพสูงเพื่อเป็นส่วนหนึ่งในการพัฒนาอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งของไทยให้ยั่งยืนต่อไป

ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย งบประมาณอุดหนุนการวิจัยและพัฒนาการถ่ายทอดเทคโนโลยี และทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิธานิพนธ์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่สนับสนุนทุนวิจัย

ผู้วิจัยขอขอบคุณผู้บริหาร และเจ้าหน้าที่ของภาควิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และ ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในเรื่องสถานที่ทำวิจัย ตลอดจนสนับสนุนวัสดุอุปกรณ์ในการทำวิจัย และเอื้ออำนวยในทุก ๆ ส่วนเพื่อให้งานวิจัยดำเนินไปได้ด้วยดี

ผู้วิจัยขอขอบคุณเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งทุกท่านที่อนุเคราะห์ในเรื่องตัวอย่างกุ้งกุลาดำที่ใช้ในการศึกษา

ผู้วิจัยขอขอบคุณทีมงานวิจัยจากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ และทีมงานจากศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ได้แก่ผู้ช่วยวิจัย นางสาวยุพา คงทอง และนางสาวกาญจนา คุ่มรักษา นักศึกษาปริญญาโท-ตรี ได้แก่ นางสาวมณฑกานต์ ทองสม นางสาวจิตรวี เขยชม นางสาวหทัยรัตน์ ตัลยารักษ์ นางสาวกัญญา รัตนะ นางสาวสุทธินิ สังขานู นางสาวจิตรโสภณ ไตรวรรณ นายสาริต หลิมจามนัท์ นางสาวสำหรี บุญประสพ นางสาวกนกอร กรีเหลียง นางสาวอัปษะสาเร๊ะ นายจักรพรรดิ แพทย์พรรณ นายสุรศักดิ์ พาณิชย์ นางสาวศศิธร ชูศรี นางสาวกนกวรรณ สันผา นางสาวสุภิกา ลายเจียร นางสาวสุจินดา สมหมาย นางสาวศิริดา นัยผ่องศรี นายเอกชัย สมล้ำ นางสาวภคพิติ กูตะ และนายพิทยา คงหนูบัตร ส่วนที่มาจากศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ นางสาวจิรพร เรืองศรี นายเนเรศ ช้วนยุก นางสาวไมตรี วรรณเดช นางสาวสุณีย์ หวันเหล็ม นางสาวอนิดา สงนุ้ย นางสาวสุพัตรา อรุณรัตน์ และนายจิรวัฒน์ ทัดแก้ว

ขอขอบคุณ Prof. Kim, Won Yong Chung-Ang University, Seoul, Korea และทีมงานที่ให้ความอนุเคราะห์บางส่วนองงานวิจัย

ขอขอบคุณเป็นกรณีพิเศษต่อผู้บริหาร สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และ คุณพรพิมล กิตติมศักดิ์ ในความกรุณาและกำลังใจที่มอบให้แก่ผู้วิจัยมาโดยตลอด

อำไพทิพย์ สุขหอม

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(ii)
Abstract	(iii)
กิตติกรรมประกาศ	(iv)
สารบัญ	(v)
บทนำ	1
การตรวจเอกสาร	2
วิธีการทดลอง	16
ผลการทดลอง	24
วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง	51
เอกสารอ้างอิง	56
ภาคผนวก	62

บทนำ

ปัจจุบันการเลี้ยงกุ้งกุลาดำในประเทศไทยมีปริมาณลดลงเมื่อเทียบกับช่วง 10 ปีที่ผ่านมา แต่ในตลาดต่างประเทศกุ้งกุลาดำแช่แข็งจากประเทศไทยยังมีชื่อเสียงและเป็นที่นิยมของผู้บริโภคเสมอมา ซึ่งจุดนี้เกษตรกรไม่ควรมองข้ามเพื่อตอบสนองต่อความต้องการของตลาดและผู้บริโภค โดยเพิ่มปริมาณการผลิต พร้อมทั้งพัฒนาระบบการเลี้ยงกุ้งชนิดนี้ให้เกิดความยั่งยืน โดยที่กุ้งมีสุขภาพดีต้านทานโรค และเป็นระบบที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และปลอดภัยต่อผู้บริโภค

จุลินทรีย์โปรไบโอติกส์ (probiotics) เป็นทางเลือกหนึ่งในหลาย ๆ ประการที่ทราบกันดีว่าสามารถช่วยในเรื่องดังกล่าวได้ ทั้งนี้ระบบทางเดินอาหารนับว่าเป็นแหล่งที่ดีที่สุดต่อการคัดเลือกจุลินทรีย์โปรไบโอติกส์ที่นำมาใช้กับสัตว์ชนิดนั้น ๆ แนวคิดนี้ได้มีการนำมาปฏิบัติได้จริงในสัตว์กลุ่มต่าง ๆ ทั้งสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และสัตว์น้ำ ซึ่งใช้ในรูป อาหารเสริม หรือผสมในอาหารสัตว์ การคัดเลือกจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่มีประโยชน์นี้ตั้งอยู่บนหลักการพื้นฐานของคุณสมบัติที่ดีหลายประการ เช่น การมีชีวิตรอดได้ดีในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ชนิดนั้น ๆ ทำหน้าที่ช่วยย่อยสลายอาหาร เพิ่มการดูดซึมสารอาหาร การส่งเสริมให้สัตว์มีภูมิคุ้มกันที่ดีขึ้น การสร้างสารที่เป็นประโยชน์ต่อระบบทางเดินอาหาร รวมทั้งสารที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรค ซึ่งคุณลักษณะเหล่านี้นอกจากส่งผลให้ระบบทางเดินอาหารเกิดความสมดุลแล้วยังทำให้สัตว์โตเร็วและมีสุขภาพดี นอกเหนือไปจากการได้รับอาหารที่ถูกต้องตามหลักโภชนาการของสัตว์นั้น ๆ

ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาแบคทีเรียที่พบในระบบทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำปกติและกุ้งเป็นโรคติดเชื้อที่มีสาเหตุจากเชื้อไวรัส และเชื้อแบคทีเรีย โดยศึกษาตั้งแต่อาหารเดินทางเข้าสู่ร่างกายคือปาก-กระเพาะ ลำไส้ จนออกจากร่างกายรวมทั้งตับ ทั้งนี้เนื่องจากโครงสร้างระบบทางเดินอาหารของกุ้งมีการเชื่อมติดต่อไปถึงตับด้วย เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ และนำไปสู่การแยก และทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกส์ของจุลินทรีย์เหล่านั้น เพื่อพัฒนาเป็นจุลินทรีย์โปรไบโอติกส์สำหรับการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ทั้งนี้ผู้วิจัยคาดว่าข้อมูลที่ได้รับจากการศึกษาในครั้งนี้จะมีประโยชน์และคุณค่ามากพอที่จะเป็นส่วนหนึ่งของการพลิกฟื้นสถานการณ์การเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำในประเทศไทยให้เกิดความยั่งยืน เพื่องฟูได้อีกครั้ง

บทตรวจเอกสาร

ลักษณะของกุ้งกุลาดำ

กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) มีชื่อสามัญว่า Black Tiger Prawn หรือ Giant tiger Prawn หรือ Live grass Prawn เป็นกุ้งที่มีขนาดใหญ่ในวงศ์ Penaeidae ถิ่นอาศัยอยู่ในน้ำจืดน้ำเค็มได้ทั่วไทย มาเลเซีย อินโดนีเซีย และอินเดีย เป็นที่นิยมของผู้บริโภคทั้งชาวไทยและชาวต่างประเทศเพราะมีรสชาติดี สีสวย เปลือกแข็ง เนื้อแน่น กรอบ อร่อยไม่ยุ่ง่าย สามารถเก็บรสชาติที่หอมหวานอร่อยของเนื้อกุ้งหลังผ่านการแช่แข็งมาแล้วได้ดี ดังนั้นจึงเป็นเหตุผลที่สำคัญที่กุ้งชนิดนี้ได้รับการต้อนรับจากผู้บริโภคเสมอ จึงเป็นที่ต้องการของตลาดและมีราคาสูง จึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาการเพาะเลี้ยงในส่วนต่าง ๆ ทั้งด้านส่งเสริมสุขภาพกุ้ง และสิ่งแวดล้อม ให้ยั่งยืนต่อไป

1. ลักษณะทั่วไป

กุ้งกุลาดำเป็นกุ้งที่มีขนาดใหญ่ ตัวเต็มวัยมีขนาดยาว 15 - 18 ซม.หนัก 60 - 130 กรัม มีเปลือกหัวเกลี้ยง ไม่มีขน ฟันกรีด้านบนมี 7 - 8 ซี่ ด้านล่าง 3 ซี่ ลำตัวเป็นข้อปล้อง ทั้งหมดมีประมาณ 19 ปล้อง แต่ละปล้องมีรยางค์หนึ่งคู่ รยางค์แต่ละคู่มี หน้าที่แตกต่างกัน ลำตัวของกุ้งแบ่งออกได้เป็น 3 ส่วนใหญ่ ๆ คือ หัว อกและลำตัว

ส่วนหัวมีห้าปล้อง แต่รวมเป็นปล้องเดียวมีเปลือกคลุม เปลือกหุ้มหัวตอนหน้าสุดของปล้องที่หนึ่งจะยื่นเป็นฟันแหลมไปข้างหน้าเรียกว่า กรี ใต้กรีมิตาหนึ่งคู่ ปากกุ้งอยู่ระหว่างขากรรไกร ส่วนหัวมีรยางค์ห้าคู่ สองคู่แรกเป็นหนวดใช้ในการสัมผัส รยางค์คู่ที่สามได้แก่ ขากรรไกรล่างมีหน้าที่ในการขบเคี้ยวอาหาร ส่วนคู่ที่สี่และคู่ที่ห้าเป็นขากรรไกรบน มีหน้าที่เช่นเดียวกับขากรรไกรล่าง

ส่วนอก มีแปดปล้อง ได้แก่ ปล้อง ที่ 6 - 13 รยางค์สามคู่แรก (รยางค์คู่ที่ 6, 7 และ 8) อยู่บนอก เรียกว่า maxillipeds มีหน้าที่ช่วยในการกินอาหาร รยางค์คู่ที่ 9, 10 และ 11 มีลักษณะเป็นก้าม ก้ามแต่ละคู่จะมีขนาดและความยาวใกล้เคียงกัน อันเป็นลักษณะเฉพาะของกุ้งทะเลในวงศ์ Penaeidae รยางค์สามคู่นี้ มีหน้าที่ช่วย ในการจับฉวยอาหารเข้าปาก หรือป้องกันตัวเมื่อมีภัย ส่วนรยางค์คู่ที่ 12 และ 13 เป็นขาสำหรับเดิน เคลื่อนไหว และทำความสะอาดลำตัว

ลำตัวมีหกปล้อง เปลือกปล้องท้องอันที่สองไม่ทับปล้องแรก รยางค์คู่ที่ 14, 15, 16, 17 และ 18 มีลักษณะคล้ายใบพายใช้สำหรับว่ายน้ำ ส่วนรยางค์คู่ที่ 19 หรือหาง ประกอบด้วยแพนหางและหางรูปพัด ยกขึ้นลงได้

กุ้งชนิดนี้มีสีน้ำตาลเข้มและมีแถบสีเข้มกับสีจางพาดขวางตลอดตัว ชอบอยู่ในที่ซึ่งเป็นดินโคลน กินอาหารได้ทั้งพืชและสัตว์ มีความทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงความเค็มของน้ำหากินในเวลา กลางคืน ส่วนในเวลากลางวันมักจะหลบแสงแดดอยู่ตามพื้นหน้าดินหรือซ่อนอยู่ในโคลน กุ้งกุลาดำ วางไข่ในระดับน้ำลึกใกล้กับพื้นดิน ไข่ที่ผสมแล้วจะฟักออกเป็นตัว ลูกกุ้งจะลอกคราบทั้งหมด 6 ครั้ง ก่อนโตเป็นตัวเต็มวัย ซึ่งรวมระยะเวลาการเติบโตทั้งหมดประมาณ 6 - 7 เดือน (ชูศักดิ์ แสงธรรม, 2540)

2. ระบบการกินและการย่อยอาหาร

การทำงานของระบบนี้เริ่มต้นจากการที่เครื่องรับสารเคมี (chemoreceptor) ซึ่งอยู่บริเวณหลอดทางาน โดยอวัยวะนี้จะไวต่อกลิ่นโปรตีน โดยเฉพาะกรดอะมิโน มากที่สุด การใช้ยาระับสารเคมีนี้มีความสำคัญยิ่งกว่าการใช้การเห็น การสัมผัส หรือความรู้สึกอื่น ๆ จากการทดสอบพบว่ามีความไวต่อกรดอะมิโนพวก taurine มาก ที่สุด รองลงมาคือโปรตีน แป้งและกรดไขมัน ดังนั้นสารที่สกัดจากเนื้อปลาทะเล ปลาหมึก และกุ้ง จะกระตุ้นเครื่องรับสารเคมีได้ดีกว่าสารอื่น ๆ

การกระดิกหนวด มักแสดงให้เห็นว่ามีกลิ่นอาหารมากระทบเครื่องรับการกระดิกนั้น เพื่อช่วยเตรียมเครื่องรับและเสริมการทำงานของเซลล์รับสารเคมี ซึ่งพบเซลล์เหล่านี้ได้ตามบริเวณก้ามและส่วนปาก เมื่อมีการสัมผัสสารเคมีจะมีการเคลื่อนไหวและจับอาหารไว้ได้ อาหารจะถูกนำเข้าปากโดยกรามจะจับอาหารเอาไว้และอวัยวะบริเวณปากกับขาจะทำงานร่วมกันเพื่อนำอาหารไปยังช่องปาก

ระบบการย่อยอาหารในกุ้งแบ่งออกเป็น 3 ตอน (ศิริเพ็ญ สุภัทรวาทิน, 2528)

1. ทางเดินอาหารตอนต้น (Stomodaeum หรือ Fore gut)

เริ่มตั้งแต่ปากถึงกระเพาะด้านในบุด้วยสารไคติน เกิดจากชั้นเอกโตเดิร์ม ทางเดินอาหารตอนต้นนี้ประกอบด้วย

- 1.1 ปากอยู่ระหว่างเขี้ยว (mandible) ทั้ง 2 มีริมฝีปากบนนุ่ม ๆ (labrum) และริมฝีปากกลาง (labium) ล้อมรอบไว้
- 1.2 หลอดอาหารสั้น ๆ มีผนังหนา มีเยื่อบุเซลล์เป็นทรงกระบอก
- 1.3 กระเพาะ (stomach หรือ proventriculus) มีกระเพาะขนาดใหญ่ผนังบางและแบ่งเป็น 2 ตอน กระพุ้งใหญ่ตอนหน้าเรียก คาร์ดิแอก แคมเบอร์ (cardiac chamber) ซึ่งเป็นทางเดินอาหารตอนต้น ผนังล่างของกระเพาะตอนนี้มีโครงแข็งภายในเห็นเป็นกล้ามเนื้อแข็งเป็นสันขึ้นมาทำหน้าที่ช่วยบดอาหารคล้ายฟันเรียก แกสตริกมิลหรือไคตินัสทีซ (gastric mill or chitinous teeth) ทำหน้าที่ในการบดเคี้ยวอาหาร คลุกเคล้าและแยกส่วนย่อยของอาหาร กระเพาะอาหารตอนต้นมีผนังที่มีไคตินมาก กระพุ้งเล็กตอนหลังเรียกไพโลริกแคมเบอร์ (pyloric chamber) เป็นส่วนที่เจริญมาจากชั้นเอนโดเดิร์ม

2. ทางเดินอาหารตอนกลาง (Mesenteron หรือ Midgut)

คือ ไพโลริก แคมเบอร์นั่นเองกระเพาะตอนนี้อยู่ในมังกุ้ง

3. ทางเดินอาหารตอนปลาย (Proctodeum หรือ Hind gut)

คือลำไส้ซึ่งต่อจากไพโลริกแคมเบอร์ ลงไปเป็นท่อเล็ก ๆ บุด้วยเอกโทเดิร์ม ลำไส้ตอนต้นฝังอยู่ในมังกุ้งแล้ววิ่งพาดอยู่เหนือกล้ามเนื้อเฟลเซอร์ (fensor) ทางด้านหลังของลำไส้มีเส้นเลือดดอร์ซัลแอบโดมินัล อาร์เทอรี (dorsal abdominal artery) วิ่งขนานไปถึงหาง ปลายลำไส้เปิดสู่ทวารหนัก กลางทางด้านท้อง ลำไส้กุ้งชาวบ้านมักเรียกกันว่า ขี้กึ่งนั่นเอง เพราะมักมีกากอาหารดำ ๆ ติดอยู่ ต่อมาสร้างน้ำย่อยอาหาร คือ ตับอ่อน (hepatopancreas) หรือเรามักเรียกว่ามังกุ้งนั่นเอง มีลักษณะสีเหลือง

ปนแสด อ่อนนุ่ม ขนาดใหญ่ อยู่ส่วนนอกเกือบเต็มหมด มีหลอดเล็ก ๆ มากมาย สร้างน้ำย่อย แล้วดูดซึมเข้าลำไส้ และดูดซึมอาหารที่ย่อยแล้วหลังจากร่างกายเหลือใช้แล้วเก็บไว้ด้วยอีกหน้าที่หนึ่ง

การกินอาหาร กุ้งใช้ก้ามเล็ก คู่ที่ 1 และ 2 จับอาหารเข้าปาก แล้วใช้เขี้ยวหรือสำเภากุ้งฉีกบดให้เล็กลงแล้วส่งเข้าสู่หลอดอาหารต่อไป กากอาหารออกทางทวารหนักในที่สุด

3. โรคติดเชื้อจุลินทรีย์ที่พบในบ่อกุ้ง

สาเหตุที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย

1. โรคเสียนดำ กุ้งมีอาการคล้ายมีเสียนดำที่มแทงในกล้ามเนื้อในลักษณะต่าง ๆ กัน สาเหตุเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio vulnificus* ที่มีอยู่ทั่วไปในธรรมชาติและในตัวกุ้ง จะทำอันตรายต่อกุ้งเมื่อสภาวะแวดล้อมเสื่อมโทรม และกุ้งเกิดบาดแผลขึ้นโดยเชื้อเข้าสู่ตัวกุ้งแล้วถูกกระบวนการป้องกันตัวกุ้งเอามาต่อสู้จนเป็นเสียนดำ

การป้องกันและการแก้ไข ทำการสำรวจว่ากุ้งเริ่มมีจุดดำหรือเสียนดำอยู่ตามเปลือกหรือไม่ ในช่วงแรกที่พบหากมีการกระตุ้นให้กุ้งลอกคราบเสียนดำจะหลุดออกไปพร้อมคราบ หรือใช้สารปฏิชีวนะในการรักษาด้วย แต่ถ้าปล่อยไว้เสียนดำฝังลึกเข้าไปในเนื้อกุ้งนานจนเกินไปก็จะไม่สามารถแก้ไขได้ อย่างไรก็ตามการรักษาความเค็มของน้ำเลี้ยงกุ้งให้มากกว่า 20 ส่วนในหนึ่งพัน และหลีกเลี่ยงการเลี้ยงอย่างหนาแน่น (วัลลภ คงเพิ่มพูล, 2532) จะสามารถป้องกันการเกิดโรคได้

2. โรคเหี่ยวกร่อน หางเปื่อย ขาเปื่อยดำ หรือเปลือกเปื่อยดำ เกิดจากแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* spp. อาการของโรคพบว่าบริเวณที่ติดเชื้อแบคทีเรียจะมีสีน้ำตาลและสีเข้มขึ้นเรื่อย ๆ จนเป็นสีดำ เปลือกกุ้งบริเวณนั้นจะเปื่อยกร่อนเป็นบริเวณกว้างขึ้น ถ้าเป็นรยางค์หาง ขา หรือ หนวดจะเปื่อยหลุดที่โคน ๆ ถ้าเป็นมาก ๆ จะตายได้

การป้องกันและการแก้ไข คือการปรับปรุงคุณภาพน้ำและใช้สารปฏิชีวนะในการรักษาร่วมด้วย (วัลลภ คงเพิ่มพูล, 2532)

3. โรคตายเดือน โรคนี้มักเกิดขึ้นในกรณีสภาพบ่อไม่ดี มีสาหร่ายตามกันบ่อมากในระยะเริ่มต้นตอนแรก ๆ ของการเลี้ยงกุ้ง ต่อมาเมื่อสาหร่ายตายและย่อยสลายเน่าเปื่อย เมื่อกุ้งอยู่ในบริเวณนั้นนาน ๆ โดยเฉพาะหลังการลอกคราบจะทำให้กุ้งติดเชื้อแบคทีเรียได้ง่าย เมื่อกุ้งติดแบคทีเรียจะทำให้เปลือกเกิดเป็นแผล และแบคทีเรียจะผ่านเข้าไปถึงกล้ามเนื้อ และหากเชื้อสามารถเข้าไปในระบบเลือดจะทำให้กุ้งตายในที่สุด

การป้องกันและการแก้ไข ด้วยการปรับปรุงคุณภาพน้ำให้ดี และอาจต้องใช้สารปฏิชีวนะช่วยในการกำจัดโรค (พรเลิศ จันทรรักษ์ชกุล และคณะ, 2537)

4. โรคเรืองแสง ลูกกุ้งมีอาการอ่อนแอไม่ค่อยว่ายน้ำ ในระยะแรก ๆ กุ้งเริ่มเปลี่ยนเป็นสีแดง แล้วจะขุ่นขาว ถ้าเป็นระยะ mysis ลำตัวจะหักงอ ในกรณีที่กุ้งติดเชื้อมาก ๆ ลูกกุ้งจะจมลงไปยังก้นบ่อและตายภายในระยะเวลา 1 – 2 วัน สาเหตุของอาการดังกล่าวเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* สังเกตดูลูกกุ้งที่ป่วยหรือตายในเวลากลางคืนขณะที่ปิดไฟและทำให้สายตาชินกับความมืด

แล้วมองลงไปใบบ่อกุ้งที่มีแสงสลัวจะเห็นจุดสีเขียวเล็ก ๆ ระเบียบระยะย้ายแสงหึ่งห้อยลอยขึ้นลงตามการเคลื่อนไหวของลูกกุ้ง เมื่อนำกุ้งที่เรืองแสงมาทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร TCBS (Thiosulfate Citrate Bile salt Sucrose Agar) จะมีแบคทีเรียที่เรืองแสงสีเขียวขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ แม้ว่า *V. harveyi* จะเป็นสายพันธุ์ที่สามารถเกิด bioluminescent ได้แต่บางครั้งก็ไม่เรืองแสงเชื้อนี้ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเกลือ NaCl ปกติแล้ว *V. harveyi* จะอาศัยแบบ symbiosis กับสัตว์ทะเลหลายชนิด จึงพบได้ทั่วไปในทะเล เชื้อนี้ดื้อต่อยา penicillin และ tetracyclin แต่ไวต่อยา chloramphenicol และ novobiocin

การป้องกันและแก้ไข โดยการทำลายแบคทีเรียในน้ำที่ต้องการใช้เลี้ยงกุ้ง โดยใช้คลอรีน หรือฟอร์มาลิน ถ้ากุ้งที่ติดเชื้อมากเกษตรกรมักใช้คลอแรมฟินิคอลในการรักษา ซึ่งปัจจุบันเป็นเหตุผลสำคัญที่ทำให้มีการกีดกันทางการค้า (ลิลา เรืองแป้น, 2530)

5. โรคช้ำขาว อาการคือลำไส้ตอนต้นของกุ้งอ้าเสบ ขุ่นขาว ชี้น้ำจะเป็นสีขาว ในกรณีที่มีกุ้งเป็นสีขาวจำนวนมากจะพบช้ำกุ้งลอยตามน้ำอยู่บริเวณริมขอบบ่อด้านปลายลม พบโรคช้ำขาวมากขึ้นในแหล่งเลี้ยงกุ้งทั่วประเทศ หลังจากเริ่มเลี้ยงได้ประมาณ 60 วัน ซึ่งส่วนใหญ่จะมีความสัมพันธ์กับสภาพพื้นบ่อที่ไม่ดี เกิดจากอาการลำไส้ตอนบนของกุ้งตอนบนอ้าเสบ เนื่องจากอาหารที่ปนเปื้อนเชื้อรา หรืออาหารมีคุณภาพต่ำ เช่นปลาป่นที่มีคุณภาพต่ำและปนเปื้อนแคปซูลของแบคทีเรีย เกิดการติดเชื้อจากแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. อย่างไรก็ตามเชื่อว่าโรคช้ำขาวเกิดอาจเกิดจากเชื้อโปรโตซัวกริการินส์ (gregarines) เนื่องจากในบางพื้นที่มีการพบโปรโตซัวกริการินส์ในทางเดินอาหารเป็นจำนวนมาก

การป้องกันและแก้ไข โดยใช้ยากกลุ่มซัลฟาผสมกับอาหารให้กุ้งกินควบคู่กับการจัดการสภาพพื้นบ่อ และคุณภาพน้ำในระหว่างการเลี้ยงที่ดี ร่วมกับการใช้แบคทีเรียโปรไบโอติกส์ ผสมกับอาหารให้กุ้งกิน (<http://www.thailandshrimp.com>, 11/2010)

สาเหตุที่เกิดจากเชื้อไวรัส

1. โมโนดอน แบคคิวโลไวรัส หรือ MBV (Monodon Baculovirus or MBV) ไวรัสเอ็มบีวี จะพบได้ทุกระยะของการเลี้ยงกุ้ง แต่พบมากในกุ้งระยะ PL20 จนถึงอายุ 3 เดือน ระยะที่มีผลกระทบมากที่สุดคือกุ้งในระยะวัยอ่อน กุ้งในบ่อเลี้ยงที่มีเชื้อเอ็มบีวีอยู่อาจจะไม่แสดงอาการป่วยให้เห็น แต่เมื่อสภาพแวดล้อมเกิดการเปลี่ยนแปลงกุ้งเกิดความเครียด กุ้งจะตายได้ และถ้ามีการติดเชื้อแบคทีเรียด้วย จะทำให้เกิดความเสียหายมาก โรคที่เกิดจากไวรัสชนิดนี้สามารถติดต่อกันได้ทางช้ำกุ้ง หรือหากกุ้งกินซากกุ้งที่เป็นโรค

การป้องกันและการแก้ไข วิธีที่ดีที่สุดคือควรมีการคัดเลือกลูกกุ้งที่ไม่เป็นโรคก่อนนำมาเลี้ยง (จิราพร เกษรจันทร์, 2537)

2. เฮปพาโตแพนครีเอติก พาโว-ไลค์ไวรัส หรือ HPV (Hepatopancreatic Parvo-like virus) ไวรัสชนิดนี้พบวาระบาดในกุ้งกุลาดำในช่วงต้นปี 2537 และพบการติดเชื้อชนิดนี้ในกุ้งที่มีอายุเดือนครึ่งขึ้นไปกุ้งที่ติดเชื้อจะกินอาหารลดลง ตัวและ ตัวอ่อนจะบวมโต กุ้งไม่โตและจะตายไป มักจะพบแบคทีเรียเส้นสาย (Filamentous bacteria) เกาะตามขาหรือร่างกายทำให้กุ้งตายมากขึ้น

การป้องกันและการแก้ไข ยังไม่มียาหรือสารเคมีใด ๆ ที่รักษาโรคที่เกิดจากไวรัสได้ ได้มีการศึกษาเพื่อผลิตวัคซีนให้กึ่งเกิดภูมิคุ้มกันโรค อย่างไรก็ตามวิธีป้องกันที่ดีที่สุดคือ มีการจัดการบ่อที่ดี ควบคุมคุณภาพน้ำ ป้องกันให้กึ่งเครียดน้อยที่สุด คัดเลือกพันธุ์กึ่งที่ปลอดโรคมีสุขภาพดีและแข็งแรง (จิราพร เกษรจันทร์, 2537)

3. ไวรัสหัวเหลือง (Yellow-head Baculovirus หรือ YBV) เป็นไวรัสที่มีความรุนแรงมาก ก่อให้เกิดความเสียหายต่ออุตสาหกรรมเลี้ยงกึ่งมากที่สุดตั้งแต่ปี 2533 จนถึงปัจจุบัน จะพบไวรัส YBV ได้ในกึ่งตั้งแต่ปล่อยลงเลี้ยงจนถึงจับขาย ลักษณะอาการคือ กึ่งจะกินอาหารมากขึ้นอย่างผิดปกติในระยะแรก และค่อย ๆ ลดลง กึ่งจะลอยตัวอยู่ผิวน้ำ บริเวณส่วนหัวจะมีสีเหลือง โดยเฉพาะตัวบ่ออ่อนจะบวมและมีสีเหลือง เหงือกจะเป็นสีเหลือง และสุดท้ายกึ่งจะตายอย่างรวดเร็ว

