บทที่ 5
อภิปรายผลการทดลอง

อภิปรายผลการทดลอง

1