การป้องกันและการแก้ไข ไม่มียาหรือสารเคมีที่จะรักษาโรคกึ่งหัวเหลืองได้ ดังนั้นการป้องกันที่ดีคือ มีการจัดการบ่อที่ดี คัดเลือกพันธุ์กึ่งที่มีความแข็งแรง และให้อาหารที่มีคุณภาพดี (จิราพร เกษรจันทร์, 2537)

4. วีเชพไวรัส หรือ VV (V-shaped virus) พบไวรัสนี้ในช่วงต้นปี 2537 มีขนาดเล็กกว่าไวรัสวายบีวี ลักษณะอาการคือกึ่งจะทยอยกันขึ้นมาตาย และพบแบคทีเรียบริเวณกล้ามเนื้อ ตัวบ่ออ่อนรวมด้วย

การป้องกันและการแก้ไข ไม่มียาหรือสารเคมีที่ใช้รักษาโรคที่เกิดจากไวรัสได้ การป้องกันเน้นการจัดการบ่อที่ดี เลี้ยงพันธุ์กึ่งที่แข็งแรง ให้อาหารที่มีคุณภาพจะเป็นวิธีที่ดีที่สุด (จิราพร เกษรจันทร์, 2537)

5. ไวรัสตัวแดงดวงขาว (Systemic Ectodermal and Mesodermal Baculovirus หรือ SEMBV) พบไวรัสชนิดนี้ระบาดอย่างกว้างขวางในทวีปเอเชีย และพบในประเทศไทยในช่วงปลายปี 2537 ทางภาคตะวันออกและภาคใต้ ลักษณะอาการคือ กึ่งที่ติดเชื้อไวรัสจะมีอาการจุดขาว ในเนื้อเยื่อได้ชั้นเปลือกที่บริเวณส่วนหัว กึ่งบางตัวอาจมีสีแดง แต่ส่วนใหญ่จะมีสีปกติ จะพบไวรัสชนิดนี้ได้ในทุกกระยะ กึ่งที่ติดเชื้อไวรัสนี้จะตายหมดบ่อภายใน 7 – 10 วัน

การป้องกันและการแก้ไข ป้องกันไม่ให้ตัวพาหะ เช่น ปูชนิดต่าง ๆ นก แมลง นำไวรัสตัวแดงดวงขาวปะปนเข้ามาในระบบการเพาะเลี้ยง ควรจะมีการจัดการสภาพแวดล้อมในบ่อให้เหมาะสม (เปี่ยมศักดิ์ เมนะเสวต, 2539)

กึ่งที่ตรวจพบมีการติดเชื้อไวรัสเกิดขึ้นนั้น การรักษาให้หายขาดจะทำได้ยากเพราะจะเพิ่มจำนวนอยู่ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตเท่านั้น ถ้าไวรัสมีความรุนแรงมากกึ่งจะตายอย่างรวดเร็ว การใช้ยาหรือสารปฏิชีวนะในการรักษาไม่ได้ผล นอกจากจะใช้สารปฏิชีวนะในความเข้มข้นสูง ๆ ในการรักษา ซึ่งสารปฏิชีวนะที่ใช้จะต้องแทรกเข้าไปในตัวกึ่งเท่านั้นจึงจะมีผลต่อการทำลายเชื้อได้ ในขณะเดียวกันสารปฏิชีวนะที่ใช้จะไปทำลายองค์ประกอบต่าง ๆ ภายในของกึ่ง และในการรักษาโรคที่ติดเชื้อแบคทีเรียที่เกิดในกึ่งพบว่าเกษตรกรผู้เลี้ยงกึ่งส่วนใหญ่จะใช้สารปฏิชีวนะในการรักษาโรค แต่การใช้สารปฏิชีวนะให้ได้ผลนั้นต้องขึ้นกับความรู้ความเข้าใจ และความชำนาญ รวมทั้งต้องมีการ วินิจฉัยโรคให้ถูกต้องด้วย

การใช้ยาไม่ถูกวิธีนอกจากจะเป็นการสิ้นเปลืองและไม่ได้ผลในการรักษาแล้วยังก่อให้เกิดปัญหาการดื้อยาของแบคทีเรียและพยาธิสารถดค้างในเนื้อก้าง ซึ่งไม่เหมาะสมต่อการบริโภคและเป็นปัญหาในการส่งก้างไปจำหน่ายยังตลาดต่างประเทศ

สารปฏิชีวนะที่ใช้ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ เป็นสารที่ออกฤทธิ์ต่อจุลินทรีย์ต่าง ๆ ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำจะไม่ใช้สารปฏิชีวนะผสมในอาหารกุ้ง แต่จะให้กุ้งกินโดยตรง หรือละลายน้ำแช่ลูกกุ้งเพื่อการรักษาโรคที่ติดเชื้อแบคทีเรีย สารปฏิชีวนะที่ใช้ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำและเกิดสารถดค้างได้แก่ oxytetracycline, chloramphenicol และ sulfa drug เป็นต้น

4. จุลินทรีย์กับการเลี้ยงกุ้ง

ความสัมพันธ์ระหว่างกุ้งกุลาดำ สิ่งแวดล้อมในบ่อเลี้ยงกุ้งและเชื้อโรค เป็นปัจจัยสำคัญในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ความสัมพันธ์ดังกล่าวเป็นไปในเชิงขนาน กล่าวคือถ้ามีการจัดการคุณภาพน้ำ คุณภาพดินและออกซิเจนที่ละลายน้ำให้เหมาะสม และไม่มีเชื้อก่อโรคในบ่อกุ้งในปริมาณที่สูง จะทำให้กุ้งมีการเจริญเติบโตและสุขภาพดี แต่ในทางตรงกันข้ามถ้าการจัดการสิ่งแวดล้อมไม่ดีและมีเชื้อก่อโรคในปริมาณที่สูง กุ้งก็มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคและตายในที่สุด บทบาทของจุลินทรีย์ต่อระบบนิเวศในบ่อเลี้ยงกุ้ง เป็นตัวช่วยการหมุนเวียนของแร่ธาตุเกิดความสมบูรณ์และสมดุล และทำให้เกิดการย่อยสลายโมเลกุลใหญ่ให้ได้หน่วยย่อยที่เล็กลง (ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์, 2539)

ปัจจุบันได้มีการผสมจุลินทรีย์ที่ช่วยส่งเสริมให้เกิดความสมดุลในระบบทางเดินอาหารลงในอาหารกุ้ง เรียกว่าโปรไบโอติกส์ (probiotics) Parker (1974) เป็นคนแรกที่ใช้คำว่าโปรไบโอติกส์ และให้คำจำกัดความว่าจุลินทรีย์หรือสสารที่เป็นตัวทำให้จุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารเกิดความสมดุล ต่อมา Havenaar และ Huis (1992) ได้ให้ความหมายของโปรไบโอติกส์ ว่าหมายถึงจุลินทรีย์ชนิดใดชนิดหนึ่งหรือหลายชนิดที่ให้กับสัตว์แล้วส่งผลดีต่อตัวสัตว์เอง ส่วน Verschuere *et al.* (2000) เสนอความหมายของคำว่า โปรไบโอติกส์สำหรับสัตว์น้ำโดยเฉพาะ คือกลุ่มจุลินทรีย์ที่ช่วยป้องกันจุลินทรีย์ก่อโรคไม่ให้เพิ่มปริมาณในระบบทางเดินอาหาร บนโครงสร้างภายนอกร่างกายและในสิ่งแวดล้อม ช่วยในระบบการย่อยอาหารทำให้สามารถใช้อาหารได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น กระตุ้นภูมิคุ้มกันของสัตว์เจ้าเรือน รวมทั้งช่วยในการปรับปรุงคุณภาพน้ำ แต่ไม่ได้รวมถึงจุลินทรีย์ที่เป็นสารอาหารให้กับสัตว์เจ้าเรือนโดยที่ไม่มีกิจกรรมใด ๆ ในสัตว์เจ้าเรือน หรือไม่มีความสัมพันธ์ใด ๆ กับจุลินทรีย์อื่น ๆ หรือกับสิ่งแวดล้อมของสัตว์เจ้าเรือน

เนื่องจากโปรไบโอติกส์ช่วยย่อยสลายสารอาหารและเพิ่มการดูดซึมสารอาหารให้ดีขึ้น ช่วยลดปัญหาการเกิดโรค ทำให้มีอัตราการรอดตายสูงซึ่งในอดีตมักจะใช้ยาปฏิชีวนะ แต่การใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อควบคุมโรคติดเชื้อในสัตว์น้ำก่อให้เกิดปัญหาการดื้อยาและการตกค้างของยาในผลิตภัณฑ์ (Amabile-Cuevas *et al.*, 1995) ดังที่ได้กล่าวมา จึงมีการใช้โปรไบโอติกส์ในสัตว์น้ำหลายกลุ่ม ส่วนใหญ่เป็นการศึกษาในปลา (Joborn *et al.*, 1997; Gildberg and Mikkelsen, 1998; Robertson *et al.*, 2000; Nikoskelainen *et al.*, 2001) และหอย (Douillet and Langdon, 1994; Riquelme *et al.*, 1997;

Gibson *et al.*, 1998) ขณะที่การศึกษาในกึ่งยังมีรายงานอยู่น้อย (Rengpipat *et al.*, 1998; Moriaty, 1998)

จุลินทรีย์ที่เป็นโปรไบโอติกส์ ส่วนใหญ่ได้แก่แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก (lactic acid bacteria) เช่น *Lactobacillus* sp., *Bifidobacterium* sp. และ *Streptococcus* sp. (Smoragiewicz *et al.*, 1993) และ *Carnobacterium* sp. (Joborn *et al.*, 1997) โดยแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวจะมีการสร้างกรดแลคติก และแบคทีเรียโอซินซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในลำไส้ปลา Ringo และ Strom (1994) พบว่าเชื้อ *Carnobacterium divergens* ที่แยกได้จากลำไส้ของปลาแอตแลนติกแซลมอน (Atlantic salmon) สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Vibrio anguillarum* และ *V. salmonicida* ได้ แต่ Olssen *et al.* (1998) รายงานว่า *Carnobacterium* sp. แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *V. anguillarum* ในทางเดินอาหารของปลา เทอร์บอต (turbot) ได้เมื่อเลี้ยงเชื้อในปริมาณเท่ากัน แต่จะสามารถยับยั้งการเจริญของ *V. anguillarum* ได้เมื่อมีเชื้อ *Carnobacterium* sp. ปริมาณ 10^6 CFU/ml ขณะที่ *V. anguillarum* มีปริมาณ 10^4 CFU/ml นั่นคือต้องใช้โปรไบโอติกส์ในปริมาณที่เหมาะสมหรือมากเพียงพอที่จะทำให้สามารถเจริญและมีปริมาณมากกว่าเชื้ออื่น ๆ ในลำไส้ของสัตว์น้ำ Robertson *et al.* (2000) ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ *Carnobacterium* sp. เพื่อเป็นโปรไบโอติกส์ในอาหารปลาเรนโบว์เทราท์ (rainbow trout) ซึ่งได้รับเชื้อ *Aeromonas hydrophila*, *V. anguillarum*, *V. ordalli* และ *Yersenia ruckeri* พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 5×10^7 cell/g ซึ่งทำให้ปลามีอัตราการรอดตายหลังจากได้รับเชื้อสูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเจน

บทบาทของโปรไบโอติกส์ที่สำคัญคือมีการสร้างกรดอินทรีย์ ส่วนใหญ่เป็นจำพวกกรดแลคติก (lactic acid) ทำให้กระเพาะอาหารมีสภาพเป็นกรดมากขึ้น การย่อยอาหารจึงดีขึ้นด้วย แบคทีเรียบางชนิดจะมีการสร้างน้ำย่อยหรือเอนไซม์ เช่น *Lactobacilli* มีการสร้าง lactase และ amylase (Sen and Chakrabarty, 1984) จุลินทรีย์ที่มีสมบัติเป็นโปรไบโอติกส์บางชนิดนั้นสามารถสร้างวิตามิน บี ได้หลายชนิดในทางเดินอาหาร ซึ่งช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตของสัตว์มากขึ้น เนื่องจากมีส่วนเกี่ยวข้องกับการสร้างกรดอะมิโนและการสร้างโปรตีนในร่างกาย (Stringer, 1985) นอกจากนี้ยังมีสารอื่นที่จุลินทรีย์เหล่านี้สร้างขึ้น เช่น อะซิเตท (acetate) โพรพิโอเนท (propionate), กรดที่ระเหยได้ (volatile acid), สารยับยั้งแบคทีเรีย (bacteriocin) และสารประกอบอื่น ๆ ที่ไม่ทราบชนิด (unidentified chemical compound) (Sharpell, 1985; Schindler and Schmid, 1982) โปรไบโอติกส์บางชนิดสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรคได้โดยมีการสร้างแอนติบอดีมากขึ้นและเพิ่มประสิทธิภาพในการจับกินจุลินทรีย์ก่อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกาย (Fox, 1988; Stark and Wilkinson, 1989; Ewing and Haresign, 1989)

4. ลักษณะและคุณสมบัติของเชื้อ *Vibrio* spp.

Vibrio spp. เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างเป็นแท่งตรงหรือโค้งงอคล้ายสัญลักษณ์ comma ในภาษาอังกฤษ มีขนาดความกว้าง 0.5 - 0.8 μm ความยาว 1.4 - 2.6 μm เคลื่อนที่โดยใช้ polar flagella ที่มีเปลือกหุ้มด้านนอก (sheath) ไม่สร้างสปอร์ เป็นพวก facultative anaerobe ซึ่งมีความสามารถทั้ง fermentative และ respiratory metabolism ทุกสปีชีส์ของเชื้อในกลุ่มนี้ให้ผลการทดสอบออกซิเดสเป็นบวก (ยกเว้น *V. metschnikovii* และ *V. gazogenes* และบางสปีชีส์ของ *V. damsela*) สามารถเจริญได้บนอาหาร TCBS (Thiosulfate Citrate Bile salt Sucrose Agar) มี mol % G+C ของ DNA คือ 38 - 51 โซเดียมไอออนช่วยกระตุ้นการเจริญของเชื้อนี้

แบคทีเรียสกุล *Vibrio* จัดให้อยู่ในวงศ์ (family) Vibrionaceae จากข้อมูลลำดับเบสของยีน 16S rRNA, *recA*, *rpoA* และ การทดสอบทางชีวเคมี ปัจจุบันจึงจัดให้อยู่ในวงศ์ Vibrionaceae มีสมาชิกเพียงสกุลเดียวคือ *Vibrio* มีสมาชิก 78 สปีชีส์ และ 2 ซับสปีชีส์ (Thompson *et al.*, 2004) (ตารางที่ 1) สามารถพบ *Vibrio* เป็นจำนวนมากในทะเล บริเวณปากแม่น้ำ ชายฝั่ง ในตะกอนดินและ พื้นที่เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทั่วโลก (Barbieri *et al.*, 1999; Denner *et al.*, 2002; Heidelberg *et al.*, 2002a; Ortigosa *et al.*, 1989; Ortigosa *et al.*, 1994) บางสปีชีส์พบได้ในน้ำจืด เช่น *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* และ *V. albensis* ส่วน *V. harveyi* และ *V. alginolyticus* พบมากในน้ำเค็ม (Thongchankeaw, 2010)

ในธรรมชาติ *Vibrio* spp. มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อระบบนิเวศน์โดยมีบทบาทในการย่อยสลายสารอินทรีย์ และ หมุนเวียนสารอาหารในทะเล (Sherr and Sherr, 2000) Vibrios ดำรงชีวิตแบบ heterotrophic มีบทบาทในการหมุนเวียนสารอาหารในสิ่งแวดล้อมทางน้ำ (heterotrophic microbial loop) โดยใช้สารอินทรีย์ที่ละลายในน้ำ (dissolved organic material : DOM) ได้แก่ ไขมันจากแพลงก์ตอนสัตว์และสารจากไซโตพลาสซึมของแพลงก์ตอนพืช (Sherr and Sherr, 2000) ขณะเดียวกันเมื่อโปรโตซัวพวก flagellates และ ciliates กิน vibrios ทำให้สารอินทรีย์หมุนเวียนเข้าสู่ห่วงโซ่อาหารทางทะเล *Vibrio* spp. สามารถย่อยสลายไคตินซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของเปลือกสัตว์ทะเล เช่น แพลงก์ตอนสัตว์ และ แพลงก์ตอนพืชบางชนิด ไคตินเป็นสาร amino sugar ที่มีมากที่สุดในมหาสมุทร ถ้าไม่มีการย่อยสลายไคตินก็จะไม่มีการหมุนเวียนคาร์บอน และ ไนโตรเจนในทะเล (Cottrell and Kirchman, 2000; Riemann and Azam, 2002)

Vibrio spp. เป็น microflora ในสัตว์น้ำที่มีถิ่นที่อยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีความเค็มในช่วงที่กว้าง และเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคบางชนิดใน ปลา หอย ปู และ กุ้ง อย่างไรก็ตามในการเลี้ยงกุ้งพบว่า *Vibrio* spp. มีความสัมพันธ์กับการตายของกุ้งหรือการระบาดของโรคเกิดจากการเพิ่มขึ้นของจำนวนของ pathogenic *Vibrio* spp. แต่บางครั้งก็ไม่ได้ขึ้นกับจำนวนของ pathogenic *Vibrio* spp. อย่างเดียวแต่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มขึ้นของสัดส่วนของศักยภาพของสายพันธุ์ pathogenic *Vibrio* spp.

ตารางที่ 1. แบคทีเรียในสกุล *Vibrio* spp.

<i>Vibrio</i> spp.	บริเวณที่คัดแยก	แหล่งที่มา/ตัวอย่างที่แยกเชื้อ
<i>V. aerogenes</i>	Nanwan bay, Taiwan	Sediment of sea-grass bed
<i>V. aestuarianus</i> subsp. <i>aestuarianus</i>	Oregon, U.S.A	Oyster
<i>V. aestuarianus</i> subsp. <i>francensis</i>	Argenton, France	Diseased oyster hemolymph
<i>V. agarivorans</i>	Valencia, Spain	Sea water
<i>V. albensis</i>	Elbe river, Germany	Fish
<i>V. alginolyticus</i>	Japan	Spoiled horse mackerel (<i>Trachurus trachurus</i>)
<i>V. areninigræ</i>	Jeju island, Korea	Black sand
<i>V. atypicus</i>	China	Gut of the Chinese prawn (<i>Penaeus chinensis</i>)
<i>V. azureus</i>	Japan	Sea water
<i>V. brasiliensis</i>	Florianopolis, Brazil, 1999	Bivalve larvae (<i>Nodipecten nodosus</i>)
<i>V. campbellii</i>	Hawaii, U.S.A.	Sea water
<i>V. casei</i>	France	Smear-ripened cheese surface
<i>V. chagasii</i>	Austevoll, Norway, 1997	Gut of turbot larvae (<i>Scophthalmus maximus</i>)
<i>V. cholerae</i>	Asia	Clinical
<i>V. cincinnatiensis</i>	Ohio, U.S.A.	Human blood and cerebrospinal fluid
<i>V. comitans</i>	Japan, 2005	Guts of wild-caught abalone (<i>Haliotis dics dics</i> , <i>H. gigantean</i> and <i>H. madaka</i>)
<i>V. communis</i>	Praia Grande, Sao Paolo, Brazil, 2005	Mucus of an apparently healthy coral (<i>Mussismilia hispida</i>)
<i>V. coralliilyticus</i>	Indian Ocean, 1999.	Diseased <i>Pocillopora damicornis</i>
<i>V. crassostreae</i>	France	Hemolymph of diseased oysters (<i>Crassostera gigas</i>)
<i>V. cyclitrophicus</i>	Washington, U.S.A.	Creosote-contaminated sediment
<i>V. diabolicus</i>	East Pacific rise, 1991	Dorsal integument of polychaete (<i>Alvinella pompejana</i>)
<i>V. diazotrophicus</i>	Nova Scotia, Canada	Sea urchin (<i>Strongylocentrotus</i>)
<i>V. fluvialis</i>	Bangladesh	Human feces
<i>V. furnissii</i>	Japan	Human feces
<i>V. gallaecicus</i>	Ria de Vigo, Galicia, Spain	Manila clams (<i>Ruditapes philippinarum</i>)
<i>V. gallicus</i>	Brest, France, 2001	French abalone (<i>Haliotis tuberculata</i>)
<i>V. gazogenes</i>	Massachusetts, U.S.A	Mud from a salt marsh
<i>V. gigantis</i>	France	Hemolymph of diseased reared oysters (<i>Crassostera gigas</i>)
<i>V. hangzhouensis</i>	East China sea	Sediment
<i>V. harveyi</i>	Massachusetts, U.S.A, 1935	Dead amphipod (<i>Talorchestia</i> sp.)

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Vibrio spp.	บริเวณที่คัดแยก	แหล่งที่มาของตัวอย่างที่แยกเชื้อ
<i>V. hispanicus</i>	Barcelona, Spain, 1990	Culture water
<i>V. ichthyenteri</i>	Hiroshima, Japan	Gut of diseased Japanese flounder (<i>Paralichthys livaceus</i>)
<i>V. inusitatus</i>	California, U.S.A., 2005	Gut of the Californian red abalone (<i>Haliotis rufescens</i>)
<i>V. kanaloae</i>	France, 1998	Diseased oyster larvae (<i>Ostrea edulis</i>)
<i>V. lentus</i>	Valencia, Spain	Oyster in the Mediterranean coast
<i>V. littoralis</i>	Dae-Chun, Korea	Yellow sea tidal flat
<i>V. mangrovi</i>	Pichavaran mangroves, India, 2006	Roots of mangrove-associated wild rice (<i>Porteresia coarctata</i> Takeoka),
<i>V. marisflavis</i>	Yellow Sea Cold Water Mass, China	Seawater,
<i>V. mediterranei</i>	Valencia, Spain	Coastal sea water
<i>V. metschnikovii</i>	Asia	Diseased fowl
<i>V. mimicus</i>	North Carolina, U.S.A.	Infected human ear
<i>V. mytili</i>	Valencia, Spain	Bivalve
<i>V. natriegens</i>	Sapelo Island, U.S.A.	Salt marsh mud
<i>V. navarrensis</i>	Villa Franca, Navarra, Spain, 1982	Sewage
<i>V. navarrensis</i> biotype <i>pommerensis</i>	Baltic Sea, Germany	Surface seawater
<i>V. neonatus</i>	Kanagawa, Japan, 1999	Gut of abalone (<i>Haliotis discus discus</i>)
<i>V. neptunius</i>	Florianopolis, Brazil, 1998	Bivalve larvae (<i>Nodipecten nodosus</i>)
<i>V. nereis</i>	Hawaii, U.S.A.	Sea water
<i>V. nigripulchritudo</i>	Hawaii, U.S.A.	Sea water
<i>V. ordalii</i>	Washington, U.S.A., 1973	Diseased coho salmon (<i>Oncorhynchus rhododurus</i>)
<i>V. oreintalis</i>	Yellow sea, China	Sea water
<i>V. owensii</i>	Queensland, Australia, 2009	Diseased <i>Penaeus monodon</i> larvae
<i>V. pacinii</i>	Duhua, China, 1996	Healthy shrimp larvae (<i>Penaeus chinensis</i>)
<i>V. parahaemolyticus</i>	Japan	Diseased Human
<i>V. pectenocida</i>	Brittany, France, 1991	Diseased bivalve larvae (<i>Pectan maximus</i>)
<i>V. pelagius</i>	Hawaii, U.S.A.	Sea water
<i>V. penaeocida</i>	Brittany, France, 1991	Diseased bivalve larvae (<i>Pectan maximus</i>)
<i>V. pelagius</i>	Hawaii, U.S.A.	Sea water

ตารางที่ 1 (ต่อ)

<i>Vibrio</i> spp.	บริเวณที่คัดแยก	แหล่งที่มาของตัวอย่างที่แยกเชื้อ
<i>V. pomeroiy</i>	Florianopolis, Brazil, 1998	Healthy bivalve larvae (<i>Nodipecten nodosus</i>)
<i>V. ponticus</i>	Meditereanean coast, Spain, 1986	Gilthead sea Bream (<i>Sparus aurata</i>)
<i>V. pomeroiy</i>	Florianopolis, Brazil, 1998	Healthy bivalve larvae (<i>Nodipecten nodosus</i>)
<i>V. porteresiae</i>	India	Wild rice (<i>Porteresia coarctata</i>)-Tateoka
<i>V. proteolyticus</i>	U.S.A.	Intestine of isopod (<i>Limnoria tipunctata</i>)
<i>V. rarus</i>	California, U.S.A., 2005	Gut of the Carifornian red abalone (<i>Haliotis rufescens</i>)
<i>V. rotiferianus</i>	ARC, Ghent, Belgium, 1999	Rotifer in the recirculation system (<i>Brachionus plicatilis</i>)
<i>V. ruber</i>	Keelung, Taiwan	Sea water
<i>V. rumoiensis</i>	Japan	Drain pool of fish processing plant
<i>V. scophthalmi</i>	Spain	Turbot juvenile (<i>Scophthalmus maximus</i>)
<i>V. sinaloensis</i>	Spain	Rose snapper (<i>Lutjanus guttatus</i>)
<i>V. splendidus</i>	North Sea	Marine fish
<i>V. superster</i>	Australian Coast	Gut of abalone (<i>Haliotis laevigata</i> and <i>H. rubra</i>)
<i>V. tapetis</i>	Landeda, France	Clam (<i>Tapes philippinarum</i>)
<i>V. tasmaniensis</i>	Tasmania	Atlantic salmon (<i>Salmo salar</i>)
<i>V. tubiashii</i>	Milford Connecticut, U.S.A.	Hard clam (<i>Mercenaria mercenaria</i>)
<i>V. vulnificus</i>	U.S.A.	Human wound infection
<i>V. xuii</i>	Dahua, China, 1995	Shrimp culture water

ที่มา : Thongchankeaw, 2010 ดัดแปลงจาก <http://www2.ioc.fiocruz.br/vibrio/Species.html>

ในบ่อเลี้ยงกุ้งด้วยเช่นกัน กล่าวคือจำนวนเชื้อก่อโรคในจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด มีแนวโน้มที่จะเปลี่ยนไปในทางที่ทำให้สภาพแวดล้อมเกิดความเครียดจะทำให้กุ้งเป็นโรคได้ง่าย อย่างไรก็ตามสภาพแวดล้อมที่เครียดทั้งในแง่การเพิ่มความหลากหลายของจุลินทรีย์และการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์เฉพาะกลุ่มก็ทำให้กุ้งไวต่อการเกิดโรคจากเชื้อก่อโรคมมากขึ้น (Sung, 2001)

แบคทีเรีย vibrios มีทั้งชนิดที่ก่อโรคในคนและในสัตว์ เช่น *V. anguillarum* ก่อให้เกิดโรคในปลา *V. shiloi* ก่อโรคในปะการัง (Kushmaro *et al.*, 2001) ที่ก่อโรคในคน ได้แก่ *V. cholerae* เป็นสาเหตุของ อหิวาตกโรค (Wendt, 1885) และ *V. parahaemolyticus* ก่อโรคลำไส้อักเสบ ติดเชื้อทางบาดแผล และติดเชื้อในกระแสโลหิต ผู้ป่วยได้รับเชื้อชนิดนี้จากการรับประทานอาหารทะเล จากการรวบรวมข้อมูลพบว่ามากกว่า 20 สปีชีส์ ของ *Vibrio* ก่อโรคในสัตว์ และ 12 สปีชีส์ ก่อโรคในคน (ตารางที่ 2) ซึ่งมี 9 สปีชีส์ ก่อให้เกิดโรคลำไส้อักเสบ ทำให้ผู้ป่วยมีอาการ ท้องเสีย คลื่นไส้ อาเจียน มีไข้ อุจจาระมีมูกเลือดปน (Thompson *et al.*, 2004)

การก่อให้เกิดการติดเชื้อของเชื้อ *V. cholerae* และ *Vibrio* spp. อื่น ๆ นั้นพบว่ามีปัจจัยที่สำคัญ 2 ประการด้วยกัน กล่าวคือ ปัจจัยจากตัวเชื้อเอง เช่น ความสามารถในการเกาะติดกับสิ่งมีชีวิตอื่น รวมทั้งการผลิตสารชนิดต่าง ๆ ที่เอื้ออำนวยต่อการติดเชื้อ และปัจจัยจากสิ่งแวดล้อม สารที่แบคทีเรีย vibrios ผลิตและส่งเสริมให้เกิดการติดเชื้อ ได้แก่ เอนไซม์ สารพิษ และสารอื่น ๆ เช่น elastase, collagenase, lipase, haemagglutinin protease, siderophore, adhesion factor, enterotoxin, cytotoxin, protease และ hemolysin ส่วนปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่สำคัญที่เอื้อต่อการทำให้เกิดการติดเชื้อ ได้แก่ ความเค็ม และ อุณหภูมิ (Tamplin *et al.*, 1990; Heidelberg *et al.*, 2002b; Lipp *et al.*, 2002; Louis *et al.*, 2003) อย่างไรก็ตามพบว่าการก่อให้เกิดการติดเชื้อมีความสัมพันธ์น้อยกับปริมาณคลอโรฟิลล์ และปริมาณสารละลายอินทรีย์ (Hsieh *et al.*, 2008)

ตารางที่ 2. อาการทางคลินิกที่เกิดจากการติดเชื้อในสกุล *Vibrio* spp.

<i>Vibrio</i> spp.	บริเวณติดเชื้อ				
	ลำไส้	บาดแผล	หู	ในกระแสโลหิตระยะเริ่มต้น	ในกระแสโลหิตระยะที่สอง
1. <i>V. cholerae</i> O1	+++	+			
<i>V. cholerae</i> O139	+++	++	+	+	+
2. <i>V. parahaemolyticus</i>	+++	+	+		+
3. <i>V. vulnificus</i>	+	++		++	++
4. <i>V. fluvialis</i>	++				
5. <i>V. alginolyticus</i>	(+)	++	++	+	
6. <i>V. furnissii</i>	(+)				
7. <i>V. mimicus</i>	++		+		
8. <i>V. metschnikovii</i>	(+)			(+)	
9. <i>V. cincinnatiensis</i>			(+)		
10. <i>V. carchariae</i>		+			
11. <i>V. hollisae</i> ^a	++			+	
12. <i>V. damsela</i> ^b		++			

+++ = มีการรายงานบ่อยครั้ง ++ = มีการรายงานน้อยครั้ง + = มีการรายงานน้อยมาก (+) = มีอาการทางคลินิกไม่ชัดเจน

^a ปัจจุบันจัดเป็น *Grimontia hollisae*

^b ปัจจุบันจัดเป็น *Photobacterium damsela*

ที่มา : Thongchankeaw, 2010 ดัดแปลงจาก West, 1989

5. ลักษณะและคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียแลคติก

แบคทีเรียแลคติก (lactic acid bacteria) จัดอยู่ในออเดอร์ Lactobacillales เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ที่ผลิตกรดแลคติกจากขบวนการหมักน้ำตาล เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีความหลากหลาย ประกอบด้วย 13 สกุล 429 สปีชีส์ ได้แก่ *Abiotrophia* (4 สปีชีส์), *Aerococcus* (8 สปีชีส์), *Carnobacterium* (10 สปีชีส์), *Enterococcus* (40 สปีชีส์), *Lactobacillus* (181 สปีชีส์), *Lactococcus* (6 สปีชีส์), *Leuconostoc* (22 สปีชีส์), *Oenococcus* (2 สปีชีส์), *Pediococcus* (18 สปีชีส์), *Streptococcus* (113 สปีชีส์), *Tetragenococcus* (4 สปีชีส์), *Vagococcus* (6 สปีชีส์) และ *Weissella* (15 สปีชีส์) มีทั้งชนิดที่รูปร่างกลม ท่อนสั้น หรือยาว ไม่สร้างสปอร์ การเรียงตัวเป็นสาย หรือเป็นกลุ่ม ไม่สร้างเอนไซม์อะตาเลส (catalase) ต้องการอากาศเล็กน้อยในการเจริญ (microaerophile) บางชนิดสามารถเจริญได้ในที่ ๆ ไม่มีอากาศ (strictly anaerobe) มักมีการสับสนเสมอว่า bifidobacteria จัดเป็นสมาชิกหนึ่งของแบคทีเรียแลคติก ทั้งนี้เนื่องจากก่อนปี 1960 เคยจัดเป็น *Lactobacillus bifidus* แต่ปัจจุบันจัดอยู่ใน class Actinobacteria ออเดอร์ Bifidobacteriales

ด้วยคุณลักษณะที่แบคทีเรียแลคติกมีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียได้เนื่องจากกรดแลคติกที่แบคทีเรียผลิตขึ้นทำให้ความเป็น กรด-ด่าง ไม่เหมาะสมต่อจุลินทรีย์ก่อโรค หรือจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมาในอาหาร นอกจากนี้ยังมีการสร้างสารระเหยที่มีกลิ่นเฉพาะตัวเช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ สารไดอะซีทิล (diacetyl) มีผลต่อคุณลักษณะเฉพาะตัวของผลิตภัณฑ์อาหาร และในบรรดาสารชนิดต่าง ๆ ที่แบคทีเรียแลคติกสร้างขึ้น มีสารที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งคือ แบคเทอริโอซิน (bacteriocin) มีการประยุกต์ใช้แบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียแลคติกมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ชนิดที่ได้รับการยอมรับแล้วว่าปลอดภัยต่อการบริโภค ได้แก่ ไนซิน (nisin) ที่ได้มาจาก *Lactobacillus lactis* โดยนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารประเภทเนื้อ ผักบรรจุกระป๋อง เนย นม และโยเกิร์ต

สามารถพบแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้ทั่วไปในธรรมชาติ มักพบในอาหารหมัก เช่น แหนม ผักดอง ผลไม้ดอง ไข่กรอกเปรี้ยว ผลิตภัณฑ์นม เช่น เนยแข็ง นมเปรี้ยวหรือ โยเกิร์ต และยังพบได้ในร่างกายคน และสัตว์ เช่นระบบทางเดินหายใจ และระบบทางเดินอาหาร อวัยวะสืบพันธุ์ มีทั้งชนิดที่เป็นประโยชน์ที่นำมาประยุกต์ใช้เป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกส์ และชนิดที่ทำให้เกิดโรค สัตว์ และปลา เช่น *Abiotrophia* sp. *Lactococcus garviea*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Streptococcus* (Senn et al., 2006 ; Vinh et al., 2006) เป็นต้น

วิธีการทดลอง

1. การเก็บและเตรียมตัวอย่างกุ้งกุลาดำ

เก็บตัวอย่างกุ้งกุลาดำที่แข็งแรงปกติ และกุ้งเป็นโรคติดเชื้อแบคทีเรียและไวรัส โดยสังเกตจากลักษณะภายนอก ทั้งนี้กุ้งที่แข็งแรงปกติ มีลักษณะตัวแข็งใส ไม่มีตะกอนเกาะตามผิว ว่ายทวนน้ำได้ ส่วนกุ้งเป็นโรคมีลักษณะแตกต่างกันตามชนิดของโรค กล่าวคือ กุ้งที่เป็นโรคหัวเหลือง มีลักษณะตัวซีด บริเวณส่วนหัวและเหงือกเป็นสีเหลือง กุ้งแสดงอาการอ่อนเพลียมาเกยขอบบ่อ ไม่มีแรงติดตัว กุ้งที่เป็นโรคตัวแดงดวงขาว จะมีลักษณะเป็นจุดขาว 0.1 – 2 มิลลิเมตร ในเนื้อเยื่อชั้นใต้เปลือกที่บริเวณหัว ตัวนิ่ม บางตัวอาจมีสีแดง ว่ายอยู่ผิวน้ำ เกยขอบบ่อ ส่วนกุ้งที่ติดเชื้อ *V. harveyi* มีลักษณะตัวหลวม สีลำตัวขุ่น สีเหงือกมีสีดำ (ในเวลากลางคืน มีการเรืองแสง และกุ้งลอยตัวอยู่ขอบบ่อ) ในการเก็บตัวอย่างเพื่อการศึกษาในครั้งนี้ได้เก็บตัวอย่างกุ้งกุลาดำปกติทั้งหมด 13 ตัวและกุ้งเป็นโรคจากฟาร์มกุ้งของเกษตรกร และจากศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จำนวน 26 ตัว โดยเป็นกุ้งที่เป็นโรคติดเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* จำนวน 13 ตัว และติดเชื้อไวรัสจำนวน 13 ตัว

การผ่าตัดตัวอย่างกุ้งกุลาดำ

นำตัวอย่างกุ้งกุลาดำที่ได้มาตรวจดูลักษณะภายนอก ชั่งน้ำหนัก ล้างส่วนนอกด้วยน้ำเกลือ 1.5% ที่ปราศจากเชื้อ เช็ดด้วยแอลกอฮอล์ 70% ทำการผ่าตัดแบบปราศจากเชื้อโดยใช้อุปกรณ์คือมีดผ่าตัด ปากคีม และกรรไกรที่ฆ่าเชื้อแล้ว เปิดเปลือกหัวกุ้งลงมาตามด้านหลังกุ้ง เมื่อพบส่วนของทางเดินอาหารจึงเลาะส่วนที่เป็นกระเพาะ ปาก ลำไส้ และตับออกมาอย่างระมัดระวัง โดยไม่ให้ฉีกขาด ทำการตัดแบ่งส่วนของทางเดินอาหารออกเป็น 5 ส่วน คือส่วนที่ 1 ปากถึงกระเพาะ (foregut) ส่วนที่ 2 ตับ (hepatopancrease) ส่วนที่ 3 ลำไส้ส่วนต้น (front midgut) ส่วนที่ 4 ลำไส้ส่วนปลาย (back midgut) และส่วนที่ 5 ซีกัม (cecum hindgut) นำแต่ละส่วนของกุ้งไปชั่งน้ำหนัก แล้วนำไปบดให้ละเอียดด้วยโกร่งหรือ homogenizer ที่ปราศจากเชื้อ แล้วเจือจางตัวอย่างในอัตราส่วน 1 : 10 ด้วยน้ำเกลือปราศจากเชื้อ

2. การตรวจนับจำนวนและแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างกุ้งกุลาดำ

การตรวจนับจำนวนแบคทีเรียจากตัวอย่างกุ้งกุลาดำ ทำได้โดยเจือจางตัวอย่างกุ้งด้วยน้ำเกลือปราศจากเชื้อ 1.5% ดูดตัวอย่างกุ้งที่เจือจางแล้ว 2 ความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 0.1 มล. spread บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Glucose yeast extract malt agar (GYM), Man Rogosa and Sharpe (MRS), Potato dextrose agar (PDA), Thiosulfate Citrate Bile salt Sucrose agar (TCBS), Tryptic soy agar (TSA) และ Yeast agar (YA) อาหารเลี้ยงเชื้อทุกชนิดมีการเติม 1.5% NaCl โดยทำซ้ำ 2 ครั้งในแต่ละความเข้มข้น บ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดที่ต้องการทำการศึกษา เช่น TCBS บ่มที่ 35°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการนับจำนวนเชื้อทั้งหมด

จากอาหาร TSA เก็บแบคทีเรีย Vibrio ทั้งหมดจากอาหาร TCBS นับจำนวนเชื้อแอคโทโนมัยซีทจากอาหาร GYM นับจำนวนเชื้อแบคทีเรียแลคติกจากอาหาร MRS นับจำนวนเชื้อยีสต์จากอาหาร PDA และ YA และทำการแยก เชื้อแต่ละลักษณะให้ได้เชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร TSA จากนั้นนำไปถ่ายเชื้อเพื่อเพิ่มจำนวนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA อีกครั้ง เก็บในหลอด cryovial ที่มี 20 % glycerol ที่ปราศจากเชื้อ นำไปเก็บที่ 70°C เพื่อใช้ในการศึกษา ต่อไป

3. การจัดกลุ่ม และการเทียบเคียงแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างกุ้งกุลาดำ

3.1 ศึกษาแบคทีเรียทั้งหมดที่แยกได้จากอาหาร TSA ศึกษาลักษณะโคโลนี การติดสีแกรม รูปร่าง การทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี โดยอาหารที่ใช้ในการทดสอบทั้งหมดต้องเติม 1.5% NaCl เพื่อให้แบคทีเรียเติบโตได้ดี แล้วนำมาจำแนกและเทียบเคียงชนิดของแบคทีเรียตามวิธีการของ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Krieg and Holt, 1984; Sneath et al., 1986) Diagnostic Microbiology (Forbes et al., 2002) และหนังสือคู่มือปฏิบัติการทางจุลชีววิทยาที่ใช้ประกอบในการเทียบเคียง วิเคราะห์ข้อมูลตามหลักการทางสถิติ

3.2 ศึกษาแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ที่แยกได้จากอาหาร TCBS ทำการทดสอบคุณลักษณะต่าง ๆ ทางชีวเคมี และสรีรวิทยา ของเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ที่แยกได้จากอาหาร TCBS เพื่อทำการระบุชนิดจำนวน 31 การทดสอบ (ตารางที่ 3) เพื่อทำการเทียบเคียงสปีชีส์ตามวิธีของ A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species (Alsina and Blanch, 1994)

ตารางที่ 3. การทดสอบเพื่อทำการเทียบเคียงเพื่อการระบุชนิดของเชื้อ *Vibrio* spp.

ลักษณะที่ทำการทดสอบสำหรับการศึกษา <i>Vibrio</i> spp.	
Oxidase test	Arginine dihydrolase test
Indole test	Gelatin Hydrolysis test
Voges-Proskauer test	Nitrate reduction test
Lysine decarboxylase test	Citrate test
Ornithine decarboxylase test	Carbohydrate assimilation; L-arabinose, D - melibiose, α - Ketolutarate, D - glucosamine, D - glucose และ D - lactose
Fermentation; D - manitol, D - sucrose, L - arabinose, D - salicin, D - sorbitol, D - inositol และ P-arbutin,	
การเจริญที่ NaCl; 0%, 6%, 8% และ 10% การเจริญที่อุณหภูมิ 4, 35, และ 40°C	O - nitrophenyl - β - D - galactopyranoside (ONPG) test

3.3 ศึกษาชนิดของแบคทีเรียแลคติกจากระบบทางเดินอาหารของกิ้งกูดดำ

ทำการศึกษาทางอนุกรมวิธานเพื่อการเทียบเคียงชนิดของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จาก ระบบทางเดินอาหารของกิ้งกูดดำ ที่เจริญบนอาหาร MRS ทั้งหมด 78 ตัว โดยเลือกใช้ 3 วิธีการ คือ

3.3.1 ทำการศึกษาด้วยวิธีการเทียบเคียงชนิด

ทำการทดสอบคุณลักษณะต่าง ๆ ที่สำคัญเพื่อการเทียบเคียงจีโนม และ สปีชีส์ ของกลุ่ม แบคทีเรียแลคติก ทำการระบุจีโนมและสปีชีส์ตามคุณลักษณะของแต่ละกลุ่มตามที่ระบุใน Wood and Holzapfel (1995)

3.3.2 ทำการศึกษาด้วยเทคนิค Numerical taxonomy

ทำการทดสอบคุณลักษณะต่าง ๆ ที่สำคัญของเชื้อกลุ่มแบคทีเรียแลคติก ลักษณะที่ ทำการศึกษาได้แก่ ลักษณะทางสัณฐาน เช่น การติดสีแกรม รูปร่าง การเรียงตัว การทดสอบปฏิกิริยา ทางชีวเคมี และคุณลักษณะทางสรีระ รวมทั้งความสามารถในการต้านยาปฏิชีวนะ (ตารางที่ 4) ทำการ วิเคราะห์นำผลการทดสอบทางสถิติตามหลักการทาง Numerical taxonomy (Sneath, 1957) วิเคราะห์ ความเหมือน (similarity) และสร้างเดนโดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ของเชื้อตัวอย่างและเชื้อสายพันธุ์ มาตรฐาน จำนวน 10 สายพันธุ์ ที่ได้จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว) / Thailand Institute of Scientific and Technological Research (TISTR) ได้แก่ *Enterococcus faecalis* TISTR 379, *Enterococcus faecium* TISTR 1283, *Lactobacillus amylovorus* TISTR 1110, *Lactobacillus animalis* TISTR 1115, *Lactobacillus curvatus* TISTR 938, *Lactobacillus faciminis* TISTR 1113, *Lactobacillus murinus* TISTR 1111, *Lactobacillus pentosus* TISTR 920, *Leuconostoc dextranicum* TISTR 056 และ *Pediococcus acidilactici* TISTR 783 ในการป้อนข้อมูล เพื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ ทำโดยการแปลงผลการทดสอบที่เป็นบวกด้วย “1” และผลการ ทดสอบที่เป็นลบด้วย “0”

3.3.3 ทำการศึกษาด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล (16S rDNA sequencing)

ในการวิเคราะห์ทางชีวโมเลกุล คัดเลือกเชื้อแลคติกจำนวน 19 สายพันธุ์ มาทำการระบุชนิดด้วย วิธีการทางชีวโมเลกุลด้วยการศึกษาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16SrDNA กับแบคทีเรียแลคติก มาตรฐาน 40 สายพันธุ์ ที่มีในฐานข้อมูลในสาธารณะ NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) และสร้าง phylogenetic tree เพื่อดูโครงสร้างความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ แยกได้จากระบบทางเดินอาหารของกิ้งกูดดำโดยโปรแกรม Clustalx (1.83) (Thompson *et al.*, 1997). ในการทำ alignment และใช้โปรแกรม PHYDIT program (Chun, 1999) สร้าง phylogenetic tree โดยใช้ หลักการของ Maximum likelihood และกำหนดให้ *Pseudomonas resinovorans* LMG2274^T เป็น out group

ตารางที่ 4. การทดสอบเพื่อทำการศึกษาคุณลักษณะทางอนุกรมวิธานของแบคทีเรียแลคติก

ลักษณะที่ทำการทดสอบสำหรับการศึกษาแบคทีเรียแลคติก	
ติดสีแกรม	ทดสอบความสามารถในการหมักน้ำตาล
รูปร่าง Cocci	Amygdalin
Bacilli	DL-Arabinose
Diplococci	D(+)Xylose
Tetrads	Abutin
Streptococci	(D)+cellobiose
Staphylococci	Dextrose
Catalase test	D-Glactose
Oxidase test	D+Glactose
Motility	Inositol
Nitrate reduction	Inulin
Gelatin	Lactose
การเจริญ 10°C และ 45°C	D-Maltose
NaCl 0%, 10%, 15%, 20% และ 25%	Maltose
pH 1, 2, 3, 4 และ 5	D-Manitol
MRVP/Methyl red	Melibiose
O-F test	D(+)Melibiose
Acetocin	D(+)Meleziose
Utilization of protein	Raffinose
Utilization starch	D(+)Raffinose
การยับยั้งเชื้อ <i>Escherichia coli</i>	Rhamnose
<i>Staphylococcus aureus</i>	Salicin
MRSA	Sorbitol
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	D-Sorbitol
<i>Micrococcus luteus</i>	Sucrose
<i>Bacillus subtilis</i>	D(+)Trehalose
	D-Xylose
การต้านยา Clindamycin, Gentamycin, Vancomycin, Neomycin, Norfloxacin และ Ofloxacin ที่ความเข้มข้น 512, 256, 128, 64, 32, 16 และ 8 µg/ml	

4. ทดสอบการยับยั้งของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากตัวอย่างกุ้งกุลาดำต่อเชื้อก่อโรคเรืองแสง

Vibrio harveyi

ทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้ง *Vibrio harveyi* ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากกุ้งกุลาดำที่เป็นโรคเรืองแสงที่ได้จากฟาร์มกุ้งของเกษตรกร ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งครั้งนี้เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่แยกได้จากกุ้งกุลาดำและคาดว่าจะมีศักยภาพในการยับยั้ง *V. harveyi* จุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบการยับยั้งในการศึกษานี้ได้แก่ filamentous actinomycetes, *Bacillus* spp., *V. alginolyticus*, lactic acid bacteria และ yeast ซึ่งจุลินทรีย์ทั้ง 5 กลุ่ม ซึ่งเชื้อ filamentous actinomycetes ได้จากการแยกเชื้อที่ขึ้นบนอาหาร GYM agar เชื้อ *Bacillus* spp. ได้จากการแยกเชื้อที่ขึ้นบน TSA ส่วนเชื้อ *V. alginolyticus* ได้จากการแยกเชื้อที่ขึ้นบน TCBS agar โดยคัดเลือกเฉพาะที่ให้ผลการทดสอบที่มีคุณลักษณะดังแสดงใน ตารางที่ 5 ส่วน yeast นั้นได้แยกจากตัวอย่างกุ้ง 120 ตัว โดยใช้อาหาร YA

วิธีการทดสอบที่ใช้ในการทดสอบในครั้งนี้ มีหลากหลายวิธี เนื่องจากจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบมีถึง 5 กลุ่มที่แตกต่างกัน วิธีที่นำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ ได้แก่วิธี cross streak, well diffusion, agar spot, tube dilution method และวิธี co-culture

5. การคัดเลือกจุลินทรีย์จากระบบทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำ ที่เป็นประโยชน์ต่อการเจริญของกุ้งกุลาดำ

5.1 การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่เป็นประโยชน์ต่อการเจริญของกุ้งกุลาดำ (มณฑกานต์, 2547)

ทำการทดสอบแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากระบบทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำที่มีคุณลักษณะที่เป็นประโยชน์ต่อการเจริญของกุ้งกุลาดำได้แก่ ทดสอบการทนต่อ pH ต่ำ 1 – 5 ทดสอบการย่อยโปรตีน ทดสอบการย่อยแป้ง ทดสอบการย่อยไขมัน ทดสอบการเจริญในที่ไม่มีออกซิเจน ทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ นอกเหนือจาก *V. harveyi* ที่ก่อโรคเรืองแสง ได้แก่แบคทีเรียชนิดที่ก่อโรคในสัตว์น้ำ และในคน รวมทั้งเชื้อจุลินทรีย์พื้นฐานที่ใช้ทดสอบการยับยั้งในห้องปฏิบัติ 22 ชนิด ได้แก่ *Bacillus cereus*, *Edwardsiella tarda*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *E. coli* O157 : H7, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *P. rettgeri*, *P. vulgaris*, *Salmonella typhi*, *S. typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Shigella flexneri*, *S. sonnei*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Vibrio alginolyticus*, *V. logei*, *V. marinus*, *V. mediterranei*, *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus* และ *V. salmonicida*

ตารางที่ 5. คุณลักษณะของเชื้อ *V. alginolyticus*

การทดสอบ	ผลการทดสอบ
Arabinose	+
Cellubiose	-
Citrate	+
Glucose	+
Sucrose	+
Glucose gas	-
Sucrose acid	+
Glucosamine	-
L-leucine	+
Lactose	-
Lysine decarboxylase	+
Oxidase	+
Ketoglutarate	+
Gelatinase	+
Nitrate reductase	+
Voges –Proskauer 24 h.	+
ONPG hydrolysis 24 h.	+
L-Ornithine	-
Swarming on solid complex media	+
Grow in 0 % NaCl	-
Grow in 3 % NaCl	+
Grow in 6 % NaCl	+
Grow in 8 % NaCl	+
Grow at 4 °C	-
Grow at 35 °C	+
Grow at 40 °C	+

5.2 การคัดเลือกยีสต์ที่เป็นประโยชน์ต่อการเจริญของกุ้งกุลาดำ (จิตรวี, 2548)

ทำการทดสอบยีสต์ที่แยกได้จากระบบทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำ ได้แก่ ทดสอบการเจริญที่ pH 4-8 ทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิ 18, 25 และ 30 องศาเซลเซียส ทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรคของกุ้งกุลาดำ ได้แก่ *V. harveyi*, *V. marinus*, *V. parahaemolyticus* และ *V. salmonicida* ทดสอบการใช้เกล็ดไทรทรี ทดสอบการย่อยโปรตีน ทดสอบการย่อยแป้ง ทดสอบการย่อยไขมัน ทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของเชื้อที่มีประโยชน์อื่น ๆ ที่คัดเลือกได้จากระบบทางเดินอาหารกุ้งกุลาดำ โดยเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียแลคติก *Lactobacillus dextranicum* AM20 โดยใช้อาหาร MRS broth ปริมาณ 100 ml บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และทำการนับจำนวนโคโลนีของยีสต์และ แบคทีเรียแลคติกโดยการเลี้ยงบนอาหาร YA และ MRS ตามลำดับ

6. การเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำที่ได้รับแบคทีเรียแลคติก และยีสต์ที่คัดเลือกได้

6.1 เลี้ยงกุ้งด้วยอาหารที่ผสมแบคทีเรียแลคติก (มณฑกานต์, 2547)

การเตรียมแบคทีเรียแลคติกผสมอาหารกุ้ง

ผสมแบคทีเรียแลคติก 10^8 CFU/ml ที่เลี้ยงในอาหาร MRS อายุ 36 ชั่วโมง ผสมกับอาหารกุ้ง ในอัตราส่วน 1 มิลลิลิตร/อาหาร 25 กรัม (ศิริรัตน์, 2539) เคลือบทับด้วยน้ำมันปลาเพื่อให้แบคทีเรียเกาะบนอาหารเม็ด ในอัตราส่วน 10 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม (เก็บที่ในอุณหภูมิ 4°C)

การเลี้ยงกุ้งด้วยอาหารที่เสริมแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้

แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุด (ทุกชุดการทดลองทำซ้ำ 3 ครั้ง)

ชุดที่ 1 ลูกกุ้งที่ได้รับอาหารเม็ดที่ผสมแบคทีเรียแลคติก ที่เคลือบทับด้วยน้ำมันปลา

ชุดที่ 2 กลุ่มควบคุมได้รับอาหารเม็ดธรรมดา ที่เคลือบทับด้วยน้ำมันปลา

ทำการเลี้ยงลูกกุ้งอายุประมาณ 30 วัน ในตู้ขนาด $45 \times 45 \times 60$ เซนติเมตร ใส่ น้ำทะเล 15 ppt 3 ใน 4 ส่วนของตู้ ให้อากาศตลอดเวลาด้วยหัวทรายตู้ละ 1 หัว และใส่ตาข่ายไนลอนเพื่อให้กุ้งเกาะในระหว่างการเลี้ยง ในการทดลองครั้งนี้ใช้ลูกกุ้งกุลาดำอายุประมาณ 30 วัน น้ำหนักเปียกเฉลี่ย 3.5 กรัม/ตัว ตู้ละ 10 ตัว ในระหว่างการทดลองให้กุ้งกินอาหารที่ผสมแบคทีเรียแลคติกวันละ 4 มื้อ ประมาณ 2 - 2.5 กรัม/ตู้ (6 - 7% ของน้ำหนักตัวกุ้งทั้งหมดในตู้) เป็นระยะเวลา 30 วัน

การบันทึกผลและการวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์หาอัตราการเจริญเติบโตของลูกกุ้ง ดัดแปลงจากสูตรของ Lobban (1985) (อ้างโดย สนธิ และ ลีลา, 2541) และคำนวณอัตราการรอดตาย

$$G = \frac{W_t}{W_o} \times \frac{100}{t}$$

เมื่อ G = อัตราการเจริญเติบโตต่อวันคิดเป็นเปอร์เซ็นต์

W_t = น้ำหนักสุดท้าย

W_o = น้ำหนักเริ่มต้น

t = ระยะเวลาที่ทดลอง (วัน)

$$\text{อัตราการรอดตาย (\%)} = \frac{100 \times \text{จำนวนกุ้งที่ตายในระหว่างการทดลอง}}{\text{จำนวนกุ้งเริ่มต้น}}$$

การทดสอบกับเชื้อก่อโรค (Pathogen challenge test)

หลังจากที่เลี้ยงครบ 30 วัน จึงทดสอบการทนต่อการเกิดโรคเรืองแสง โดยนำกุ้งที่เหลือมาฉีดเชื้อ *V. harveyi* ที่มีความเข้มข้น 10^7 CFU/ml ตัวละ 0.1 มิลลิลิตร ที่ปล้องสุดท้ายของกุ้ง ติดตามผลเป็นระยะเวลา 7 วัน บันทึกผลเป็นร้อยละหากมีการตายเกิดขึ้นวิเคราะห์ข้อมูล ด้วยวิธี one way ANOVA และ two way ANOVA ขึ้นอยู่กับชุดข้อมูลแต่ละชุด คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ที่ดีที่สุดที่ส่งเสริมต่อการเจริญของกุ้งกุลาดำ เพื่อการพัฒนาเป็นโปรไบโอติกส์ใช้เลี้ยงกุ้งต่อไป

6.2 เลี้ยงกุ้งด้วยอาหารที่ผสมยีสต์ (จิตรวี, 2548)

ทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดสอบการใช้แบคทีเรียแลคติกผสมในอาหารกุ้งแต่มีข้อแตกต่างดังนี้

-ใช้เซลล์ยีสต์เปียกที่ได้จากการปั่นแยกน้ำเลี้ยงเชื้อแล้วผสมกับอาหารเม็ดสำเร็จรูปในปริมาณ 1:3 (น้ำหนักรีด/น้ำหนักอาหาร) (ดัดแปลงจาก สนิ และลิลา, 2541 และ Meunpol *et al.*, 2003)

-เมื่อเลี้ยงกุ้งครบ 30 วัน เพิ่มเติมการวิเคราะห์ดังนี้

-ทำการตรวจนับปริมาณยีสต์ และ *Vibrio* spp. โดยใช้อาหาร YA, PDA และ TCBS ตามลำดับ

-การวิเคราะห์ปริมาณเม็ดเลือดรวมในเลือดตามวิธีการของ กิจการ และคณะ, 2543

-ทำการตรวจสอบความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (PO activity) ตามวิธีการของ Soderhall and Hall (1984) ที่ดัดแปลงโดยกิจการ และคณะ (2543)

-ศึกษาความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียในน้ำเลือดกุ้ง (Clearance ability of bacteria) ตามวิธีการของ Martin *et al.* (1993) ที่ดัดแปลงโดยกิจการ และคณะ (2543)

ทำการวิเคราะห์ข้อมูล ด้วยวิธี one way ANOVA เปรียบเทียบข้อมูลเพื่อคัดเลือกยีสต์สายพันธุ์ที่ดีที่สุดที่อำนวยต่อการเจริญของกุ้งกุลาดำ เพื่อการพัฒนาผสมในอาหารเลี้ยงกุ้งที่มีประสิทธิภาพต่อไป

ผลการทดลอง

1. การเก็บและเตรียมตัวอย่างกุ้งกุลาดำ

ตัวอย่างกุ้งกุลาดำแข็งแรง 13 ตัว และกุ้งเป็นโรคจากฟาร์มกุ้งของเกษตรกรและจากศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จำนวน 26 ตัว โดยเป็นกุ้งที่เป็นโรคติดเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* จำนวน 13 ตัว และติดเชื้อไวรัสจำนวน 13 ตัว เพื่อให้เกิดความหลากหลายของข้อมูลในการศึกษาจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำ

2. การตรวจนับจำนวนและแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างกุ้งกุลาดำ

2.1 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (Total bacterial count)

จากการตรวจนับปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ที่เติม 1.5% NaCl และผลการวิเคราะห์ข้อมูลแบบ Two-Independent Sample Test ซึ่งเป็นการทดสอบแบบ Non-parameter พบว่าปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดจากทั้ง 5 ส่วน (คือ ปากถึงกระเพาะ ตับ (รวมทั้งท่อที่เชื่อมต่อระหว่างตับกับลำไส้ส่วนต้น) ลำไส้ส่วนต้น ลำไส้ส่วนปลาย และ ซีกัม) ของกุ้งปกติและกุ้งติดเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* และกลุ่มที่ติดเชื้อไวรัส ปริมาณเฉลี่ยของแบคทีเรียทั้งหมดโดยรวมจำนวนจากทุกส่วนของกุ้งกุลาดำ ($\log_{10}\text{cfu/g}$) เปรียบเทียบข้อมูลของกุ้งทั้งสามกลุ่ม พบว่ามีปริมาณ 8.80 ± 0.30 , 9.01 ± 0.45 และ $8.44 \pm 0.32 \log_{10} \text{cfu/g}$ ในกลุ่มกุ้งติดเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* กลุ่มที่ติดเชื้อไวรัส และกลุ่มกุ้งปกติ ตามลำดับ ซึ่งพบว่าค่าที่ได้แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % (ตารางที่ 6)

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณเชื้อแบคทีเรียในส่วนเดียวกันระหว่างกุ้งเป็นโรคโดยวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยรวมของกุ้งติดเชื้อทั้งสองกลุ่มและกุ้งปกติ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ของทั้ง 5 ส่วน และพบว่าปริมาณแบคทีเรียในแต่ละส่วนของกุ้งมีปริมาณแตกต่างกันไป กล่าวคือปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในกุ้งเป็นโรคมีมากที่สุดในส่วนซีกัม คือมีค่า $8.09 \pm 0.54 \log_{10} \text{cfu/g}$ และพบปริมาณแบคทีเรียน้อยที่สุดในส่วนตับ คือ $6.49 \pm 0.98 \log_{10} \text{cfu/g}$ (ตารางที่ 7)

จากการเปรียบเทียบปริมาณแบคทีเรียในส่วนต่าง ๆ ของกุ้งเป็นโรค พบว่าปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดระหว่างส่วนปากถึงกระเพาะกับส่วนตับไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % แต่สองส่วนแรกนี้มีปริมาณเชื่อน้อยกว่าปริมาณเชื้อในลำไส้ส่วนต้น ลำไส้ส่วนปลายและซีกัม อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % แต่ปริมาณเชื้อในระบบทางเดินอาหารสามส่วนหลังแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ (ตารางที่ 8)

ส่วนผลการนับเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในกุ้งปกตินี้มีปริมาณแบคทีเรียมากที่สุดในส่วนซีกัม เช่นเดียวกันแต่ปริมาณน้อยกว่า กล่าวคือมีค่า $7.86 \pm 0.72 \log_{10} \text{cfu/g}$ และพบปริมาณเชื่อน้อยที่สุดในส่วนตับคือ $6.06 \pm 0.92 \log_{10} \text{cfu/g}$ โดยมีการเรียงลำดับจากส่วนที่มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียมาก

ตารางที่ 6. ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด ($\log_{10}$ cfu/g) ในจากทุกส่วนของกุ้งเป็นโรคกุ้งติดเชื้อแบคทีเรียกลุ่มที่ติดเชื้อไวรัส และกลุ่มกุ้งปกติ และกุ้งปกติ ที่เจริญบนอาหาร TSA

ลักษณะกุ้งกุลาดำ	เชื้อ (mean $\pm$ SD)
กุ้งเป็นโรคกุ้งติดเชื้อแบคทีเรีย	8.80 $\pm$ 0.30
กลุ่มที่ติดเชื้อไวรัส	9.01 $\pm$ 0.45
กลุ่มกุ้งปกติ	8.44 $\pm$ 0.32

ตารางที่ 7. ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด ($\log_{10}$ cfu/g) ในแต่ละส่วนของกุ้งเป็นโรคและกุ้งปกติ ที่เจริญบนอาหาร TSA

ทางเดินอาหารกุ้ง	กุ้งเป็นโรค* (mean $\pm$ SD)	กุ้งแข็งแรง (mean $\pm$ SD)
ปาก – กระเพาะ	7.06 $\pm$ 0.62	6.96 $\pm$ 0.90
ตับ	6.49 $\pm$ 0.98	6.06 $\pm$ 0.92
ลำไส้ส่วนต้น	7.96 $\pm$ 0.61	7.75 $\pm$ 0.73
ลำไส้ส่วนปลาย	7.94 $\pm$ 0.62	7.60 $\pm$ 0.55
ซีกัม	8.09 $\pm$ 0.54	7.86 $\pm$ 0.72

*ทำการวิเคราะห์รวมข้อมูลของกุ้งป่วยติดเชื้อจากแบคทีเรียและไวรัส

ตารางที่ 8. เปรียบเทียบปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด ($\log_{10}$ cfu/g) ในระบบทางเดินอาหาร แต่ละส่วนของกิ้งเป็นโรคและกิ้งปกติที่เจริญบนอาหาร TSA

ทางเดินอาหารกิ้ง	ทางเดินอาหารกิ้ง	กิ้งเป็นโรค ** (mean $\pm$ SD)	กิ้งแข็งแรง (mean $\pm$ SD)
	ปาก-กระเพาะ	7.06 $\pm$ 0.62	6.96 $\pm$ 0.90
ปาก-กระเพาะ	ตับ	6.49 $\pm$ 0.98	6.06 $\pm$ 0.92*
	ลำไส้ส่วนต้น	7.96 $\pm$ 0.61*	7.75 $\pm$ 0.73*
	ลำไส้ส่วนปลาย	7.94 $\pm$ 0.62*	7.60 $\pm$ 0.55*
	ซีกัม	8.09 $\pm$ 0.54*	7.86 $\pm$ 0.72*
ตับ	ลำไส้ส่วนต้น	7.96 $\pm$ 0.61*	7.75 $\pm$ 0.73*
	ลำไส้ส่วนปลาย	7.94 $\pm$ 0.62*	7.60 $\pm$ 0.55*
	ซีกัม	8.09 $\pm$ 0.54*	7.86 $\pm$ 0.72*
ลำไส้ส่วนต้น	ลำไส้ส่วนปลาย	7.94 $\pm$ 0.62	7.60 $\pm$ 0.55
	ซีกัม	8.09 $\pm$ 0.54	7.86 $\pm$ 0.72
ลำไส้ส่วนปลาย	ซีกัม	8.09 $\pm$ 0.54	7.86 $\pm$ 0.72

* หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

** ทำการวิเคราะห์รวมข้อมูลของกิ้งป่วยติดเชื้อจากแบคทีเรียและไวรัส

ที่สุดไปสู่ส่วนที่มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียน้อยที่สุดเหมือนกันในกิ้งทั้งสองแบบ คือมีค่ามากที่สุดในส่วนซีกัม รองลงมาคือส่วนลำไส้ส่วนต้น ลำไส้ส่วนปลาย ปากถึงกระเพาะ และส่วนตับพบปริมาณเชื้อน้อยที่สุด (ตารางที่ 7) จากการเปรียบเทียบปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดระหว่างส่วนต่าง ๆ ของกิ้งปกติพบว่าส่วนตับมีปริมาณน้อยกว่าส่วนอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างส่วนปากถึงกระเพาะกับลำไส้ส่วนต้น ลำไส้ส่วนปลาย และซีกัม พบว่าในส่วนปากถึงกระเพาะมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบระหว่างสามส่วนหลังนี้พบว่าปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % (ตารางที่ 8)

2.2 จำนวนแบคทีเรียไวรัสทั้งหมด

จากการศึกษาปริมาณแบคทีเรียในสกุล *Vibrio* spp. ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS ที่เติม 1.5% NaCl พบว่าปริมาณเชื้อ *Vibrio* spp. ทั้งหมดในกุ้งเป็นโรคมีปริมาณมากกว่ากุ้งปกติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% กล่าวคือ จากการวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียไวรัสโดยรวมจากทุกส่วนของกุ้งกุลาดำ ของกุ้งทั้งสามกลุ่มกล่าวคือ กุ้งติดเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* กลุ่มที่ติดเชื้อไวรัส และกลุ่มกุ้งปกติ พบว่ามีปริมาณ 6.15 ± 0.37 , 6.86 ± 0.06 และ $6.36 \pm 0.95 \log_{10} \text{cfu/g}$ ตามลำดับ แต่พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % (ตารางที่ 9)

เมื่อวิเคราะห์ในแต่ละส่วนของกุ้งพบเชื้อสกุลนี้ในปริมาณที่แตกต่างกันกล่าวคือ ในกุ้งเป็นโรคพบว่าแบคทีเรียชนิดนี้มากที่สุดในซีกัม $5.35 \pm 0.96 \log_{10} \text{cfu/g}$ และพบปริมาณเชื้อน้อยที่สุดในตับ คือ $3.65 \pm 1.76 \log_{10} \text{cfu/g}$ (ตารางที่ 10) จากการเปรียบเทียบแต่ละส่วนของกุ้งติดเชื้อ (ทำการวิเคราะห์รวมในกุ้งติดเชื้อทั้งสองกลุ่ม) ด้วยกันในส่วนตับมีปริมาณน้อยกว่าส่วนอื่น ๆ ที่เหลือ คือ ปาก ถึงกระเพาะ ลำไส้ส่วนต้น ลำไส้ส่วนปลาย และซีกัมอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง 4 ส่วนที่เหลือไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 11)

ในกุ้งปกตินั้นมีปริมาณเชื้อ *Vibrio* spp. มากที่สุดในซีกัมเช่นเดียวกัน คือมีค่า $5.15 \pm 1.39 \log_{10} \text{cfu/g}$ แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับส่วนอื่น ๆ ของลำไส้ และทำนองเดียวกับกุ้งเป็นโรคคือพบน้อยที่สุดในส่วนตับ คือ $3.82 \pm 1.09 \log_{10} \text{cfu/g}$ (ตารางที่ 10) จากการเปรียบเทียบปริมาณเชื้อ *Vibrio* spp. ระหว่างแต่ละส่วนของกุ้งแข็งแรงปกติ พบว่าส่วนปากถึงกระเพาะกับส่วนตับนั้นไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% แต่ปริมาณเชื้อที่พบในสองส่วนนี้มีปริมาณน้อยกว่าปริมาณเชื้อในสามส่วนหลังคือลำไส้ส่วนต้น ลำไส้ส่วนปลายและซีกัมอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตารางที่ 11)

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณความแตกต่างของเชื้อ *Vibrio* spp. ระหว่างแต่ละส่วนของกุ้งเป็นโรคกับกุ้งปกติ พบว่ามีเพียงส่วนปากถึงกระเพาะเท่านั้นที่กุ้งเป็นโรคมีค่ามากกว่าในกุ้งปกติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยกุ้งเป็นโรคมีค่า $5.14 \pm 0.78 \log_{10} \text{cfu/g}$ ส่วนกุ้งปกติมีค่า $4.34 \pm 0.95 \log_{10} \text{cfu/g}$ (ตารางที่ 11)

จากการเปรียบเทียบปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดและปริมาณเชื้อ *Vibrio* spp. ทั้งหมดของกุ้งเป็นโรคและกุ้งปกติ พบว่ามีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดมากกว่าเชื้อ *Vibrio* spp. ทั้งหมดอย่างมีนัยสำคัญในทุกส่วนของกุ้ง นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดและปริมาณเชื้อ *Vibrio* spp. ทั้งหมดในกุ้งเป็นโรคมักมากกว่ากุ้งปกติอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 9. ปริมาณ *Vibrio* spp. ทั้งหมด ($\log_{10}$ cfu/g) ในจากทุกส่วนของกุ้งกุลาดำ
ที่เจริญบนอาหาร TCBS

ลักษณะกุ้งกุลาดำ	เชื้อ (mean $\pm$ SD)
กุ้งเป็นโรคกุ้งติดเชื้อแบคทีเรีย	6.15 $\pm$ 0.37
กลุ่มที่ติดเชื้อไวรัส	6.86 $\pm$ 0.06
กลุ่มกุ้งปกติ	6.36 $\pm$ 0.95

ตารางที่ 10. ปริมาณเชื้อ *Vibrio* spp. ($\log_{10}$ cfu/g) ในทางเดินอาหารแต่ละส่วนและตับของกุ้งกุลาดำ
เป็นโรค และกุ้งปกติ จากอาหาร TCBS

ทางเดินอาหารกุ้ง	กุ้งเป็นโรค* (mean $\pm$ SD)	กุ้งปกติ (mean $\pm$ SD)
ปาก – กระเพาะ	5.14 $\pm$ 0.78	4.34 $\pm$ 0.95
ตับ	3.65 $\pm$ 1.76	3.82 $\pm$ 1.09
ลำไส้ส่วนต้น	5.31 $\pm$ 1.85	4.84 $\pm$ 1.74
ลำไส้ส่วนปลาย	4.73 $\pm$ 2.29	4.55 $\pm$ 2.06
ซีกัม	5.35 $\pm$ 0.96	5.15 $\pm$ 1.39

*ทำการวิเคราะห์รวมข้อมูลของกุ้งป่วยติดเชื้อจากแบคทีเรียและไวรัส

ตารางที่ 11. เปรียบเทียบปริมาณเชื้อ *Vibrio* spp. ($\log_{10}$ cfu/g) ในระบบทางเดินอาหารแต่ละส่วนและ
 ระดับของกึ่งเป็นโรคและกึ่งปกติ จากอาหาร TCBS

ทางเดินอาหาร	ทางเดินอาหารกึ่ง	กึ่งเป็นโรค** (mean $\pm$ SD)	กึ่งปกติ (mean $\pm$ SD)
กึ่ง	ปาก-กระเพาะ	5.14 $\pm$ 0.78	4.34 $\pm$ 0.95
ปาก-กระเพาะ	ตับ	3.65 $\pm$ 1.76*	3.82 $\pm$ 1.09
	ลำไส้ส่วนต้น	5.31 $\pm$ 1.85	4.84 $\pm$ 1.74
	ลำไส้ส่วนปลาย	4.73 $\pm$ 2.29	4.55 $\pm$ 2.06
	ซีกัม	5.35 $\pm$ 0.96	5.15 $\pm$ 1.39
ตับ	ลำไส้ส่วนต้น	5.31 $\pm$ 1.85*	4.84 $\pm$ 1.74*
	ลำไส้ส่วนปลาย	4.73 $\pm$ 2.29*	4.55 $\pm$ 2.06*
	ซีกัม	5.35 $\pm$ 0.96*	5.15 $\pm$ 1.39*
ลำไส้ส่วนต้น	ลำไส้ส่วนปลาย	4.73 $\pm$ 2.29	4.55 $\pm$ 2.06
	ซีกัม	5.35 $\pm$ 0.96	5.15 $\pm$ 1.39
ลำไส้ส่วนปลาย	ซีกัม	5.35 $\pm$ 0.96	5.15 $\pm$ 1.39

* หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

** ทำการวิเคราะห์รวมข้อมูลของกึ่งป่วยติดเชื้อจากแบคทีเรียและไวรัส

2.3 จำนวนแบคทีเรียแอคไทโนมัยซีท แบคทีเรียแลคติก และยีสต์

จากการศึกษาแบคทีเรียแลคติกที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS แบคทีเรียแอคไทโนมัยซีทจากอาหารเลี้ยงเชื้อ GYEA และเชื้อยีสต์จากอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และ YA ผลการศึกษารังนี้พบว่าสามารถพบเชื้อทั้งสามกลุ่มได้ในปริมาณที่น้อย และไม่สม่ำเสมอ หรือพบในบางตัวอย่างเท่านั้น อย่างไรก็ตามพบว่ามีโอกาสสูงในการพบแบคทีเรียแลคติก และพบในปริมาณที่สูงกว่าเมื่อเทียบกับเชื้อแบคทีเรียแอคไทโนมัยซีท และยีสต์ กล่าวคือพบแบคทีเรียแลคติก แอคไทโนมัยซีท และยีสต์ ในปริมาณ $\leq 4.3 \times 10^6$, $\leq 6.75 \times 10^5$ และ $\leq 1.73 \times 10^3$ cfu/g ตามลำดับ

3. การจัดกลุ่ม และการเทียบเคียงแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างกุ้งกุลาดำ

3.1 ศึกษาชนิดของแบคทีเรียทั้งหมดที่ได้จากอาหาร TSA

แยกเชื้อแบคทีเรียจากอาหาร TSA ที่แยกได้ทั้งหมดจากระบบทางเดินอาหารและตับของกุ้งปกติ กุ้งติดเชื้อไวรัส และติดเชื้อแบคทีเรีย เมื่อนำมาเทียบเคียงชนิดโดยใช้วิธีทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี พบว่ามีแบคทีเรีย 8 ชนิด คือ *Bacillus* spp., *Corynebacterium* spp., *Enterobacter* spp., *Escherichia coli*, *Flavobacterium* spp., *Micrococcus* spp., *Staphylococcus* spp. และ *Vibrio* spp. แต่ปริมาณแบคทีเรียแต่ละชนิดแตกต่างกันไปตามส่วนต่าง ๆ ของกุ้ง

จากค่าเฉลี่ยของปริมาณเชื้อแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ พบว่า *Micrococcus* spp. มีปริมาณสูงสุดใน กุ้งทั้ง 3 กลุ่ม กล่าวคือพบในปริมาณ และ 8.38 ± 0.13 , 8.28 ± 0.37 และ $7.82 \pm 0.23 \log_{10} \text{cfu/g}$ ใน กุ้งติดเชื้อแบคทีเรีย กุ้งติดเชื้อไวรัส และกุ้งปกติ ตามลำดับ รองลงไปคือ *Corynebacterium* spp. และ *Staphylococcus* spp. ค่าที่ได้แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่นที่ 95% ระหว่างกุ้งทั้ง 3 กลุ่ม แต่ในกุ้งที่ติดเชื้อไวรัส พบว่าแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดมีปริมาณมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่นที่ 95% เมื่อเทียบกับปริมาณของเชื้อ *E. coli* และ *Flavobacterium* spp. ส่วนในกุ้งปกติพบว่าเชื้อทั้ง 3 ชนิด มีปริมาณมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่นที่ 95% เมื่อเทียบกับปริมาณของเชื้อชนิดอื่น ๆ ที่เหลืออีก 5 ชนิด ในขณะที่เชื้อทุกชนิดแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญในกุ้งติดเชื้อแบคทีเรีย ส่วนปริมาณ เชื้อที่พบน้อยที่สุดในกุ้งทั้ง 3 กลุ่ม คือ *Flavobacterium* spp. ซึ่งพบในปริมาณ 4.98 ± 3.35 , 3.99 ± 5.64 และ $2.22 \pm 3.85 \log_{10} \text{cfu/g}$ ในกุ้งปกติ กุ้งติดเชื้อแบคทีเรีย และไวรัส ตามลำดับ ดังแสดงใน ตารางที่ 12 เมื่อพิจารณาโดยภาพรวมเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดมีแนวโน้มเหมือนกันในกุ้งทั้ง 3 กลุ่ม ทั้ง ในเชิงปริมาณและลำดับของจำนวนเชื้อ ตารางที่ 12

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดแยกตามส่วนต่าง ๆ ของระบบทางเดินอาหาร พบว่าในกุ้งปกติมีปริมาณของเชื้อ *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus* spp. และ *Vibrio* spp. ใน ส่วนของลำไส้ส่วนต้น ลำไส้ส่วนปลาย และซีกัม ในปริมาณที่มากกว่าส่วนปาก-กระเพาะ และตับอย่างมี นัยสำคัญที่ความเชื่อมั่นที่ 95% ส่วน *Micrococcus* spp. ใน ลำไส้ส่วนต้น เท่านั้นที่มีปริมาณมากกว่า ส่วนอื่น ๆ ที่เหลืออย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่นที่ 95% (ตารางที่ 13) ส่วนปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้ง 8 ชนิดในกุ้งติดเชื้อไวรัสและติดเชื้อแบคทีเรียมีปริมาณแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่นที่ 95% (ตารางที่ 14 และ 15)

ตารางที่ 12. ปริมาณเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดที่เจริญบนอาหาร TSA ($\log_{10}$ cfu/g) ในระบบทางเดินอาหารของกุ้งติดเชื้อแบคทีเรีย ไวรัส และกุ้งปกติ

ชนิดแบคทีเรีย	กุ้งติดเชื้อแบคทีเรีย	กุ้งติดเชื้อไวรัส	กุ้งปกติ
<i>Bacillus</i>	6.17 ± 1.65	5.46 ± 4.79	6.49 ± 0.49^a
<i>Corynebacterium</i>	8.03 ± 0.34	7.99 ± 0.16^A	7.71 ± 0.45^A
<i>Enterobacter</i>	6.62 ± 1.77	7.18 ± 1.37	6.89 ± 0.46^a
<i>E. coli</i>	5.99 ± 2.39	2.34 ± 4.05^a	6.08 ± 0.76^a
<i>Flavobacterium</i>	3.99 ± 5.64	2.22 ± 3.85^a	4.98 ± 3.35^a
<i>Micrococcus</i>	8.38 ± 0.13	8.28 ± 0.37^A	7.82 ± 0.23^A
<i>Staphylococcus</i>	7.72 ± 0.23	7.49 ± 0.50^A	7.57 ± 0.54^A
<i>Vibrio</i>	7.34 ± 1.01	7.00 ± 1.73	6.78 ± 0.98^a

หมายเหตุ

^A หมายถึง มีปริมาณเชื้อมากกว่า ^a อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ในกุ้งประเภทเดียวกัน

ตารางที่ 13. ปริมาณเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดที่เจริญบนอาหาร TSA ($\log_{10}$ cfu/g) ในระบบทางเดินอาหารของกุ้งปกติ

ชนิดแบคทีเรีย	ปาก - กระเพาะ	ตับ	ลำไส้ส่วนต้น	ลำไส้ส่วนปลาย	ซีกัม
<i>Bacillus</i>	2.83 ± 3.27	2.41 ± 2.79	3.05 ± 3.52	4.61 ± 3.19	3.47 ± 4.06
<i>Corynebacterium</i>	4.36 ± 2.91^a	4.96 ± 0.52^a	6.88 ± 0.63^A	6.79 ± 0.34^A	7.09 ± 0.76^A
<i>Enterobacter</i>	2.67 ± 3.15	3.04 ± 2.03	3.38 ± 3.90	3.26 ± 3.77	5.11 ± 3.42
<i>E. coli</i>	1.28 ± 2.56	2.45 ± 2.83	1.52 ± 3.04	4.79 ± 3.20	1.29 ± 2.59
<i>Flavobacterium</i>	1.35 ± 2.71	1.13 ± 2.26	1.55 ± 3.10	4.74 ± 3.26	1.49 ± 2.98
<i>Micrococcus</i>	6.44 ± 0.26^a	6.24 ± 0.62^a	7.45 ± 0.46^A	7.01 ± 0.62^a	6.875 ± 0.43^a
<i>Staphylococcus</i>	5.89 ± 0.32^a	5.24 ± 0.03^a	7.00 ± 0.79^A	6.83 ± 0.66^A	7.21 ± 0.70^A
<i>Vibrio</i>	4.34 ± 0.95^a	3.82 ± 1.09^a	4.84 ± 1.74^A	4.55 ± 2.06^A	5.15 ± 1.39^A

หมายเหตุ

- หมายถึง ไม่พบเชื้อ

^A หมายถึง มีปริมาณเชื้อมากกว่า ^a อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ระหว่างส่วนต่าง ๆ ของกุ้ง

ตารางที่ 14. ปริมาณเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดที่เจริญบนอาหาร TSA ($\log_{10}$ cfu/g) ในระบบทางเดินอาหารของกิ้งกัดติดเชื้อแบคทีเรีย

ชนิดแบคทีเรีย	ปาก - กระเพาะ	ตับ	ลำไส้ส่วนต้น	ลำไส้ส่วนปลาย	ซีกัม
<i>Bacillus</i>	5.07 ± 0.11	3.17 ± 4.48	3.12 ± 4.41	3.12 ± 4.41	3.60 ± 5.09
<i>Corynebacterium</i>	6.56 ± 0.03	6.04 ± 1.30	7.34 ± 0.47	7.22 ± 0.06	7.77 ± 0.37
<i>Enterobacter</i>	5.43 ± 0.18	5.39 ± 1.25	3.17 ± 5.25	3.52 ± 4.97	3.76 ± 5.32
<i>E. coli</i>	2.94 ± 4.16	5.49 ± 1.68	3.48 ± 4.93	3.34 ± 4.72	3.73 ± 5.28
<i>Flavobacterium</i>	2.93 ± 4.14	3.18 ± 4.50	3.79 ± 5.36	–	3.87 ± 5.47
<i>Micrococcus</i>	6.98 ± 0.73	5.95 ± 1.08	7.78 ± 0.05	7.52 ± 0.36	7.95 ± 0.54
<i>Staphylococcus</i>	5.76 ± 0.83	6.15 ± 0.48	6.50 ± 1.22	6.80 ± 0.33	7.52 ± 0.18
<i>Vibrio</i>	6.22 ± 0.15	3.41 ± 4.82	6.60 ± 0.79	6.64 ± 0.54	3.95 ± 5.59

หมายเหตุ

- หมายถึง ไม่พบเชื้อ

ตารางที่ 15. ปริมาณเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดที่เจริญบนอาหาร TSA ($\log_{10}$ cfu/g) ในระบบทางเดินอาหารของกิ้งกัดติดเชื้อไวรัส

ชนิดแบคทีเรีย	ปาก - กระเพาะ	ตับ	ลำไส้ส่วนต้น	ลำไส้ส่วนปลาย	ซีกัม
<i>Bacillus</i>	4.08 ± 3.54	1.84 ± 3.18	4.46 ± 3.86	4.46 ± 3.86	2.37 ± 4.11
<i>Corynebacterium</i>	4.64 ± 4.02	5.97 ± 0.62	7.04 ± 0.53	7.43 ± 0.35	7.62 ± 0.20
<i>Enterobacter</i>	2.18 ± 3.77	1.87 ± 3.23	2.22 ± 3.84	2.39 ± 4.15	5.27 ± 4.57
<i>E. coli</i>	2.07 ± 3.59	1.79 ± 3.11	2.30 ± 3.99	1.83 ± 3.16	–
<i>Flavobacterium</i>	2.03 ± 3.51	–	–	–	2.18 ± 3.78
<i>Micrococcus</i>	7.22 ± 0.11	6.10 ± 0.36	7.78 ± 0.34	7.53 ± 0.47	7.77 ± 0.55
<i>Staphylococcus</i>	5.96 ± 0.35	5.83 ± 0.10	6.55 ± 0.03	6.87 ± 0.33	7.03 ± 0.87
<i>Vibrio</i>	2.24 ± 3.87	5.56 ± 0.85	2.55 ± 4.41	4.98 ± 4.34	4.79 ± 4.17

หมายเหตุ

- หมายถึง ไม่พบเชื้อ

3.2 ศึกษาสปีชีส์ของแบคทีเรียไวรัสโอทั้งหมดที่ได้จากอาหาร TCBS

จากผลการเทียบเคียงสปีชีส์ของเชื้อ *Vibrio* spp. ที่แยกได้จากอาหาร TCBS จากส่วนต่าง ๆ ทั้ง 5 ส่วน คือ ปากถึงกระเพาะ ตับ ลำไส้ส่วนต้น ลำไส้ส่วนปลาย และซีกัม ของกุ้งติดเชื้อแบคทีเรียติดเชื้อไวรัส และกุ้งปกติ โดยใช้วิธีทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี พบว่ามี *Vibrio* spp. ทั้งหมด จำนวน 15 สปีชีส์คือ *V. alginolyticus*, *V. cambellii*, *V. carchariae*, *V. cincinnatiensis*, *V. damsela*, *V. harveyi*, *V. logei*, *V. marinus*, *V. mediteranei*, *V. mimicus*, *V. natriegens*, *V. orientalis*, *V. pelagius* I, *V. pelagius* II และ *V. vulnificus* B₂ โดยมีชนิดและปริมาณแตกต่างกันไป กล่าวคือ ในกุ้งติดเชื้อแบคทีเรียตรวจพบทั้ง 15 สปีชีส์ แต่ไม่พบ *V. mediteranei* ในกุ้งติดเชื้อไวรัส ขณะที่พบเชื้อชนิดนี้ 2.72 ± 3.85 และ $4.75 \pm 1.79 \log_{10}$ cfu/g ในกุ้งติดเชื้อแบคทีเรียและกุ้งปกติตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าไม่พบเชื้อ *V. harveyi* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคเรืองแสงในกุ้งปกติ ขณะที่ตรวจเจอเชื้อ *V. harveyi* ในปริมาณสูงในกุ้งติดเชื้อแบคทีเรียกล่าวคือ $4.66 \pm 0.94 \log_{10}$ cfu/g และตรวจพบบ้างในกุ้งติดเชื้อไวรัสคือ $1.83 \pm 1.86 \log_{10}$ cfu/g ซึ่งคาดว่าเกิดจากการบุกรุกของเชื้อชนิดนี้ขณะที่กุ้งอ่อนแอจากการป่วยติดเชื้อไวรัส จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้นทำให้สัมพันธ์กับปริมาณเชื้อแต่ละชนิดในกุ้งทั้ง 3 กลุ่ม กล่าวคือเชื้อที่พบทั้งหมด 15 สปีชีส์ มีปริมาณแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ยกเว้นเชื้อ 2 ชนิดดังกล่าว คือ *V. mediteranei* พบในกุ้งปกติในปริมาณสูงกว่ากุ้งติดเชื้อแบคทีเรียและไวรัสอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ส่วนเชื้อ *V. harveyi* พบในกุ้งป่วยติดเชื้อแบคทีเรียในปริมาณสูงกว่ากุ้งป่วยติดเชื้อไวรัส และกุ้งปกติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เชื้อที่พบในปริมาณค่อนข้างสูงในกุ้งทั้ง 3 กลุ่มคือ *V. cincinnatiensis*, *V. vulnificus* B₂ และ *V. carchariae* ซึ่งพบในปริมาณประมาณ 4 - 5 $\log_{10}$ cfu/g ส่วนเชื้อที่พบในปริมาณน้อย 3 อันดับหลังในกุ้งทั้ง 3 กลุ่มคือ *V. logei*, *V. orientalis* และ *V. damsela* ซึ่งพบในปริมาณประมาณ 1 - 3 $\log_{10}$ cfu/g ดังแสดงในตารางที่ 16

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ *Vibrio* spp. แยกตามส่วนของระบบทางเดินอาหาร รวมทั้งตับของกุ้งทั้ง 3 กลุ่ม (ตารางที่ 17-19) โดยพิจารณา *V. mediteranei* ที่ไม่พบในกุ้งที่ป่วยติดเชื้อไวรัส (ตารางที่ 16 และ 18) แต่ในกุ้งปกติ (ตารางที่ 17) นั้น พบเชื้อชนิดนี้ในทุกส่วนของระบบทางเดินอาหารและตับ และมีปริมาณแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ส่วนในกุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรีย (ตารางที่ 19) พบว่ามีเชื้อชนิดนี้ในปริมาณน้อยและพบเฉพาะในส่วนปาก-กระเพาะ และตับเท่านั้น ซึ่งข้อมูลที่ได้ตรงข้ามกับเชื้อ *V. harveyi* ที่ไม่พบในกุ้งปกติ (ตารางที่ 16-17) แต่พบในกุ้งติดเชื้อแบคทีเรียและติดเชื้อไวรัส เมื่อพิจารณาแยกส่วนในกุ้งติดเชื้อแบคทีเรีย (ตารางที่ 19) พบเชื้อ *V. harveyi* กระจายในทุกส่วนและมีในปริมาณที่แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ส่วนในกุ้งติดเชื้อไวรัสนั้นพบเชื้อนี้เฉพาะในส่วนตับและลำไส้ส่วนต้น

ตารางที่ 16. ค่าเฉลี่ยโดยรวมของเชื้อ *Vibrio* spp. ($\log_{10}$ cfu/g) แต่ละสปีชีส์ในกุ้งเป็นโรคและกุ้งปกติ เรียงตามลำดับปริมาณสูงไปต่ำ

ชนิดแบคทีเรีย	กุ้งติดเชื้อแบคทีเรีย	กุ้งติดเชื้อไวรัส	กุ้งปกติ
<i>V. cincinnatiensis</i>	4.92 ± 0.11	5.98 ± 0.16^B	5.30 ± 0.61^B
<i>V. vulnificus</i> B ₂	5.43 ± 0.86	5.66 ± 0.43^B	5.04 ± 1.04^B
<i>V. carchariae</i>	4.86 ± 0.48	5.01 ± 1.49^B	4.50 ± 2.02^B
<i>V. marinus</i>	2.72 ± 3.84	5.31 ± 0.33^B	3.39 ± 2.45^B
<i>V. cambellii</i>	2.72 ± 3.85	5.34 ± 0.49^B	4.37 ± 1.52^B
<i>V. alginolyticus</i>	4.36 ± 0.13	5.56 ± 0.77^B	5.07 ± 1.01^B
<i>V. mimicus</i>	3.56 ± 1.22	5.64 ± 1.03^B	2.84 ± 3.36
<i>V. natriegens</i>	4.12 ± 0.32	4.90 ± 0.65^B	4.52 ± 1.09^B
<i>V. pelagius</i> II	3.77 ± 1.16	4.80 ± 0.46	4.02 ± 1.52^B
<i>V. pelagius</i> I	2.45 ± 3.46	5.21 ± 0.68^B	4.59 ± 1.59^B
<i>V. harveyi</i>	4.66 ± 0.94^A	1.83 ± 1.86^b	- ^{a b}
<i>V. logei</i>	3.32 ± 0.55	2.07 ± 1.84^b	0.81 ± 1.63^b
<i>V. orientalis</i>	2.38 ± 3.37	2.58 ± 2.28	1.00 ± 1.96^b
<i>V. mediterranei</i>	2.72 ± 3.85	- ^{a b}	4.57 ± 1.79^{AB}
<i>V. damsela</i>	1.65 ± 2.33	1.54 ± 2.67	2.51 ± 1.81

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่พบเชื้อ

^A หมายถึง มีปริมาณเชื้อมากกว่า ^a อย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %
ระหว่างกุ้งต่างกลุ่ม ของเชื้อตัวเดียวกัน

^B หมายถึง มีปริมาณเชื้อมากกว่า ^b อย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %
ภายในกุ้งกลุ่มเดียวกัน

ตารางที่ 17. ปริมาณเชื้อ *Vibrio* spp. ($\log_{10}$ cfu/g) แต่ละสปีชีส์ในระบบทางเดินอาหารส่วนต่าง ๆ และ
 ระดับของกึ่งปกติ

ชนิดแบคทีเรีย	ปาก – กระเพาะ	ตับ	ลำไส้ส่วนต้น	ลำไส้ส่วน ปลาย	ซีกัม
<i>V. alginolyticus</i>	2.74 ± 1.93	3.71 ± 0.48	3.72 ± 2.55	3.50 ± 2.46	4.56 ± 1.06
<i>V. cambellii</i>	3.46 ± 0.86^A	2.10 ± 1.47^A	1.04 ± 2.07	– ^a	1.62 ± 3.24
<i>V. carchariae</i>	3.54 ± 1.10	2.98 ± 2.07	2.17 ± 2.59	3.00 ± 3.49	1.14 ± 2.27
<i>V. cincinnatiensis</i>	4.37 ± 0.46	3.60 ± 0.46^a	4.57 ± 0.42^A	4.52 ± 0.96	3.69 ± 2.50
<i>V. damsela</i>	1.42 ± 1.65	1.08 ± 2.16	–	–	–
<i>V. harveyi</i>	–	–	–	–	–
<i>V. logei</i>	–	–	–	–	0.81 ± 1.63
<i>V. marinus</i>	1.46 ± 1.76	2.06 ± 1.43^A	3.18 ± 2.35^A	– ^a	2.28 ± 2.71
<i>V. mediteranei</i>	2.82 ± 1.98	2.40 ± 1.64	2.66 ± 3.07	2.62 ± 3.21	1.60 ± 3.21
<i>V. mimicus</i>	–	0.87 ± 1.74	2.20 ± 2.56	0.81 ± 1.62	1.64 ± 3.27
<i>V. natriegens</i>	2.72 ± 1.99	3.13 ± 0.60	3.50 ± 2.41	2.16 ± 2.55	1.27 ± 2.54
<i>V. orientalis</i>	0.96 ± 1.93	–	–	0.85 ± 1.71	–
<i>V. pelagius</i> I	2.39 ± 1.63	1.45 ± 1.71	0.67 ± 1.35	1.17 ± 2.34	2.96 ± 3.44
<i>V. pelagius</i> II	1.11 ± 1.28	1.63 ± 1.99	1.16 ± 2.32	2.36 ± 2.75	3.18 ± 2.28
<i>V. vulnificus</i> B ₂	4.11 ± 0.58	2.09 ± 2.42	3.02 ± 2.10	2.47 ± 2.86	3.95 ± 2.71

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่พบเชื้อ

^A หมายถึง มีปริมาณเชื้อมากกว่า ^a อย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความ
 เชื่อมั่น 95 % ระหว่างกึ่งส่วนต่าง ๆ

ตารางที่ 18. ปริมาณเชื้อ *Vibrio* spp. ($\log_{10}$ cfu/g) แต่ละสปีชีส์ในระบบทางเดินอาหารส่วนต่าง ๆ และ
 ด้บของกึ่งติตเชื้อไวรัส

ชนิดแบคทีเรีย	ปาก – กระเพาะ	ตับ	ลำไส้ส่วนต้น	ลำไส้ส่วน ปลาย	ซีรัม
<i>V. alginolyticus</i>	1.50 ± 2.60	1.70 ± 1.49	4.75 ± 0.51	3.58 ± 3.12	5.18 ± 0.83
<i>V. cambellii</i>	4.10 ± 0.49^A	0.63 ± 1.10^a	1.74 ± 3.01	5.23 ± 0.50^A	3.18 ± 2.75
<i>V. carchariae</i>	–	0.97 ± 1.68	2.14 ± 3.71	3.06 ± 2.88	3.50 ± 3.06
<i>V. cincinnatiensis</i>	4.29 ± 0.92	3.30 ± 0.24	4.91 ± 0.37	5.57 ± 0.27	5.34 ± 0.69
<i>V. damsela</i>	1.29 ± 2.23	–	–	–	1.51 ± 2.62
<i>V. harveyi</i>	–	1.42 ± 1.28	1.23 ± 2.14	–	–
<i>V. logei</i>	–	0.90 ± 1.56	1.17 ± 2.02	–	–
<i>V. marinus</i>	2.73 ± 2.44	1.80 ± 1.56	3.18 ± 2.75	1.90 ± 3.29	3.08 ± 2.67
<i>V. mediterranei</i>	–	–	–	–	–
<i>V. mimicus</i>	4.38 ± 0.60^A	1.03 ± 1.78^a	2.10 ± 3.64	1.63 ± 2.81	2.04 ± 3.54
<i>V. natriegens</i>	2.04 ± 1.88	1.04 ± 1.81^a	1.59 ± 2.75	4.46 ± 0.56^A	4.39 ± 0.95^A
<i>V. orientalis</i>	1.14 ± 1.98	0.69 ± 1.20^a	1.43 ± 2.48	–	–
<i>V. pelagius</i> I	1.76 ± 3.05	– ^a	2.91 ± 2.61	1.76 ± 3.05	5.02 ± 0.47^A
<i>V. pelagius</i> II	–	0.73 ± 1.27	2.77 ± 2.44	3.24 ± 2.81	2.88 ± 2.50
<i>V. vulnificus</i> B ₂	3.37 ± 2.92	1.81 ± 1.59	3.56 ± 3.14	4.48 ± 0.61	5.03 ± 0.67

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่พบเชื้อ

^A หมายถึง มีปริมาณเชื้อมากกว่า ^a อย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความ
 เชื่อมั่น 95 % ระหว่างกึ่งส่วนต่าง ๆ

ตารางที่ 19. ปริมาณเชื้อ *Vibrio* spp. ($\log_{10}$ cfu/g) แต่ละสปีชีส์ในระบบทางเดินอาหารส่วนต่าง ๆ และ
 ตำบลของกุ้งติดเชื้อแบคทีเรีย

ชนิดแบคทีเรีย	ปาก – กระเพาะ	ตับ	ลำไส้ส่วนต้น	ลำไส้ส่วน ปลาย	ซีรัม
<i>V. alginolyticus</i>	1.74 ± 2.46	–	2.13 ± 3.01	2.01 ± 2.84	3.34 ± 1.21
<i>V. cambellii</i>	–	–	2.57 ± 3.63	2.58 ± 3.65	–
<i>V. carchariae</i>	2.46 ± 3.48	4.64 ± 0.26	–	3.73 ± 0.04	–
<i>V. cincinnatiensis</i>	3.91 ± 0.76	2.96 ± 1.19	4.55 ± 0.10	4.13 ± 0.33	4.16 ± 0.02
<i>V. damsela</i>	–	–	–	–	1.65 ± 2.33
<i>V. harveyi</i>	1.47 ± 2.08	1.06 ± 1.49	2.62 ± 3.70	2.29 ± 3.24	2.00 ± 2.83
<i>V. logei</i>	2.86 ± 0.10	–	–	–	1.83 ± 2.58
<i>V. marinus</i>			2.20 ± 3.11	2.37 ± 3.36	2.64 ± 3.74
<i>V. mediterranei</i>	2.64 ± 3.74	2.45 ± 3.47	–	–	–
<i>V. mimicus</i>	1.87 ± 2.65	–	1.35 ± 1.91	2.16 ± 3.05	–
<i>V. natriegens</i>	1.72 ± 2.44	1.30 ± 1.84	3.93 ± 0.07	–	3.22 ± 1.05
<i>V. orientalis</i>	–	–	2.38 ± 3.37	–	–
<i>V. pelagius</i> I	1.87 ± 2.65	1.15 ± 1.63	2.30 ± 3.25	–	2.26 ± 3.19
<i>V. pelagius</i> II	3.30 ± 0.60	1.00 ± 1.41	2.26 ± 3.20	–	–
<i>V. vulnificus</i> B ₂	2.27 ± 3.21	1.19 ± 1.69	5.26 ± 0.81	4.80 ± 1.08	4.13 ± 0.82

หมายเหตุ – หมายถึง ไม่พบเชื้อ

^A หมายถึง มีปริมาณเชื้อมากกว่า ^a อย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความ
 เชื่อมั่น 95 % ระหว่างกุ้งส่วนต่าง ๆ

ไวรัสโอสายพันธุ์อื่น ๆ ที่มีรายงานว่ามีความเกี่ยวข้องกับการเลี้ยงสัตว์น้ำคือ *V. alginolyticus* สำหรับการผลึกษาจากระบบทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำในครั้งนี้พบ *V. alginolyticus* ในปริมาณที่สูงเป็นอันดับ 6 เมื่อเทียบกับเชื้อไวรัสโอสายพันธุ์อื่น ๆ ที่พบทั้งหมด ในกุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรียมีเชื้อชนิดนี้ในปริมาณต่ำสุด คือ $4.36 \pm 0.13 \log_{10} \text{ cfu/g}$ และพบในกุ้งสุขภาพดีและกุ้งติดเชื้อไวรัสในปริมาณ 5.07 ± 1.01 และ $5.56 \pm 0.77 \log_{10} \text{ cfu/g}$ ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามพบว่ามีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ในกุ้งทั้งสามกลุ่ม (ตารางที่ 16) เมื่อแยกส่วนของระบบทางเดินอาหารพบเชื้อนี้มากที่สุดในส่วนของซีกัมในกุ้งทั้ง 3 กลุ่ม กล่าวคือพบในกุ้งปกติ กุ้งติดเชื้อไวรัส และกุ้งติดเชื้อแบคทีเรียในปริมาณ 4.56 ± 1.06 , 5.18 ± 0.83 และ $3.34 \pm 1.21 \log_{10} \text{ cfu/g}$ ตามลำดับ (ตารางที่ 17-19)

3.3 ศึกษาชนิดของแบคทีเรียแลคติกจากระบบทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำ

3.3.1 ทำการศึกษาด้วยวิธีการเทียบเคียงชนิด

จากการทดสอบแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากระบบทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำ จำนวน 78 สายพันธุ์ นำคุณลักษณะของเชื้อแต่ละตัวไปเทียบเคียงชนิดดังที่รวบรวมใน Wood and Holzapfel (1995) พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียแลคติก 6 กลุ่ม ดังแสดงใน ตารางที่ 20 กล่าวคือเป็น *Enterococcus faecium*, *Tetragenococcus halophilus*, *Lactococcus lactis* spp. *lactis*, *Leuconostoc mesenteroid*, *Pediococcus pentosaceus* และ *Enterococcus faecalis* จำนวน 25, 23, 16, 7, 4 และ 3 ตัวอย่าง คิดเป็น 32.05, 29.45, 20.51, 8.97, 5.13 และ 3.85% ตามลำดับ

3.3.2 ทำการศึกษาด้วยวิธีการ Numerical taxonomy

จากการวิเคราะห์ข้อมูลของแบคทีเรียแลคติกจำนวน 78 สายพันธุ์ รวมทั้งแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน จำนวน 10 สายพันธุ์ จากผลการทดสอบ 103 การทดสอบที่ได้จาก ได้ผลการทดสอบดัง ตารางที่ 21.1- 21.5 (ภาคผนวก ก.) ด้วยเทคนิคตามวิธีการของ numerical taxonomy โดยใช้ resemblance coefficient 2 แบบ คือ simple matching coefficient (S_{sm}) และ Jaccard coefficient (S_j) สร้างเดนโดรแกรมโดยใช้ unweighted pair group method with arithmetic averages (UPGMA) ซึ่งจากผลการจัดกลุ่มพบว่า resemblance coefficient 2 แบบ ให้ผลการจัดกลุ่มที่สอดคล้องกัน และให้ค่า cophenetic correlation ที่สูงมากคือ 0.98 และ 0.97 ตามลำดับ รูปที่ 1 แสดงเดนโดรแกรม S_{sm} UPGMA และที่ similarity level 95% แบ่งเชื้อได้ทั้งหมด 4 cluster ซึ่งมี cluster ใหญ่ 1 กลุ่ม และ cluster เล็ก 3 กลุ่ม และมี single membered cluster 16 สายพันธุ์ที่เป็นเชื้อเดี่ยว ใน cluster ใหญ่ มีเชื้อแบคทีเรียแลคติกจากกุ้งกุลาดำ 40 สายพันธุ์ รวมกลุ่มกับเชื้อมาตรฐาน *Leuconostoc dextranicum* TISTR 056 ซึ่งบ่งบอกได้ว่าเชื้อทั้ง 40 สายพันธุ์ มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเชื้อมาตรฐานดังกล่าว ส่วนเชื้อที่เหลือไม่สามารถระบุได้ว่ามีโอกาเป็นเชื้ออะไรเพราะไม่มีเชื้อมาตรฐานไปอยู่ในกลุ่มเชื้อเหล่านั้น

ตารางที่ 20. ผลจากการเทียบเคียงเชื้อแบคทีเรียแลคติกจากระบบทางเดินอาหารของกุลาดำ โดยเทียบเคียงกับ Wood and Holzapfel (1995)

ลำดับที่	Lactic acid bacteria	เชื้อแบคทีเรียแลคติกจากระบบทางเดินอาหารของกุลาดำ
1.	<i>Enterococcus faecalis</i>	c11, L21 1b1, S76 1a4
2.	<i>Enterococcus faecium</i>	A18/1, A2/2, A21/1, A22/1, A23/1, A36/2, A45/2, A8/1, B1/2, B25/2, c15, C29/1, D16/1, D17/1, L24 1a5, L52 2b2, L52 2b4, L53 1a3, S10 1b1, S10 32a1, S36 1b1, S52 2b1, S63 1b2, S63 2a1, S81 2b3
3.	<i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>lactis</i>	a10, a18, A35/2, A26/2.2, H2O GUN a2, L1, L11 1b1, L22 1a1, L24 1a1, L24 2a1, L3, L35 1a1, L35 1a4, L5, L54 1b1.2, S71 1a2,
4.	<i>Leuconostoc mesenteriod</i>	D28/2, D3/2, d35, D43/2, L12 1a1, L54 2a1, S81 2b4
5.	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	A32/2, a47/2, A48/2, A51/2,
6.	<i>Tetragenococcus halophilus</i>	A19/1, A26/2.1, A31/2, C13/1, c15/2, D3/1, D48/2, L21 1b3, L24 1a2, L24 1a4, L24 2a2, L24 2a3, L52 2a1, L54 1b1.1, L54 2b2, S10 1a3, S63 1a4, S71 1a4, S71 2a4, S71 1a5, S71 1a6, S71 1b2, Z23/1

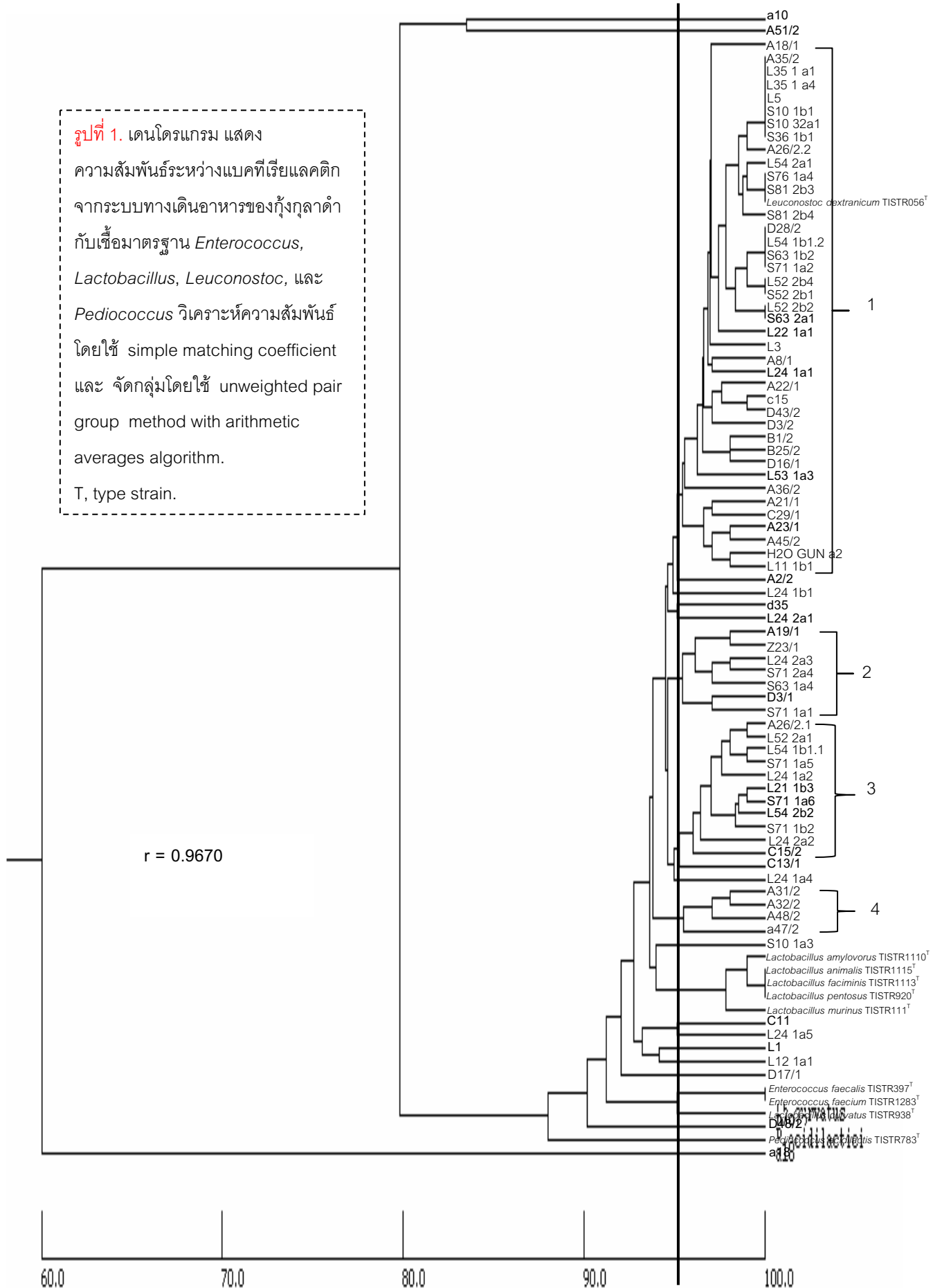
และ 16 ตัวอย่างที่แยกตัวเป็นเชื้อเดี่ยว ๆ ได้แก่ a10, A51/2, A2/2, L24 2a1, C13/1, L24 1a4, S10 1a3, C11, L24 1a5, L1, L12 1a1, D17/1, D48/2 และ a18 เป็นต้น

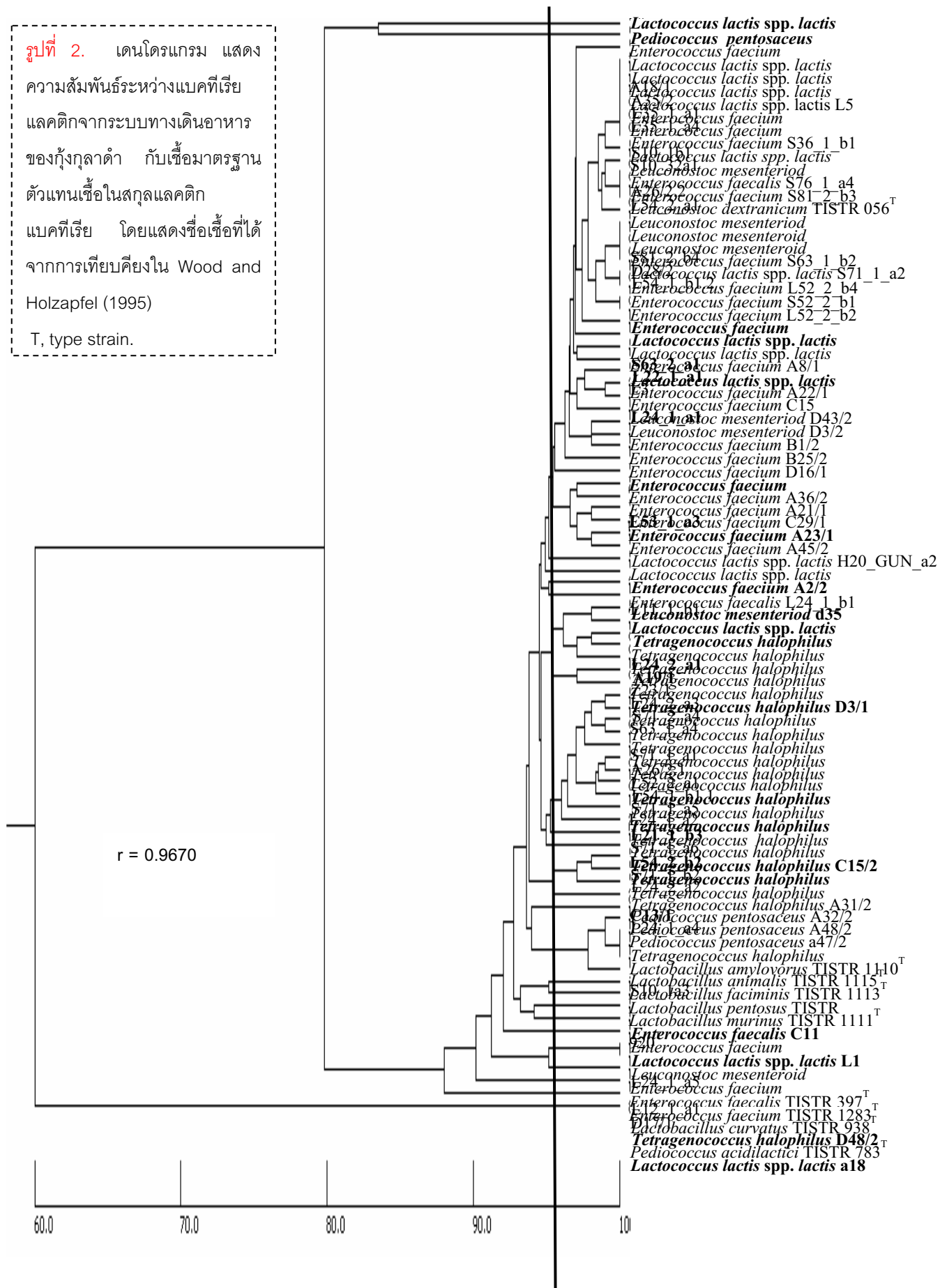
จากการได้นำเชื้อเชื้อที่ได้จากการเทียบเคียงจากหนังสือจากตารางที่ 20 มาใส่ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 2. ซึ่งจะพบว่า cluster ที่ 1 ซึ่งเป็น cluster ใหญ่นั้นเป็นเชื้อผสมของ *E. faecium*, *L. lactis* spp. *lactis*, *L. mesenteroid* และ *E. faecalis* ส่วนเชื้อใน cluster ที่ 2-3 เป็น *T. halophilus* ส่วน cluster ที่ 4 เป็นเชื้อ *T. halophilus* และ *P. pentosaceus* จากการที่ได้เชื้อผสมใน cluster ที่ 1 ที่เชื้อมีความใกล้เคียงกันมากหรือแม้แต่เชื้อ single membered cluster ที่อยู่ห่างกันมากเช่นระหว่าง a10 และ a18 นั้นได้ผลเป็นเชื้อเดียวกันคือ *Lactococcus lactis* spp. *lactis* ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการขัดแย้งของผลการทดสอบที่ต้องทำการศึกษาด้วยวิธีอื่นที่มีความน่าเชื่อถือสูงกว่าเพื่อทำการยืนยันผล ต่อไป

รูปที่ 1. 덴ไดรแกรม แสดง

ความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียแลคติก
จากระบบทางเดินอาหารของกิ้งกูดดำ
กับเชื้อมาตรฐาน *Enterococcus*,
Lactobacillus, *Leuconostoc*, และ
Pediococcus วิเคราะห์ความสัมพันธ์
โดยใช้ simple matching coefficient
และ จัดกลุ่มโดยใช้ unweighted pair
group method with arithmetic
averages algorithm.

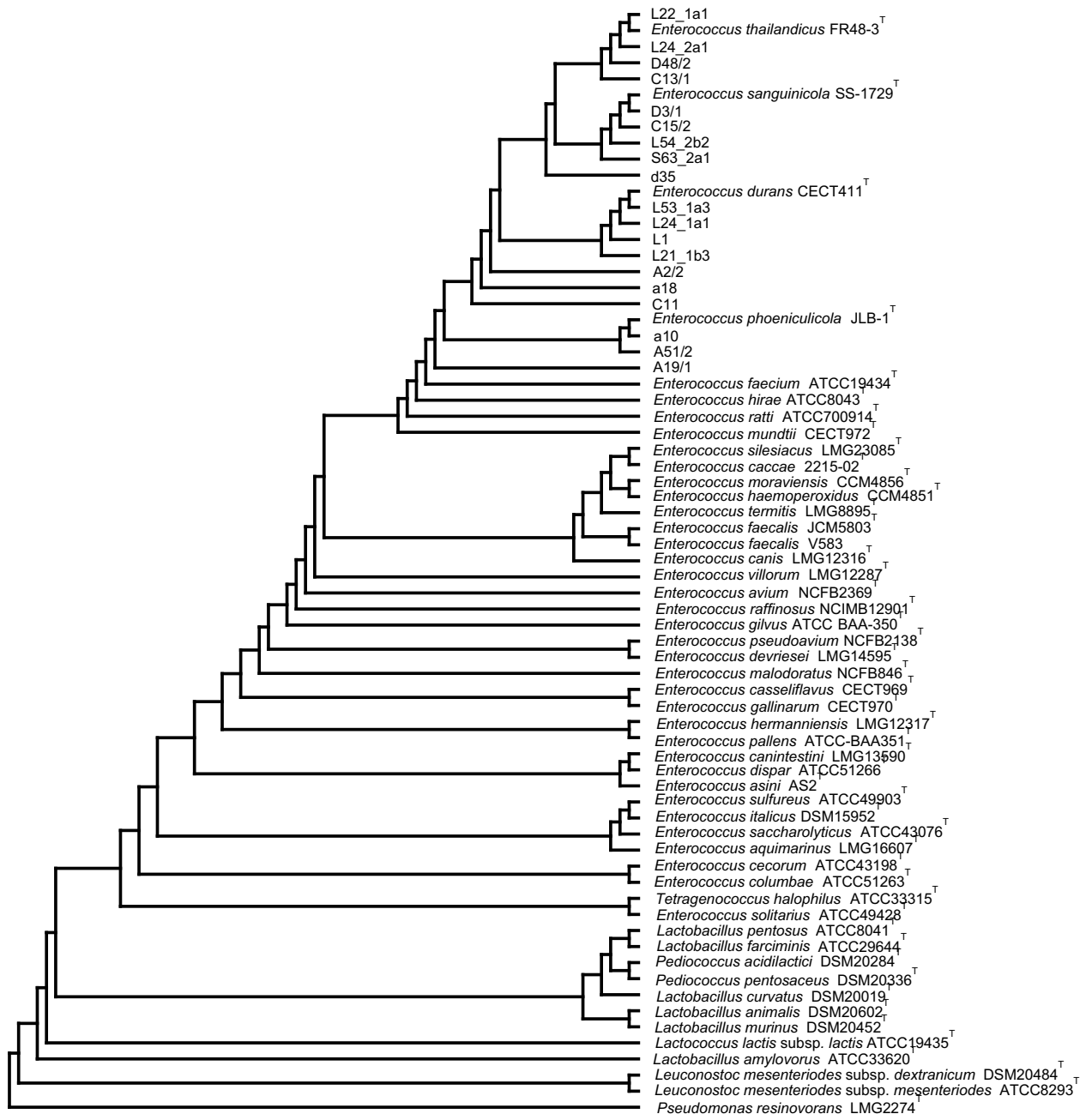
T, type strain.



[illegible]

3.3.3 ทำการศึกษาด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล (16S rDNA sequencing)

ในการวิเคราะห์ทางชีวโมเลกุลคัดเลือกเชื้อแลคติกจำนวน 19 สายพันธุ์ ได้คัดเลือกเชื้อจาก single membered cluster และเชื้อตัวแทนกลุ่มอื่น ๆ รวมเป็น 19 สายพันธุ์ ได้แก่ c11, A2/2, L53 1a3, S63 2a1, a10, a18, L1, L22 1a1, L24 1a1, L24 2a1, d35, A19/1, C13/1, c15/2, D3/1, D48/2, L21 1b3, L54 2b2 และ A51/2 ไปทำการศึกษาด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล เพื่อหาคำตอบที่สามารถยืนยันเชื้อดังกล่าว ทำการระบุชนิดด้วยวิธีการทางชีวโมเลกุลด้วยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA เทียบกับแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์มาตรฐานทั้งหมด ที่มีในฐานข้อมูลสาธารณะใน NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) โดยใช้ blast program และสร้าง phylogenetic tree (รูปที่ 3.) แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเชื้อตัวอย่างกับเชื้อแลคติกสายพันธุ์มาตรฐานทั้งหมด 49 สายพันธุ์ โดยกำหนดให้ *Pseudomonas resinovorans* LMG2274^T เป็น out group พบว่าเชื้อแลคติกจากกุ่มกลาดำฟอร์มกลุ่มกับเชื้อมาตรฐาน *Enterococcus thailandicus* จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ L22 1a1, L24 2a1, D48/2 และ C13/1 เป็นเชื้อ *Enterococcus sanguinicola* จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ D3/1, c15/2, L54 2b2 และ S63 2a1 เป็นเชื้อ *Enterococcus durans* จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ L53 1a3, L24 1a1, L1, และ L21 1b3 และเป็นเชื้อ *Enterococcus phoeniculicola* จำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ a10 และ A51/2 ทั้งนี้ มี 5 สายพันธุ์ ได้แก่ a18, A2/2, A19/1, c11 และ d35 ที่ได้ผลการ blast ให้ %identity สูงกว่า 97% กับเชื้อมาตรฐาน *Enterococcus* spp. แต่จาก phylogenetic tree (maximum likelihood) พบว่าเชื้อดังกล่าวไม่รวมกลุ่มกับทุกเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน ทั้ง 49 สายพันธุ์ ซึ่งเป็นเชื้อในสกุล *Lactococcus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pediococcus* spp. และ *Tetragenococcus* spp., ตารางที่ 22 แสดงผลการศึกษาที่ได้จากการเทียบเคียงเชื้อแบบเดิม และจากการวิเคราะห์ทางชีวโมเลกุลของเชื้อ 19 ตัว ซึ่งมีน้อยมากที่ให้ข้อมูลตรงกัน ซึ่งเป็นข้อพิสูจน์ที่บอกถึงความผิดพลาดที่เกิดขึ้นจากการศึกษาทางด้านกายภาพนั่นเอง อย่างไรก็ตามถึงแม้จะมีความขัดแย้งในผลการระบุชนิดโดยการใช้เทียบเคียงแบบเดิมและจากการวิเคราะห์ด้วยขบวนการทางชีวโมเลกุล แต่พบว่ามีผลการทดลองที่สนับสนุนกันในส่วน of เชื้อ a18 จากโครงสร้างของ dendrogram (รูปที่ 1) และจาก phylogenetic tree (รูปที่ 3) จะเห็นได้ว่าเชื้อ a18 เป็นเชื้อเดี่ยวที่ตรงกัน ที่ไม่รวมกลุ่มกับเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานและไม่รวมกลุ่มกับสมาชิกของแบคทีเรียแลคติกอื่น ๆ ที่แยกได้จากกุ่มกลาดำ ซึ่งผลที่ได้จากการเทียบเคียงของเชื้อสายพันธุ์ a18 คือ *Lactococcus lactis* spp. *lactis* แต่ผลจากการ blast ของข้อมูลทางชีวโมเลกุลคือ *Enterococcus thailandicus* ซึ่งเป็นข้อมูลที่น่าสนใจต่อไปว่าเชื้อสายพันธุ์นี้มีโอกาสเป็นเชื้อประจำถิ่นสายพันธุ์ใหม่ ในระบบทางเดินอาหารของกุ่มกลาดำ ที่ต้องทำการพิสูจน์ในระดับลึกต่อไป เช่น ทำการเปรียบเทียบค่า DNA relatedness



รูปที่ 3. Phylogenetic tree แบบ maximum likelihood ของ 16S rDNA ของแบคทีเรียแลคติกจากระบบทางเดินอาหารกิ้งกูดดำ และเชื้อมาตรฐานในสกุลแบคทีเรียแลคติก *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* และ *Tetragenococcus* โดยมี *Pseudomonas resinovorans* LMG2274^T เป็น out group T, type strain.

ตารางที่ 22. แสดงผลการศึกษาที่ได้จากการเทียบเคียงชนิด ผลการจัดกลุ่มแบบ Numerical classification และจากการวิเคราะห์ทางชีวโมเลกุลของเชื้อตัวอย่าง

Sample	Numerical grouping	Identification using text book	Phylogenetic tree/16SrDNA
a10	SMC	<i>L. lactis</i> spp. <i>lactis</i>	<i>E. phoeniculicola</i>
a18	SMC	<i>L. lactis</i> spp. <i>lactis</i>	SMC (blast = <i>E. thailandicus</i>)
A2/2	SMC	<i>E. faecium</i>	SMC (blast = <i>E. thailandicus</i>)
A51/2	SMC	<i>P. pentosaceus</i>	<i>E. phoeniculicola</i>
C11	SMC	<i>E. faecalis</i>	SMC (blast = <i>E. thailandicus</i>)
C13/1	SMC	<i>T. halophilus</i>	<i>E. thailandicus</i> (blast)
d35	SMC	<i>Leu. mesenteroides</i>	SMC (blast = <i>E. durans</i>)
D48/2	SMC	<i>T. halophilus</i>	<i>E. thailandicus</i>
L1	SMC	<i>L. lactis</i> spp. <i>lactis</i>	<i>E. durans</i>
L24_2a1	SMC	<i>L. lactis</i> spp. <i>lactis</i>	<i>E. thailandicus</i>
A23/1	Cluster 1	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i> (blast)
L22_1a1	Cluster 1	<i>L. lactis</i> spp. <i>lactis</i>	<i>E. thailandicus</i>
L24_1a1	Cluster 1	<i>L. lactis</i> spp. <i>lactis</i>	<i>E. durans</i>
L53_1a3	Cluster 1	<i>E. faecium</i>	<i>E. durans</i>
S63_2a1	Cluster 1	<i>E. faecium</i>	<i>E. sanguinicola</i>
A19/1	Cluster 2	<i>T. halophilus</i>	SMC (blast = <i>E. durans</i>)
D3/1	Cluster 2	<i>T. halophilus</i>	<i>E. sanguinicola</i>
C15/2	Cluster 3	<i>T. halophilus</i>	<i>E. sanguinicola</i>
L21_1b3	Cluster 3	<i>T. halophilus</i>	<i>E. durans</i>
L54_2b2	Cluster 3	<i>T. halophilus</i>	<i>E. sanguinicola</i>

ทั้งนี้จากรายงานของเชื้อมาตรฐาน *Enterococcus thailandicus* FP48-3^T (Tanasupawat *et al.*, 2008) พบว่าเชื้อดังกล่าวมีค่า sequence similarity มากกว่า 99% เมื่อเทียบกับเชื้อมาตรฐานของ *Enterococcus hirae* LMG 6399^T แต่จากการพิสูจน์ DNA relatedness สามารถยืนยันได้ว่าเชื้อทั้งสองเป็นเชื้อต่างสปีชีส์กัน เพราะมีค่า DNA relatedness ต่ำกว่า 14 % นั่นคือหากทำการพิสูจน์ a18 เป็นไปได้ว่าเชื้อดังกล่าวมีโอกาสเป็นเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่อาศัยในระบบทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำ

4. ทดสอบการยับยั้งของเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างกุ้งกุลาดำต่อเชื้อก่อโรคเรืองแสง *Vibrio harveyi*

จากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคเรืองแสง *Vibrio harveyi* ของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากกุ้งกุลาดำ ด้วยวิธีการต่าง ๆ ที่เหมาะสมกับชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ filamentous actinomycetes, *Bacillus* spp., *Vibrio* spp., แบคทีเรียแลคติก และ ยีสต์ พบว่าเชื้อทุกกลุ่มที่นำมาทำการทดสอบแสดงผลการยับยั้ง ยกเว้นยีสต์ที่ไม่แสดงผลการยับยั้งเชื้อก่อโรคเรืองแสง ดังแสดงในตารางที่ 23 และรูปที่ 4 แสดงการยับยั้งของเชื้อ *Vibrio alginolyticus* ต่อเชื้อ *V. harveyi* จากการทดสอบด้วยวิธี well diffusion

5. การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติก และยีสต์ที่เป็นประโยชน์ต่อการเจริญของกุ้งกุลาดำ

5.1 การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากระบบทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำ

จากการทดสอบแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากระบบทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำพบว่า ทุก ๆ สายพันธุ์มีลักษณะรวมที่เหมือนกันคือ ไม่เจริญที่ pH มีค่าต่ำกว่า 4 ไม่สามารถย่อยโปรตีน เจริญได้ในสภาวะที่มีและไม่มีอากาศ แต่มีเพียง 9 และ 19 สายพันธุ์ เท่านั้นที่สามารถย่อยแป้งและไขมันได้ตามลำดับ จากผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ของแบคทีเรียแลคติกที่สามารถย่อยแป้งได้ทั้ง 9 สายพันธุ์ พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น ที่ก่อโรคในสัตว์น้ำ และในคน รวมทั้งเชื้อจุลินทรีย์พื้นฐานที่ใช้ทดสอบการยับยั้งในห้องปฏิบัติ ได้ทั้ง 21 สายพันธุ์ ซึ่งเป็นข้อมูลสำคัญเพื่อนำแบคทีเรียแลคติกทั้ง 9 สายพันธุ์ ไปทดสอบการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

5.2 การคัดเลือกยีสต์ที่แยกได้จากระบบทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำ

จากการทดสอบยีสต์ 198 สายพันธุ์ที่แยกได้จากระบบทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำที่มีคุณลักษณะที่เป็นประโยชน์ต่อการเจริญของกุ้งกุลาดำ พบว่าได้เชื้อทั้งหมด 7 สายพันธุ์ที่ให้คุณสมบัติจากการคัดเลือกที่ดีที่สุด กล่าวคือสามารถเจริญได้ที่ pH 4-8 อุณหภูมิ 18-30 องศาเซลเซียส สามารถใช้เกลือในเตรต และย่อยโปรตีนได้ แต่ไม่สามารถย่อยแป้งและไขมันได้ จึงทำการทดลองการเลี้ยงกุ้งด้วยเชื้อทั้ง 7 สายพันธุ์ ที่มีคุณสมบัติดังกล่าว

ตารางที่ 23. ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคเรืองแสง (*V. harveyi*) ของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากระบบทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำ

Microorganisms	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนที่ให้ผลบวก	เปอร์เซ็นต์ที่ให้ผลบวก
Filamentous actinomycetes	54	38	70.3
Lactic acid bacteria	150	98	65.3
<i>Bacillus</i> spp.,	146	29	26.9
<i>Vibrio alginolyticus</i>	40	10	25
Yeast	76	0	0



รูปที่ 4. การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคเรืองแสง *V. harveyi* ด้วย *V. alginolyticus* H₂₄C' โดยวิธี well diffusion

6. การเจริญเติบโตของกึ่งกูลาดำที่ได้รับแบคทีเรียแลคติกและยีสต์จากกึ่งกูลาดำ

6.1 เลี้ยงกึ่งด้วยอาหารที่ผสมแบคทีเรียแลคติก

จากการเลี้ยงกึ่งด้วยอาหารเม็ดสำเร็จรูป ที่ผสมแบคทีเรียแลคติกจำนวน 9 สายพันธุ์ (9 ชุดการทดลอง และชุดควบคุมที่ใช้อาหารเม็ดสำเร็จรูปที่ไม่ผสมแบคทีเรียแลคติก) เป็นเวลา 30 วัน พบว่ากลุ่มทดลองที่ 5 มีน้ำหนักเฉลี่ยของกึ่งกูลาดำสูงสุด โดยให้ค่าต่ำสุดในชุดควบคุม แต่พบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) และพบว่าในกลุ่มทดลองที่ 2 และ 7 กึ่งมีอัตราการรอดตาย 100% รองลงมาคือ กลุ่มทดลองที่ 8 มีอัตราการรอดตาย 96.67% สำหรับกลุ่มอื่นๆ และชุดควบคุมมีอัตราการรอดตายใกล้เคียงกัน แต่พบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) จากการวิเคราะห์อัตราการเจริญเติบโตของกึ่งกูลาดำต่อวัน พบว่ากลุ่มทดลองที่ 5 มีอัตราการเจริญต่อวันสูงสุดคือ 4.66 สำหรับกลุ่มอื่นมีค่าใกล้เคียงกัน ยกเว้นในชุดควบคุมที่ไม่ได้รับแบคทีเรียแลคติก มีอัตราการเจริญต่อวันต่ำที่สุดคือ 3.14 แต่อย่างไรก็ตามเมื่อ นำข้อมูลไปวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าอัตราการเจริญต่อวันของกึ่งกูลาดำทั้ง 10 ชุดการทดลองไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) จากการทดสอบความต้านทานต่อการเกิดโรคจากเชื้อ *V. harveyi* เป็นเวลา 7 วัน พบว่ามีอัตราการรอด 100% อยู่ 4 กลุ่มทดลองคือกลุ่มทดลองที่ 2, 6, 7 และ 8 ส่วนชุดควบคุมมีอัตราการรอดเพียง 50% จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าอัตราการรอดตายของทั้ง 9 ชุดการทดลองแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับชุดควบคุม ($P < 0.05$)

จากการทดลองใช้แบคทีเรียแลคติกผสมในอาหารเลี้ยงกึ่งกูลาดำในครั้งนี้สรุปได้ว่ากลุ่มที่ให้ผลอัตราการรอดตายหลังจากการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคโดย *V. harveyi* 100% มีคุณสมบัติเด่นกว่าแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์อื่น ๆ นั่นคือกลุ่มทดลองที่ 2, 6, 7 และ 8 จากผลการเทียบเคียงชนิดของแบคทีเรียแลคติกโดยการหาลำดับของ 16S rDNA พบว่า ในกลุ่มทดลองที่ 2 เป็นเชื้อ *Leuconostoc fallax* (99% identity) ในกลุ่มทดลองที่ 6 เป็นเชื้อ *Enterococcus faecium* (100% identity) ในกลุ่มทดลองที่ 7 เป็นเชื้อ *E. faecium* (100% identity) สุดท้ายในกลุ่มทดลองที่ 8 เป็นเชื้อ *Lactobacillus fermentum* (100% identity)

6.2 เลี้ยงกึ่งด้วยอาหารที่ผสมยีสต์

จากการเลี้ยงกึ่งด้วยอาหารที่ผสมยีสต์ จำนวน 7 สายพันธุ์ (7 ชุดการทดลอง และชุดควบคุมที่ใช้อาหารเม็ดสำเร็จรูปที่ไม่ผสมยีสต์) เป็นเวลา 30 วัน จากผลการทดลองพบว่า กลุ่มทดลองที่มีอัตราการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักเฉลี่ยสูงสุด 3 อันดับแรกคือ กลุ่มทดลองที่ 3, 2 และ 4 โดยมีน้ำหนักเพิ่มขึ้น 12.53, 11.59 และ 10.24 กรัม ตามลำดับ ขณะที่ชุดควบคุมมีน้ำหนักเพิ่มขึ้น 7.37 กรัมเมื่อทดสอบทางสถิติพบว่าเฉพาะกลุ่มทดลองที่ 3 เท่านั้นที่มีความแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) พบว่ากึ่งที่มีอัตราการรอดตาย 100% ในกลุ่มทดลองที่ 1, 3 และ 4 ขณะที่ชุดควบคุมมี

อัตราการรอดตาย $86.89 \pm 0.55\%$ จากการคำนวณอัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ของกุ้งกุลาดำต่อวัน พบว่ากลุ่มทดลองที่ 3 มีอัตราการเจริญต่อวันสูงที่สุด คือ 4.40 ± 0.49 สำหรับกลุ่มอื่น ๆ มีอัตราใกล้เคียงกัน ส่วนชุดควบคุมมีอัตราการเจริญต่อวัน 3.86 ± 0.11 ซึ่งทั้ง 7 กลุ่ม ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) กับชุดควบคุม จากการตรวจนับเชื้อยีสต์และ *Vibrio* spp. ในระบบทางเดินอาหารกุ้งกุลาดำ พบปริมาณเชื้อยีสต์มากที่สุด 2.57×10^5 CFU/ml ในกลุ่มทดลองที่ 2 ในขณะที่ชุดควบคุมมีปริมาณเชื้อน้อยที่สุดคือ 9.3×10^3 CFU/ml ส่วนเชื้อ *Vibrio* spp. พบมากที่สุด 4.55×10^5 CFU/g ในกลุ่มทดลองที่ 7 และในชุดควบคุมพบน้อยที่สุดคือ 1.05×10^4 CFU/g จากการทดสอบความต้านทานการเกิดโรคจาก *V. harveyi* (pathogen challenge test) เป็นเวลา 7 วัน พบว่ากลุ่มการทดลองที่ 3, 4 และ 5 มีอัตราการรอด 100% ส่วนชุดควบคุมมีอัตราการรอดตายน้อยที่สุดคือ $28.57 \pm 0.29\%$ ทั้งนี้พบว่ากลุ่มที่เลี้ยงด้วยยีสต์ทั้ง 7 กลุ่ม มีอัตราการรอดตายที่แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) จากการตรวจสอบกุ้งที่ตายทั้งลักษณะ ภายนอกและจากการผ่าตัดระบบทางเดินอาหารเพื่อตรวจสอบเชื้อ *V. harveyi* สามารถยืนยันได้ว่ากุ้งกุลาดำที่เลี้ยงตายด้วยเชื้อ *V. harveyi* ที่ได้เหนี่ยวนำให้เกิดโรคเรืองแสง

ผลการนับปริมาณเม็ดเลือดรวมเฉลี่ยของกุ้งกุลาดำที่กินอาหารทั้ง 7 กลุ่ม และชุดควบคุม (กลุ่มการทดลองละ 3 ตัวทั้งหมด 24 ตัว) พบว่ากลุ่มทดลองที่ 6, 5 และ 3 มีปริมาณเม็ดเลือดรวมเฉลี่ยสูงสุด $5.03 \times 10^7 \pm 3.39 \times 10^7$, $4.93 \times 10^7 \pm 1.91 \times 10^7$ และ $4.37 \times 10^7 \pm 1.36 \times 10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนชุดควบคุมให้ปริมาณเม็ดเลือดรวมเฉลี่ยน้อยที่สุด คือ $2.45 \times 10^7 \pm 2.12 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร แต่จากการวิเคราะห์พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสของกุ้งกุลาดำทั้ง 7 กลุ่ม และชุดควบคุม (กลุ่มการทดลองละ 3 ตัว กุ้งตัวอย่างทั้งหมด 24 ตัว) พบว่ากลุ่มทดลองที่ 3 และ 1 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสมากที่สุด คือ 305.84 ± 123.44 และ 106.16 ± 82.50 unit/min/mg protein ตามลำดับ ขณะที่ชุดควบคุมมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส เท่ากับ 135.74 ± 69.66 unit/min/mg protein ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่ากลุ่มทดลองที่ 3 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสสูงกว่าทุกชุดการทดลองอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

จากการวิเคราะห์หาความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียในเลือดของกุ้งกุลาดำทั้ง 7 กลุ่มทดลอง และชุดควบคุม (กลุ่มการทดลองละ 3 ตัวทั้งหมด 24 ตัว) เมื่อฉีดสารละลายเชื้อ *V. harveyi* ที่มีความเข้มข้น 3×10^7 CFU/ml ให้กับกุ้งทดลองตัวละ 0.1 มิลลิลิตร เมื่อครบ 3 ชั่วโมง จึงดูดเลือดกุ้ง 100 ไมโครลิตร เพื่อนำไปนับเชื้อ *V. harveyi* ที่เหลืออยู่ในเลือดกุ้ง พบว่ากลุ่มทดลองที่ 1 มีการกำจัดแบคทีเรียในน้ำเลือดได้มากโดยมีแบคทีเรียเหลือในน้ำเลือด 1.33×10^2 CFU/ml ส่วนกลุ่มทดลองที่ 7 เป็นชุดที่มีการกำจัดแบคทีเรียในเลือดได้น้อยที่สุด โดยมีแบคทีเรียเหลือในเลือด 3.8×10^3 CFU/ml โดยที่ในชุดควบคุมมีปริมาณแบคทีเรียเหลือในน้ำเลือด 1.5×10^3 CFU/ml เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทาง

สถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ในทุกชุดการทดลอง จากผลการทดลองเลี้ยง กุ้งกุลาดำโดยผสมยีสต์ที่คัดเลือกได้จากระบบทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำจำนวน 7 สายพันธุ์ พบว่า กลุ่มทดลองที่ 3 ให้ผลการทดลองที่ส่งเสริมการเจริญของกุ้งสูงสุดกล่าวคือให้กุ้งกุลาดำที่มีน้ำหนักเฉลี่ย เพิ่มขึ้นสูงสุด และเป็นชุดการทดลองที่กุ้งกุลาดำมีอัตราการรอดตาย 100% และมีเปอร์เซ็นต์การเจริญ สัมพันธ์สูงสุด นอกจากนี้เมื่อทดสอบกับเชื้อก่อโรคเรืองแสง (*V. harveyi*) แล้วให้อัตราการรอดตาย 100% และให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสสูงที่สุด จึงมีความเหมาะสมที่จะนำยีสต์จากกลุ่ม ทดลองที่ 3 นี้ไปพัฒนาเพื่อให้เป็นผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกเพื่อนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำให้ได้ ผลผลิตสูงต่อไป

จากการศึกษาลักษณะของเชื้อยีสต์จากกลุ่มทดลองที่ 3 บนอาหาร YA มีโคโลนีเรียบ สีครีม แดก หน่อแบบโพลาร์ ไตกล้องจุลทรรศน์เซลล์มีรูปร่างคล้ายรูปมะนาว สามารถหมัก น้ำตาลกลูโคส กาแลคโตส และซูโครส แต่ไม่หมักน้ำตาลมอลโตส และแลคโตส เชื้อดังกล่าวสามารถใช้น้ำตาลกลูโคส กาแลคโตส ซูโครส มอลโตส และแลคโตส แต่สามารถใช้น้ำไฮไลสได้ เล็กน้อย นอกจากนี้ยังสามารถใช้ยิวเรีย จากผลการเทียบเคียงชนิดโดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 5.8S rDNA และ internal transcribed spacer 1 และ 2 (ITS1 & ITS2) สายพันธุ์ดังกล่าวมีความคล้ายคลึงกับ *Candida parapsilosis* (100% identity)

อย่างไรก็ตามมีรายงานการเป็นเชื้อฉวยโอกาสของ *C. parapsilosis* ในผู้ที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ (Trofa *et al.*, 2008) ดังนั้นต้องทำการพิสูจน์ความปลอดภัยก่อนนำเชื้อดังกล่าวไปใช้จริงในภาคสนาม

บทวิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาจุลินทรีย์กลุ่มที่เจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อจากระบบทางเดินอาหารของกิ้งกูดดำ รวมทั้งดับในครั้งนี้ได้รับข้อมูลที่น่าสนใจและเป็นประโยชน์อย่างยิ่งที่นำไปสู่การศึกษาจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ต่อการเลี้ยงกิ้งกูดดำของเกษตรกรให้ยั่งยืนต่อไป ซึ่งข้อมูลเบื้องต้นคือการเปรียบเทียบความแตกต่างในเชิงปริมาณของแบคทีเรียทั้งหมด (total plate count) ระหว่างกิ้งกูดติดเชื้อแบคทีเรีย ไวรัส และ กุ้งปกติ พบว่าแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยพบว่ากิ้งกูดที่ติดเชื้อไวรัสมีปริมาณสูงสุด คือ $9.01 \pm 0.45 \log_{10} \text{ cfu/g}$ เมื่อเทียบกับกิ้งกูดดำที่ติดเชื้อแบคทีเรีย และกุ้งปกติซึ่งมีปริมาณ 8.80 ± 0.30 , $8.44 \pm 0.32 \log_{10} \text{ cfu/g}$ นั่นคือปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในระบบทางเดินอาหารของกิ้งกูดดำไม่สามารถเป็นข้อมูลบ่งบอกได้ว่ากุ้งมีสุขภาพแข็งแรงหรือมีการติดเชื้อจากแบคทีเรียหรือไวรัส

ข้อมูลจากปริมาณแบคทีเรียในแต่ละส่วนของระบบทางเดินอาหารของกิ้งกูดดำรวมทั้งดับพบว่า มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดสูงสุดในส่วนซีกัมเหมือนกันในกุ้งทั้งสองกลุ่ม คือมีปริมาณ 8.09 ± 0.54 และ $7.86 \pm 0.72 \log_{10} \text{ cfu/g}$ ในกุ้งป่วย (วิเคราะห์รวมระหว่างกิ้งกูดติดเชื้อแบคทีเรียและไวรัส) และกุ้งปกติ ตามลำดับ รองลงไปคือ ลำไส้ส่วนต้น ลำไส้ส่วนปลาย ปาก-กระเพาะ และตับ และพบว่าเมื่อยกเว้นส่วนปาก-กระเพาะของกุ้งปกติแล้วปริมาณเชื้อในตับมีปริมาณต่ำกว่าส่วนอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

เช่นเดียวกับข้อมูลของเชื้อไวรัสทั้งหมดที่เจริญบนอาหาร TCBS โดยรวมจากทุกส่วนของระบบทางเดินอาหารของกิ้งกูดดำ พบว่าแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ระหว่างกิ้งกูดติดเชื้อไวรัสซึ่งมีปริมาณสูงสุด คือ $6.86 \pm 0.06 \log_{10} \text{ cfu/g}$ ส่วนกุ้งปกติ และกิ้งกูดติดเชื้อแบคทีเรียมีปริมาณ 6.36 ± 0.95 , $6.15 \pm 0.37 \log_{10} \text{ cfu/g}$ ตามลำดับ นั่นคือปริมาณเชื้อไวรัสทั้งหมดไม่สามารถบ่งบอกได้ว่ากุ้งมีสุขภาพแข็งแรงหรือมีการติดเชื้อจากแบคทีเรียหรือไวรัส

เมื่อเปรียบเทียบเชื้อไวรัสเฉพาะแต่ละส่วนของระบบทางเดินอาหารระหว่างกุ้งปกติและกิ้งกูดติดเชื้อ พบว่าแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบมากที่สุดในส่วนซีกัมและพบน้อยที่สุดในตับของทั้งกุ้งปกติและกิ้งกูดติดเชื้อ มีเพียงส่วนปากถึงกระเพาะเท่านั้นที่พบว่าในกิ้งกูดติดเชื้อมีค่ามากกว่าในกุ้งปกติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยกิ้งกูดติดเชื้อ มีค่า $5.14 \pm 0.78 \log_{10} \text{ cfu/g}$ ส่วนกุ้งปกติมีค่า $4.34 \pm 0.95 \log_{10} \text{ cfu/g}$ ซึ่งข้อมูลนี้ต้องการการพิสูจน์ยืนยันต่อไป ทั้งนี้อาจเกี่ยวข้องกับสภาวะในกระเพาะอาหารของกุ้งสุขภาพดี ไม่เอื้ออำนวยต่อการมีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ทั่วไป แต่เมื่อกุ้งอ่อนแอจากการติดเชื้อจึงทำให้ตรวจพบเชื้อแบคทีเรียได้ในปริมาณที่สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

จากวิธีการ และอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ที่เลือกใช้ในการศึกษารังนี้พบ แบคทีเรีย 8 ชนิด คือ *Bacillus* spp., *Corynebacterium* spp., *Enterobacter* spp., *E. coli*, *Flavobacterium* spp.,

Micrococcus spp., *Staphylococcus* spp. และ *Vibrio* spp. พบเชื้อสูงสุด 3 อันดับแรกคือ *Micrococcus* spp., *Corynebacterium* spp. และ *Staphylococcus* spp. และมีมากกว่าเชื้อชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญเฉพาะในกึ่งติดเชื้อไวรัส และกึ่งปกติ ส่วนกึ่งที่ติดเชื้อแบคทีเรียปริมาณของเชื้อทั้งสามแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับเชื้ออื่น ๆ แต่เมื่อแยกส่วนของระบบทางเดินอาหารพบว่าในกึ่งสุขภาพดี เชื้อมีปริมาณสูงในส่วนของลำไส้ส่วนต้น ลำไส้ส่วนปลาย และซีกัม เชื้อ 3 อันดับแรกได้แก่ *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus* spp. และ *Vibrio* spp. มีปริมาณสูงกว่าส่วนปาก-กระเพาะ และตัวอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่นที่ 95% ส่วน *Micrococcus* spp. ในลำไส้ส่วนต้น เท่านั้นที่มีปริมาณมากกว่าส่วนอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่นที่ 95% บทบาทของเชื้อ normal flora เหล่านี้ในระบบทางเดินอาหารเป็นสิ่งที่น่าสนใจอย่างยิ่ง เพราะมีในปริมาณที่สูงมากคือ 7- 8 log₁₀ cfu/g จากการที่พบเชื้อ *E. coli* ซึ่งเป็นเชื้อ normal flora ของสัตว์เลื้อยคลาน แสดงให้เห็นถึงการปนเปื้อนของระบบการเลี้ยง

พบว่า *Vibrio* spp. ที่ขึ้นบนอาหาร TCBS ของกึ่งปกติ และกึ่งเป็นโรค มี 15 สปีชีส์ คือ *V. alginolyticus*, *V. cambellii*, *V. carchariae*, *V. cincinnatiensis*, *V. damsela*, *V. harveyi*, *V. logei*, *V. marinus*, *V. mediteranei*, *V. mimicus*, *V. natriegens*, *V. orientalis*, *V. pelagius* I, *V. pelagius* II และ *V. vulnificus* B₂ โดยจำนวนสปีชีส์แตกต่างกันไปตามส่วนต่าง ๆ และชนิดของกึ่ง ชนิดที่พบค่อนข้างสูงในกึ่งทั้ง 3 กลุ่มคือ *V. cincinnatiensis*, *V. vulnificus* B₂ และ *V. carchariae* ส่วนเชื้อที่พบในปริมาณน้อย 3 อันดับหลังในกึ่งทั้ง 3 กลุ่ม คือ *V. logei*, *V. orientalis* และ *V. damsela*

จากการเปรียบเทียบชนิดและปริมาณของเชื้อที่พบในกึ่งทั้ง 3 กลุ่มพบข้อมูลที่น่าสนใจมาก กล่าวคือข้อมูลที่ตรงข้ามกันของเชื้อ *V. mediteranei* และ *V. harveyi* โดยพบเชื้อ *V. mediteranei* ในกึ่งปกติในปริมาณที่สูง ($4.57 \pm 1.79 \log_{10} \text{cfu/g}$) เมื่อเทียบกับกึ่งติดเชื้อแบคทีเรีย ($2.72 \pm 3.85 \log_{10} \text{cfu/g}$) และไม่พบเชื้อชนิดนี้เลยในกึ่งเป็นโรคติดเชื้อจากไวรัส และพบว่าสามารถพบเชื้อชนิดนี้ในปริมาณที่สม่ำเสมอในทุกส่วนของระบบทางเดินอาหารรวมทั้งตับกึ่ง ส่วนในกึ่งเป็นโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียนั้นพบเฉพาะส่วนปาก-กระเพาะ และตับเท่านั้น ในขณะที่ไม่พบเชื้อ *V. harveyi* (ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของโรคเรืองแสง) ในกึ่งปกติ แต่พบในปริมาณมากและสม่ำเสมอในกึ่งที่ป่วยติดเชื้อจากแบคทีเรีย ซึ่งพบในปริมาณ $4.66 \pm 0.94 \log_{10} \text{cfu/g}$ และพบเล็กน้อยในกึ่งป่วยติดเชื้อจากเชื้อไวรัส $1.83 \pm 1.86 \log_{10} \text{cfu/g}$ และตรวจพบเฉพาะในส่วนของตับและลำไส้ส่วนต้น

ข้อมูลของเชื้อกลุ่มวิบริโอที่ได้นี้นับว่าเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการใช้เป็นข้อมูลประกอบเพื่อบ่งชี้ว่ากึ่งมีสุขภาพดีหรือเป็นโรคติดเชื้อ หรือกึ่งเป็นโรคติดเชื้อที่เกิดจาก *V. harveyi* ส่วนข้อมูลของ *V. mediteranei* ที่ได้นี้มีคุณค่าอย่างยิ่งที่ควรทำการศึกษาต่อไปในระดับลึกถึงบทบาทความสำคัญของเชื้อชนิดนี้ต่อการมีชีวิตรอดของกึ่งกุลาดำ และต่อสัตว์น้ำชนิดอื่น ๆ มีรายงานสนับสนุนข้อมูลที่ค้นพบในครั้งนี้เกี่ยวกับเชื้อ *V. mediterranei* ว่าเป็นสายพันธุ์ที่คุ้นเคยในการที่จะสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นเชื้อ

โปรไบโอติกในการเลี้ยงสัตว์น้ำได้ เช่นมีความสามารถในการสร้างสารประเภท polypeptides ยับยั้งเชื้อก่อโรค *V. parahaemolyticus* และ *V. mediterranei* (Carraturo et al., 2006) รวมทั้งมีรายงานการใช้เชื้อชนิดนี้ในปลา turbot พบว่าสามารถลดการเกาะกลุ่มของเชื้อฉวยโอกาสในระบบทางเดินอาหารของปลาได้ (Huys et al., 2001)

ส่วนเชื้อไวรัสสายพันธุ์อื่น ที่มีรายงานว่ามิประโยชน์ต่อการเลี้ยงสัตว์น้ำ เช่น *V. alginolyticus* รายงานของ Gomez-Gil et al., 2000 ที่ใช้เชื้อชนิดนี้ในการฟักตัวอ่อนของลูกกุ้งขาว (*Penaeus vannamei*) พบว่าลูกกุ้งมีอัตราการรอดตาย 90.1% สูงกว่าการใช้สารปฏิชีวนะซึ่งรอดตายเพียง 83.8% อย่างไรก็ตาม มีรายงานการตรวจพบคุณสมบัติหลายประการของเชื้อ *V. alginolyticus* ในการที่สามารถเป็นเชื้อก่อโรค (Balebona et al., 1998, Jayaprakash, et al., 2006) เช่น การพบ virulence pathogenicity island และ virulence genes (*toxR*, *toxS*, *VPI* และ *ace*) ชนิดเดียวกับ genes ของเชื้อ *V. cholera* (Kahla-Nakbi et al., 2009)

จากการศึกษาทางอนุกรมวิธานของแบคทีเรียแลคติกจากระบบทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำ จำนวน 78 สายพันธุ์ โดยใช้ 3 วิธีการมาตรฐานที่ได้รับการยอมรับ กล่าวคือโดยการเทียบเคียงกับแบคทีเรียแลคติกที่รวบรวมใน Wood and Holzapfel (1995) การศึกษาด้วยวิธีการทาง numerical taxonomy และจากการสร้าง phylogenetic tree จากลำดับของ 16S rDNA พบว่ามีความหลากหลายในผลการศึกษาอย่างชัดเจน ซึ่งถ้าให้ผลของลำดับของ 16S rDNA เป็นวิธีการที่น่าเชื่อถือสูงสุดระหว่าง 3 วิธีการแล้ว สรุปได้ว่าเชื้อแบคทีเรียแลคติกจากระบบทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำส่วนใหญ่ เป็นเชื้อในจีนัส *Enterococcus* spp. ได้แก่ *E. thailandicus*, *E. sanguinicola*, *E. durans* และเป็นเชื้อ *E. phoeniculicola* และมี 5 สายพันธุ์ ได้แก่ a18, A2/2, A19/1, c11 และ d35 ที่ไม่รวมกลุ่มกับเชื้อมาตรฐาน *Enterococcus* sp. ใด ๆ ที่มีปรากฏในปัจจุบัน จากผลการศึกษาในครั้งนี้สามารถยืนยันได้ถึง ความยากลำบากในการศึกษาเชื้อกลุ่มนี้มาก นอกจากอาจจะเกิดข้อผิดพลาดในเรื่องการทดสอบแล้วยังมี ในส่วนของ morphology ซึ่งเกิดความผิดพลาดในการตัดสินใจที่ไม่ถูกต้องในส่วนของการจัดเรียงตัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เช่น การจัดเรียงตัวแบบ 4 เซลล์ติดกันของเซลล์รูปร่างกลมควรพบใน *Pediococcus* และ *Tetragenococcus* แต่ลักษณะดังกล่าวไม่ใช่ลักษณะของเชื้อ *Enterococcus* ซึ่งเชื้อในกลุ่มนี้ควร เชื้อเดี่ยว ๆ เป็นคู่ หรือต่อกันเป็นสายสั้น ๆ และภายในสายเซลล์มักจะอยู่กันเป็นคู่และยาวไปในทิศทางของเส้นสายนั้น ๆ อย่างไรก็ตามในส่วนของการจัดเรียงตัวนั้นมีโอกาสสูงที่สามารถทำให้เข้าใจผิดคิดว่าเป็นเชื้อในจีนัส *Enterococcus* เพราะเชื้อ *Leuconostoc* มีรูปร่างเปลี่ยนแปลงไปตามสภาวะของการเจริญ เช่นหากเลี้ยงในอาหารแข็งหรืออาหารที่มีกลูโคสจะมีลักษณะผอมยาวที่ใกล้เคียงกับเชื้อ lactobacilli ซึ่งทำให้เข้าใจว่าเชื่อดังกล่าวเป็นเชื้อรูปแท่ง ส่วนการจัดเรียงตัวมีทั้งที่เป็นเชื้อเดี่ยว คู่ และเป็นสายสั้น และสายยาวปานกลาง (Wood and Holzapfel, 1995) ไม่มีรายงานยืนยันมาก่อนว่า

แบคทีเรียแลคติกที่ได้อาศัยในระบบทางเดินอาหารของกุ้งมีรูปร่าง การจัดเรียงตัวที่แตกต่างไปจาก แบคทีเรียแลคติกทั่วไป

จากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคเรืองแสง *Vibrio harveyi* ที่แยกได้จากกุ้งกุลาดำที่เป็นโรค ของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากกุ้งกุลาดำจำนวน 5 กลุ่ม ได้แก่ filamentous actinomycetes, *Bacillus* spp., *V. alginolyticus*, lactic acid bacteria และ yeast พบว่านอกจากยีสต์แล้วเชื้อทุกกลุ่มสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคเรืองแสงในกุ้งกุลาดำได้ และ filamentous actinomycetes มีจำนวนเชื้อที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุด (70.3%) รองลงมาคือแบคทีเรียแลคติก (65.3%) ส่วน เชื้อ *Bacillus* และ *V. alginolyticus* ให้จำนวนเชื้อที่สามารถสร้างสารยับยั้งพอ ๆ กันคือ 26.9 และ 25% ตามลำดับ ซึ่งข้อมูลนี้แสดงให้เห็นว่าในธรรมชาติจุลินทรีย์ทั้งสองฝ่ายอยู่ร่วมกันและน่าจะมีการควบคุมกันเองเพื่อให้สัตว์เจ้าเรือนมีชีวิตรอดอยู่ได้ มีรายงานการใช้ *Bacillus* S11 ที่แยกได้จากกุ้งกุลาดำ เป็น จุลินทรีย์โปรไบโอติกส์ผสมในอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (Rengpipat *et al.*, 1998) ซึ่งพบว่ากุ้งกุลาดำมีอัตราการรอดตาย 100% จากเชื้อก่อโรคเรืองแสง (*V. harveyi*) ขณะที่ชุดควบคุมมีอัตราการรอดตายเพียง 26% เชื้อดังกล่าวต่อมาภายหลังได้ทำการระบุชนิดพบว่า เป็น *Bacillus subtilis* S11 (Powdchagun *et al.*, 2011) และมีรายงานการใช้เชื้อ *V. alginolyticus* ในการฟักตัวอ่อนของลูกกุ้งขาว (*Penaeus vannamei*) พบว่าลูกกุ้งมีอัตราการรอดตาย 90.1% สูงกว่าการใช้สารปฏิชีวนะซึ่งรอดตายเพียง 83.8% (Gomez-Gil *et al.*, 2000) นอกจากนี้พบว่า *V. alginolyticus* ที่ได้จากการฟาร์มกุ้งสามารถยับยั้งเชื้อที่ก่อให้เกิดโรค salmonids ได้แก่ *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* และ *Vibrio ordalii* ได้ (Austin *et al.*, 1995) Garriques and Wyban (1993) ตั้งข้อสังเกตว่า *V. alginolyticus* ที่สามารถหมักน้ำตาลซูโครสได้ถือว่าเป็น “good vibrio” และ Lightner (1993) ได้ใช้น้ำตาลทรายใส่ลงในบ่อเลี้ยงกุ้ง 3 กิโลกรัมต่อไร่ เพื่อเพิ่มจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มที่สามารถใช้น้ำตาลทรายทำให้แบคทีเรียกลุ่มที่ไม่สามารถใช้น้ำตาลทราย เช่น *V. parahaemolyticus* และ *V. harveyi* เจริญได้น้อยลง

จากการทดสอบการเลี้ยงกุ้งกุลาดำด้วยอาหารที่ผสมเชื้อที่แยกได้จากระบบทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำและผ่านการคัดเลือกแล้วว่าเป็นเชื้อที่มีคุณสมบัติดีที่สุดได้แก่ แบคทีเรียแลคติก 9 สายพันธุ์ และ ยีสต์ 7 สายพันธุ์ พบว่ามีแบคทีเรียแลคติก 3 สายพันธุ์ ที่กุ้งมีอัตราการรอดตาย 100% หลังจากเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วยเชื้อก่อโรคเรืองแสง (*V. harveyi*) คือ *Leuconostoc fallax*, *Enterococcus faecium*, และ *Lactobacillus fermentum* ส่วนยีสต์จำนวน 1 สายพันธุ์ คือ *Candida parapsilosis* ที่ส่งเสริมการเจริญของกุ้งดีที่สุดกล่าวคือให้กุ้งกุลาดำที่มีน้ำหนักเฉลี่ยเพิ่มขึ้นสูงสุด มีอัตราการรอดตาย 100% มีเปอร์เซ็นต์การเจริญสัมพัทธ์สูงสุด และมีอัตราการรอดตาย 100% หลังจากทดสอบกับเชื้อก่อโรคเรืองแสง มี Avella *et al.* (2011) และ Wang *et al.* (2008) ได้รายงานการใช้ *Enterococcus faecium* เป็นจุลินทรีย์โปรไบโอติกส์ในการเลี้ยงปลา tilapia (*Oreochromis niloticus*) และ ปลา common sole (*Solea solea*) ตามลำดับ Balcázar *et al.* (2008) พบว่า *Lactobacillus fermentum* CLFP 242 ที่แยกได้จากลำไส้ของ

ปลา rainbow trout สามารถลดการเกาะติดเยื่อเมือกในลำไส้ของปลาของเชื้อก่อโรคปลา 3 ชนิดได้แก่ *Aeromonas hydrophila*, *A. salmonicida* และ *Yersinia ruckeri* ส่วนแบคทีเรียแลคติกชนิดอื่นที่มีการนำมาใช้เป็นโปรไบโอติก เช่น มีรายงานการใช้ แบคทีเรียแลคติก *Pediococcus acidilactici* ในฟาร์มกุ้ง (*Litopenaeus stylirostris*) ที่ New Caledonia พบว่าสามารถลดการตายของกุ้งเนื่องจาก vibriosis ได้ถึง 15% (Castex et al., 2008)

จากผลการศึกษาในครั้งนี้ได้ข้อมูลที่มีคุณค่าหลายประการที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นแนวทางในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำอย่างยั่งยืนได้ เพราะข้อมูลที่ได้สามารถยืนยันได้ว่าระบบทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำมีเชื้อจุลินทรีย์ประจำถิ่นจำนวนมากหลายชนิดอาศัยอยู่ร่วมกัน มีทั้งกลุ่มที่เป็นเชื้อก่อโรคในกุ้งและเชื้อที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรค ซึ่งเมื่อเพิ่มจำนวนเชื้อกลุ่มหลังนี้ เช่น เชื้อแบคทีเรียแลคติกผสมในอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำพบว่าได้ผลดีตรงความคาดหวังคือกุ้งสามารถมีชีวิตรอดเพิ่มขึ้นหลังจากที่ฉีดเชื้อก่อโรคเข้าไปได้ นอกจากนี้ระบบทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำยังประกอบด้วยกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นกลาง ๆ ที่ไม่ได้ก่อโรคและไม่ได้แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคแต่ประการใด เช่น ยีสต์ เป็นต้น และจากการคัดเลือกและเพิ่มจำนวนเพื่อผสมในอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำพบว่ายีสต์ที่คัดเลือกได้สามารถส่งเสริมการเจริญของกุ้ง และการศึกษาในครั้งนี้มีข้อมูลยืนยันชัดเจนว่ากุ้งที่ได้รับยีสต์มีการสร้างระบบภูมิคุ้มกันเพิ่มมากขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับชุดควบคุม และนั่นคือทำให้กุ้งมีชีวิตรอดจากการรุกรานของเชื้อก่อโรคได้ถึง 100%

ดังที่กล่าวมาชี้ให้เห็นได้ว่าในสภาพที่เป็นปกติตามธรรมชาติกุ้งมีจุลินทรีย์ที่อยู่ในระบบทางเดินอาหารที่อยู่กันอย่างสมดุล กุ้งจึงเจริญและมีชีวิตรอดอยู่ได้อย่างปกติ แต่อย่างไรก็ตามยังต้องเสี่ยงต่อการเปลี่ยนแปลงใด ๆ ที่อาจเกิดขึ้นที่ทำให้เสียสมดุลของกลุ่มจุลินทรีย์เหล่านี้ได้ ที่อาจทำให้เชื้อก่อโรคเพิ่มปริมาณสูงขึ้น หรือทำให้กุ้งอ่อนแอและง่ายต่อการติดโรค ดังนั้นการใช้จุลินทรีย์ชนิดที่เป็นประโยชน์ทั้งสองกลุ่มเสริมลงในอาหารเลี้ยงกุ้งในปริมาณที่มากพอในการเลี้ยงปกติเป็นประจำคาดว่าจะสามารถลดความเสี่ยงดังกล่าวได้ และจากผลการศึกษาในครั้งนี้นอกจากการมีชีวิตรอดของกุ้งแล้วเชื้อจุลินทรีย์ยังช่วยให้กุ้งมีน้ำหนักเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนซึ่งเป็นเหตุผลที่สำคัญยิ่งต่อการส่งเสริมให้มีการใช้จริงต่อไป

อย่างไรก็ตามในแง่การนำกุ้งกุลาดำไปใช้ในการบริโภค จุลินทรีย์กลุ่มที่เป็นประโยชน์ต่อกุ้งกุลาดำอาจเป็นสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อการติดเชื้อได้ เช่นมีรายงานการเป็นเชื้อก่อโรคในคนของเชื้อแบคทีเรีย *V. alginolyticus* และ เชื้อยีสต์ *C. parapsilosis* ที่มีรายงานการเป็นเชื้อฉวยโอกาสในผู้ที่มิภูมิคุ้มกันต่ำ (Trofa et al., 2008) ดังนั้นต้องทำการพิสูจน์ความปลอดภัยของเชื้อก่อนนำเชื้อใด ๆ ไปส่งเสริมให้เกษตรกรนำไปใช้จริงต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- กิจการ สุภมาตย์, อุษณีย์ เอกปณิธานพงศ์, Toshiaki Itami และจิราพร เกษรจันทร์. 2543. ระบบภูมิคุ้มกันในโรคกุ้งกุลาดำ : I. เทคนิคในการศึกษาภูมิคุ้มกันโรคและองค์ประกอบเลือดในกุ้งกุลาดำ. ว. สงขลานครินทร์ วทท. 22 (ฉบับพิเศษ): 567-580.
- จิตรวี เขยชม, 2548. การคัดเลือกโปรไบโอติกยีสต์จากกุ้งกุลาดำ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาจุลชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. สงขลา.
- จิราพร เกษรจันทร์. 2537. เชื้อไวรัสกุ้งกุลาดำที่พบในบ้านเรา. วารสารเครือเจริญ โภคภัณฑ์ข่าวกุ้ง. 72 : 1 – 4.
- ชูศักดิ์ แสงธรรม. 2540. การเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. โรงพิมพ์เอเชีย แปซิฟิก พรินติ้ง จำกัด. กรุงเทพฯ.
- เปี่ยมศักดิ์ เมนะเสวต. 2539. ลักษณะของกุ้งที่เป็นโรคตัวแดงดวงขาว. ข่าวเทคโนโลยีชีวภาพ. 2 : 4.
- พรเลิศ จันทรวิรัชกุล, เจ เอฟ เทอร์นบอ และชโล ลัมสุวรรณ. 2537. คู่มือการเลี้ยงและป้องกันโรคกุ้งกุลาดำ. สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ กรมประมง บางเขน. กรุงเทพฯ.
- มณฑกานต์ ทองสม, 2547. แบคทีเรียแลคติกในระบบทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาจุลชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. สงขลา.
- ลีลา เรืองแป้น. 2530. โรคกุ้งทะเลและการแก้ปัญหาโรค. คลินิกสัตว์น้ำกร่อย กองประมงน้ำกร่อย กรมประมง บางเขน. กรุงเทพฯ.
- วัลลภ คงเพิ่มพูน. 2532. กุ้งกุลาดำ. โครงการหนังสือเกษตรชุมชนมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน. กรุงเทพฯ.
- ศิริเพ็ญ สุภัทราวิวัฒน์. 2528. สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (invertebrate Zoology). ภาค วิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. สงขลา. หน้า 220 - 228.
- ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์. 2539. จุลินทรีย์กับการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. วาริชศาสตร์. 3(1) : 42 – 49.
- สนธิ แดงสกุล และลีลา เรืองแป้น. 2541. ประสิทธิภาพของโปรไบโอติกที่ผลิตจาก *Bacillus* เพื่อการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. วารสารการประมง. 5 : 446 – 456.
- Allen D. A., Austin B. and Colwell R. R. 1983. Numerical taxonomy of bacterial isolates associated with a freshwater fishery. J. Gen. Microbiol. 129 : 2043 – 2062.
- Alsina, M. and Blanch, R. A. 1994. A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. J. Applied Bacteriology. 76 : 79 - 85.
- Amabile-Cuevas, C. F., Gardenas-Garcia, M. and Ludgar, M. (1995) Antibiotic resistance. Am. Sci. 83 : 320-329.
- Austin, B., Stuckey, L. F., Roberson, P. A. W., Effendi, I. and Griffith, D. R. W. 1995. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. J. Fish Dis. 18 : 93 – 96.
- Avella, M. A., Olivotto, I., Silvi, S., Ribecco, C., Cresci, A., Palermo, F., Polzonetti, A., Carnevali, O. 2011. Use of *Enterococcus faecium* to improve common sole (*Solea solea*) larviculture. Aquaculture. 315: 384-393.

- Balcázar, J. L., Vendrell, D., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Muzquiz, J. L., Girones, O. 2008. Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. *Aquaculture*. 278:188-191.
- Balebona, M. C., Andreu, M. J., Bordas, M. A., Zorrilla, I., Moriñigo, M. A., Borrego, J. J. 1998.
- Barbieri, E., Falzano, L., Fiorentini, C., Pianetti, A., Baffone, W., Fabbri, A., Matarrese, P., Casiere, A., Katouli, M. and Kuhn, I. 1999. Occurrence, diversity, and pathogenicity of halophilic *Vibrio* spp. and non-O1 *Vibrio cholerae* from estuarine waters along the Italian Adriatic coast. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(6): 2748.
- Carraturo, A., Raieta, K., Ottaviani, D., Russo, G. L. 2006. Inhibition of *Vibrio parahaemolyticus* by a bacteriocin-like inhibitory substance (BLIS) produced by *Vibrio mediterranei* 1. *J. Appl. Microbiol.* 101: 234–241.
- Castex, M., Chim, L., Pham, D., Lemaire, P., Wabete, N., Nicolas, J.-L., Schmidely, P., Mariojouis, C. 2008. Probiotic *P. acidilactici* application in shrimp *Litopenaeus stylirostris* culture subject to vibriosis in New Caledonia. *Aquaculture*. 275: 182–193.
- Chun, J. 1999. *Phylogenetic Editor* (PHYDIT).
- Chythanya, R., Karunasagar, I. and Karunasagar, I. 2002. Inhibition of shrimp pathohogenic vibrios by a marine *Pseudomonas* I – 2 strain. *J. Aquaculture*. 208 : 1 – 10.
- Cottrell, M. T. and Kirchman, D. L. 2000. Community composition of marine bacterioplankton determined by 16S rRNA gene clone libraries and fluorescence in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(12): 5116.
- Denner, E. B. M., Vybiral, D., Fischer, U. R., Velimirov, B. and Busse, H. J. 2002. *Vibrio calviensis* sp. nov., a halophilic, facultatively oligotrophic 0.2 microm-filterable marine bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 52(2): 549.
- Douillet, P. and Langdon, C. J. 1994. Use of a probiotic for culture of larvae of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg). *J. Aquaculture* 119 :25-40.
- Ewing, W. and Haresign, W. 1989. *Probiotics* UK. Chalcombe Publications.
- Forbes, B. A., Sahm, D. F. and Weissfeld, A. S. 2002. *Diagnostic Microbiology*. 11th edition Mosby. USA.
- Fox, S. M. 1988. Probiotics : Intestinal inoculants for production animals. *Vet. Med.* (August): 806-830.
- Garriques, D. and Wyban, J. 1993. Up to date advances on *Penaeus vannamei* maturation, nauplii and post larvae production. In : *Associacao Brasileira de Aquicultura*, pp. 217-235.
- Gauger, E. J. and Gomes – Chiarri, M. 2002. 16S ribosomal DNA sequencing confirms synonymy of *Vibrio harveyi* and *V. carcharia*. *J. Diseases of Aquatic Organisms*. 52 : 39 – 46.
- Gibson, L. F., Woodworth, J. and George, A. M. 1998. Probiotic activity of *Aeromonas media* on the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, when challenged with *Vibrio tubiashii*. *J. Aquaculture* 169 : 111-120.

- Gildberg, A. and Mikkelsen, H. 1998. Effects of supplementing the feed to Atlantic cod (*Gadus morhua*) fry with lactic acid bacteria and immunostimulating peptides during a challenge trial with *Vibrio anguillarum*. J. Aquaculture 167 : 103-113.
- Gomez-Gil, B., Roque, A. and Turnbull, F. J. 2000. The use and selection of probiotic for use in the culture of larval aquatic organisms. J. Aquaculture. 191 : 259 - 270.
- Gomez-Gil, B., Tron-May'en, L., Roque, A., Turnbull, F. J., Inglis, V. and Guerra-flores, L. A. 1998. Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive Juvenile *Penaeus vannamei*. J. Aquaculture. 163 : 1 - 9.
- Hai, N. V. & Fotedar, R. 2010. A Review of Probiotics in Shrimp Aquaculture. Journal of Applied Aquaculture. 22 (3)251-266.
- Havenaar, R. and Huis, J. H. J. 1992. Probiotics : a general view. In: Wood, B. J. B. (ed). The Lactic Acid Bacteria. Vol. 1. Elsevier. London. pp. 151-169.
- Heidelberg, J. F., Heidelberg, K. B. and Colwell, R. R. 2002a. Bacteria of the {gamma}-subclass Proteobacteria associated with zooplankton in Chesapeake Bay. Applied and Environmental Microbiology. 68(11): 5498.
- Heidelberg, J. F., Heidelberg, K. B. and Colwell, R. R. 2002b. Seasonality of Chesapeake Bay bacterioplankton species. Applied and Environmental Microbiology. 68(11): 5488.
- Hsieh, J. L., Fries, J. S. and Noble, R. T. 2008. Dynamics and predictive modelling of *Vibrio* spp. in the Neuse River Estuary, North Carolina, USA. Environmental Microbiology. 10(1): 57-64.
- Huys, L. Dhert, P. H., Robles, D. R., Olivier, P., Sorgeloos, P. and Swing, J. 2001. Search for beneficial bacterial strains for turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larviculture. Aquaculture 193: 25-37.
- Jayaprakash, N. S., Pai, S. S., Philip, R., Singh, S. B. 2006. Isolation of a pathogenic strain of *Vibrio alginolyticus* from necrotic larvae of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). J. Fish. Dis. 29:187-191.
- Joborn, A., Olsson, J. C., Westerdahl, A., Conway, P. L. and Kjellberg, S. 1997. Colonization in the fish intestinal tract and production of inhibitory substance in intestinal mucus and faecal extracts by *Carnobacterium* sp. Strain K1. J. Fish. Dis. 20 : 383-392.
- Kahla-Nakbi, A. B., Chaieb, K., and Bakhrouf, A. 2009. Investigation of several virulence properties among *Vibrio alginolyticus* strains isolated from diseased cultured fish in Tunisia. Dis Aquat Org. 86: 21-28.
- Krieg, N. R. and Holt, J. G. 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol 1. pp 518 - 538. Williams and Wilkins. Baltimore. USA.
- Kushmaro, A., Banin, E., Loya, Y., Stackebrandt, E. and Rosenberg, E. 2001. *Vibrio shiloi* sp. nov., the causative agent of bleaching of the coral *Oculina patagonica*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 51(4): 1383.
- Leano, E. M., Lavilla – Pitago, C. R. and Paner, M. G. 1998. Bacterial flora in the Hepatopancrease of pond – reared *Penaeus monodon* juveniles with luminous vibriosis. J. Aquaculture. 164 : 367 – 374.

- Lee, K. K., Yu, S. R., Chen, F. R., Yang, T. I. and Liu, P. C. 1996. Virulence of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Current Microbiology*. 32 : 229 – 231.
- Lightner, D. V. 1993. Disease of cultured penaeid shrimps. In McVey, J. P. (eds.), *Handbook of mariculture*. pp. 393-348. Boca. Raton Press.
- Lipp, E. K., Huq, A. and Colwell, R. R. 2002. Effects of global climate on infectious disease: the cholera model. *Clinical Microbiology Reviews*. 15(4): 757.
- Louis, V. R., Russek-Cohen, E., Choopun, N., Rivera, I. N. G., Gangle, B., Jiang, S. C., Rubin, A., Patz, J. A., Huq, A. and Colwell, R. R. 2003. Predictability of *Vibrio cholerae* in Chesapeake Bay. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(5): 2773.
- Martin, G. G., Poole, D., Poole, C., Hose, J. E. Arias, M., Raynolds, L., McKrell, N. and Wang, A. 1993. Clearance of bacteria injected into the haemolymph of the penaeid shrimp, *Sicyonia ingentis*. *Aquaculture*. 20 : 37-48.
- Meunpol, O. Lopinyosiri, K. and Menasveta, P. 2003. The effects of ozone and probiotic on the survival of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture*. 220 : 437-448.
- Moriarty, D. J. M. 1998. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *J. Aquaculture* 164 : 351-358.
- Nikoskelainen, S., Ouwehand, A., Salminen, S. and Bylund, G. 2001. Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from furunculosis by *Lactobacillus rhamnosus*. *J. Aquaculture* 198 : 229-236.
- Olsson, J. C., Joborn, A., Westerdahl, A., Blomberg, L., Kjelleberg, S. and Conway, P. L. 1998. Survival, persistence and proliferation of *Vibrio anguillarum* in juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), intestine and faeces. *J. Fish Dis*. 21 : 1-9.
- Ortigosa, M., Esteve, C. and Pujalte, M. J. 1989. *Vibrio* species in seawater and mussels: abundance and numerical taxonomy. *Systematic and Applied Microbiology*. 12(3): 316-325.
- Ortigosa, M., Garay, E. and Pujalte, M. J. 1994. Numerical taxonomy of Vibrionaceae isolated from oysters and seawater along an annual cycle. *Systematic and Applied Microbiology*. 17(2): 216-225.
- Parker, R. B. 1974. Probiotics, the other half of the antibiotics story. *Anim. Nutr. & Health* 29: 4-8.
- Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* from cultured gilt-head sea bream (*Sparus aurata* L.). *Appl Environ Microbiol* 64: 4269–4275.
- Powedchagun, P. Suzuki, H. and Rengpipat, S. 2011. Characterization of a probiotic bacillus S11 bacterium of black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 33: 1-8.
- Rengpipat, S., Phianphak, W., Piyatiratitivorakul, S. and Menasveta, P. 1998. Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. *J. Aquaculture* 167 : 301-313.
- Riemann, L. and Azam, F. 2002. Widespread N-acetyl-D-glucosamine uptake among pelagic marine bacteria and its ecological implications. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(11): 5554.

- Ringo, E. and Strom, E. 1994. Microflora of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.) : gastrointestinal microflora of free-living fish and effect of diet and salinity on intestinal microflora. *Aquacult. Fish. Manage.* 25 : 623-629.
- Riquelme, C., Araya, R., Vergara, N., Rojas, A., Guaita, M. and Candia, M. 1997. Potential probiotic strains in the culture of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *J. Aquaculture* 154 : 17-26.
- Robertson, P. A. W., O' Dowd, C. O., Burrells, C., Williams, P. and Austin, B. 2000. Use of *Carnobacterium* sp. as a probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *J. Aquaculture* 185 : 235-243.
- Schindler, J. and Schmid, R. D. 1982. Fragrance or aroma chemicals microbial synthesis and enzymatic transformation, a review. *Proc. Biochem.* 17: 2-8.
- Sen, S. and Chakrabarty, S.L. 1984. Amylase from *Lactobacillus cellobiosus* isolated from vegetable wastes. *J. Fermen. Tech.* 62: 407-413.
- Senn, L., Entenza, J. M., Greub, G., Jaton, K., Wenger, A., Bille, J., Calandra, T. and Prod'hom, G. 2006. Bloodstream and endovascular infections due to *Abiotrophia defectiva* and *Granulicatella* species. *BMC Infectious Diseases* 6:9
- Sharpell, F. H. 1985. Microbial flavors and fragrance. *In: Advances in biotechnology.* (ed) Murray Moo-Young, Vol.II., Pergamon Press. Toronto: 965-981.
- Sherr, E. and Sherr, B. 2000. **Marine microbes: an overview.** Wiley Series in Ecological and Applied Microbiology.
- Smoragiewicz, W., Bielecka, M., Babuchawowski, A., Boutard, A. and Dubeau, H. 1993. Les probiotiques. *Can. J. Microbiol.* 39: 1089-1095.
- Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E. and Holt, J. G. 1986. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol 2, William & Wilkins. London.
- Sneath, P. H. A. 1957. The application of computers to taxonomy. *Journal of General Microbiology.* 17: 201-226.
- Spelhaug, S. R. and Harlander, S. K. 1989. Inhibition of foodborne bacteria pathogens by bacteriocin from *Lactococcus lactis* and *Pediococcus pentosaceus*. *J. Food prot.* 52: 856-862.
- Stark, B. A. and Wilkinson, J. M. (eds). 1989. *Probiotics: Theory and Application.* Chalcombe Publications.
- Stringer, D. A. 1985. Acceptance of single-cell protein for animal feeds. (ed) Murray Moo-Young. *et al.*, Pergamon Press, 4: 685-694.
- Sung, H., Hsu, S., Chen, C., Ting, Y. and Chao, W. 2001. Relationships between disease outbreak in cultured tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and shrimp hepatopancreas during cultivation. *J. Aquaculture.* 192 : 101 - 110.

- Tamplin, M. L., Gauzens, A. L., Huq, A., Sack, D. A. and Colwell, R. R. 1990. Attachment of *Vibrio cholerae* serogroup O1 to zooplankton and phytoplankton of Bangladesh waters. *Applied and Environmental Microbiology*. 56(6): 1977.
- Tanasupawat, S., Sukontasing, S. and Lee, J. S.: *Enterococcus thailandicus* sp. nov., isolated from fermented sausage ('mum') in Thailand. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2008, 58, 1630-1634.
- Thompson J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G. 1997. The ClustalX Windows Interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tool. *Nucleic Acid Research* 24:4876-4882.
- Thompson, F. L., Iida, T. and Swings, J. 2004. Biodiversity of vibrios. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 68(3): 403.
- Thongchankeaw, U. 2010. Dynamics of *Vibrio* spp. and plankton in aquatic and coastal areas of Thailand. Thesis for Master of Science in Microbiology. Prince of Songkla University. Songkhla.
- Trofa, D., Gácsér, A., and Nosanchuk, J. D. 2008. *Candida parapsilosis*, an Emerging Fungal Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(4): 606-625.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P. and Verstraete, W. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64 : 655 – 671.
- Vinh, D. C., Nichol, K. A., Rand, F. and Embil, J. M. 2006. Native-valve bacterial endocarditis caused by *Lactococcus garvieae*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 56 (1): 91- 94.
- Wang, Y.B., Tian, Z.Q., Yao, J. T., Li, W.-F. 2008. Effect of probiotics, *Enterococcus faecium*, on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. *Aquaculture*. 277: 203-207.
- Wendt, E. C., Peters, J. C., McClellan, E., Hamilton, J. B. and Sternberg, G. M. 1885. A treatise on Asiatic cholera.
- West, P. A. 1989. The human pathogenic vibrios—A public health update with environmental perspectives. *Epidemiology and Infection*. 103(01): 1-34.
- Wood, B. J. B. and Holzapfel, W. H. 1995. The genera of lactic acid bacteria (1st ed.), 398 pp. Great Britain: St Edmundsbury Press.
- www.kungthai.com
- www.vet.ku.ac.th/research/sd_research/sd_re_44.htm
- www.wise.Edu/fri/briefs/nonvibri.htm. Non – Cholera Vibrios.

ตารางที่ 21.2 การทดสอบความไวต่อยา Norfloxacin, Ofloxacin และการยับยั้งแบคทีเรียชนิดเคเตอรีโดยวิธี Agar spot 6 ชนิด

ลำดับที่	หมายเลขเชื้อ	การทดสอบความไวต่อยา (ug/ml)										การยับยั้งแบคทีเรียชนิดเคเตอรีโดยวิธี Agar spot																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
		Norfloxacin					Ofloxacin					E.coli					MRSA					S.aureaus					P.aeruginosa					M.luteus					B.subtilis																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
		512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512	256	128	64	32	16	8	512

ตารางที่ 21.2 (ต่อ) การทดสอบความไวต่อยา Norfloxacin, Ofloxacin และการยับยั้งแบคทีเรียชนิดเคอโรโตยวิธี Agar spot 6 ชนิด

ลำดับที่	หมายเลขเชื้อ	การทดสอบความไวต่อยา (ug/ml)										การยับยั้งแบคทีเรียชนิดเคอโรโตยวิธี Agar spot							
		Norfloxacin					Ofloxacin					E.coli	MRSA	S.aureaus	P.aeruginosa	M.luteus	B.subtilis		
		512	256	128	64	32	16	8	512	256	128							64	32
51	L35 1 a4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1
52	L5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1
53	L52 2 a1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1
54	L52 2 b2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1
55	L52 2 b4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1
56	L53 1 a3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1
57	L54 1 b1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1
58	L54 1 b1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1
59	L54 2 a1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1
60	L54 2 b2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1
61	S10-1a3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1
62	S10-1b1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1
63	S10-32 a1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1
64	S36 1 b1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1
65	S52 2 b1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1
66	S63 1a4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1
67	S63 1 b2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1
68	S63 2 a1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1
69	S71 1 a1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1
70	S71 1 a2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1
71	S71 2 a4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1
72	S71 1 a5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1
73	S71 1 a6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1
74	S71 1 b2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1
75	S76 1 a4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1

ตารางที่ 21.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการทดสอบทางชีวเคมี

ลำดับ	รหัสเชื้อ	ดัดสีแกรม	รูปร่าง					Motility		Catalase	Oxidase	Nitrate	Degradation			MR-VP/		O-F	MR-VP/
			Cocci	Bacilli	Diplococci	Tetrads	Streptococci	Staphylococci	test				test	reduction	Gelatin	protein	starch		
1	a10	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0
2	a18	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0
3	A18/1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0
4	A19/1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0
5	A2/2	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0
6	A21/1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
7	A22/1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1
8	A23/1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
9	A26/2	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0
10	A31/2	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
11	A32/2	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
12	A35/2	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0
13	A36/2	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
14	A45/2	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
15	A26/2	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0
16	a47/2	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
17	A48/2	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
18	A51/2	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0
19	A8/1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0
20	B1/2	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0
21	B25/2	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0
22	c11	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0
23	C13/1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1
24	c15	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0
25	c15/2	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0

ตารางที่ 21.3 (ต่อ) ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการทดสอบทางชีวเคมี

ลำดับรหัสเชื้อ	ลักษณะรูปร่าง	การทดสอบทางชีวเคมี							MR-VP/	O-F	MR-VP/	Acetocin						
		Cocci	Bacilli	Diplococci	Tetrads	Streptococci	Staphylococci	Motility					Catalase	Oxidase	Nitrate	Degradation	Gelatin	protein
25	c15/2	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0
26	C29/1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0
27	D16/1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0
28	D17/1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0
29	D28/2	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0
30	D3/1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0
31	D3/2	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0
32	d35	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0
33	D43/2	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0
34	D48/2	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0
35	H2O GUN a2	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0
36	L1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0
37	L11 1 b1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0
38	L12 1 a1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0
39	L21 1 b3	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0
40	L22 1 a1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0
41	L24 1 a1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0
42	L24 1 a2	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0
43	L24 1 a4	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0
44	L24 1 a5	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0
45	L24 1 b1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0
46	L24 2 a1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0
47	L24 2 a2	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0
48	L24 2a3	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0
49	L3	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0
50	L35 1 a1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0

ตารางที่ 21.3 (ต่อ) ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการทดสอบทางชีวเคมี

ลำดับ	รหัสเชื้อ	ดัดสีแกรม	รูปร่าง						Motility	Catalast test	Oxidase test	Nitrate reduction	Degradation			MR-VP/		O-F test	MR-VP/ Acetocin
			Cocci	Bacilli	Diplococci	Tetrads	Streptococci	Staphylococci					Gelatin	protein	starch	Methyl red			
51	L35 1 a4	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	
52	L5	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	
53	L52 2 a1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	
54	L52 2 b2	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	
55	L52 2 b4	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	
56	L53 1 a3	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	
57	L54 1 b1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	
58	L54 1 b1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	
59	L54 2 a1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	
60	L54 2 b2	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	
61	S10-1a3	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	
62	S10-1b1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	
63	S10-32 a1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	
64	S36 1 b1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	
65	S52 2 b1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	
66	S63 1a4	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	
67	S63 1 b2	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	
68	S63 2 a1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	
69	S71 1 a1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	
70	S71 1 a2	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	
71	S71 2 a4	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	
72	S71 1 a5	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	
73	S71 1 a6	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	
74	S71 1 b2	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	
75	S76 1 a4	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	

ตารางที่ 21.3 (ต่อ) ลักษณะทางทางสัณฐานวิทยา และการทดสอบทางชีวเคมี

ลำดับ	เชื้อ	ดัดสีแกรม		รูปร่าง						Motility		Degradation			MR-VP/		O-F	
		Cocci	Bacilli	Diplococci	Tetrads	Streptococci	Staphylococci	Catalast test	Oxidase test	Nitrate reduction	Gelatin	protein	starch	Methyl red	test	Acetocoin		
76	S81 2 b4	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	
77	S81 2 b3	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	
78	Z23/1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	
std1	E.faecalis	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	
std2	E.faecium	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	
std3	Lb.amylovorus	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	
std4	Lb.animalis	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	
std5	Lb.curvatus	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	
std6	Lb.faciminis	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	
std7	Lb.murinus	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	
std8	Lb.pentosus	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	
std9	L.dextranicum	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	
std10	P.acidilactici	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	

ตารางที่ 21.4 ลักษณะทางสรีรวิทยา

ลำดับ รหัสเชื้อ	NaCl (%w/v)						อุณหภูมิ (°C)					pH				
	0	10	15	20	25	10	45	1	2	3	4	5				
1	a10	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1				
2	a18	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1				
3	A18/1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1				
4	A19/1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1				
5	A2/2	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1				
6	A21/1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1				
7	A22/1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1				
8	A23/1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1				
9	A26/2	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1				
10	A31/2	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1				
11	A32/2	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1				
12	A35/2	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1				
13	A36/2	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1				
14	A45/2	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1				
15	A26/2	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1				
16	a47/2	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1				
17	A48/2	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1				
18	A51/2	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1				
19	A8/1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1				
20	B1/2	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1				
21	B25/2	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1				
22	c11	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1				
23	C13/1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1				
24	c15	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1				
25	c15/2	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1				

ตารางที่ 21.4 (ต่อ) ลักษณะทางสรีรวิทยา

ลำดับ	รหัสเชื้อ	NaCl (%w/v)					อุณหภูมิ (°C)					pH				
		0	10	15	20	25	10	45	1	2	3	4	5			
26	C29/1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1			
27	D16/1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1			
28	D17/1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1			
29	D28/2	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1			
30	D3/1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1			
31	D3/2	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1			
32	d35	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1			
33	D43/2	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1			
34	D48/2	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1			
35	H2O GUN a2	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1			
36	L1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1			
37	L11 1 b1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1			
38	L12 1 a1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1			
39	L21 1 b3	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1			
40	L22 1 a1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1			
41	L24 1 a1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1			
42	L24 1 a2	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1			
43	L24 1 a4	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1			
44	L24 1 a5	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1			
45	L24 1 b1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1			
46	L24 2 a1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1			
47	L24 2 a2	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1			
48	L24 2a3	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1			
49	L3	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1			
50	L35 1 a1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1			

ตารางที่ 21.4 (ต่อ) ลักษณะทางสรีรวิทยา

ลำดับ	รหัสเชื้อ	NaCl (%w/v)					อุณหภูมิ (°C)					pH				
		0	10	15	20	25	10	45	1	2	3	4	5			
51	L35 1 a4	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1				
52	L5	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1				
53	L52 2 a1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1				
54	L52 2 b2	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1				
55	L52 2 b4	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1				
56	L53 1 a3	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1				
57	L54 1 b1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1				
58	L54 1 b1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1				
59	L54 2 a1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1				
60	L54 2 b2	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1				
61	S10-1a3	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1				
62	S10-1b1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1				
63	S10-32 a1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1				
64	S36 1 b1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1				
65	S52 2 b1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1				
66	S63 1a4	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1				
67	S63 1 b2	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1				
68	S63 2 a1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1				
69	S71 1 a1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1				
70	S71 1 a2	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1				
71	S71 2 a4	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1				
72	S71 1 a5	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1				
73	S71 1 a6	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1				
74	S71 1 b2	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1				
75	S76 1 a4	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1				

ตารางที่ 21.4 (ต่อ) ลักษณะทางสรีรวิทยา

ลำดับ	รหัสเชื้อ	NaCl (%w/v)						อุณหภูมิ (°C)						pH				
		0	10	15	20	25	0	10	0	1	2	3	4	5				
76	S81 2 b4	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1				
77	S81 2 b3	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1				
78	Z23/1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1				
std1	<i>E.faecalis</i>	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1				
std2	<i>E.faecium</i>	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1				
std3	<i>Lb.amylovorus</i>	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1				
std4	<i>Lb.animalis</i>	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1				
std5	<i>Lb.curvatus</i>	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1				
std6	<i>Lb.faciminis</i>	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1				
std7	<i>Lb.murinus</i>	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1				
std8	<i>Lb.pentosus</i>	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1				
std9	<i>L.dextranicum</i>	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1				
std10	<i>P.acidilactici</i>	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1				

ภาคผนวก ข.

การนำเสนอผลงานวิจัย

Sukhoom, A., Saleh, H. and Supamataya, K. 2002. Isolation of *Vibrio* spp. from cultured black tiger prawn. 37th Joint Conference on *Cholera* and other Bacterial Enteric Infections Panel in Okinawa, Japan. December 17-19, 2002. Page 145-146.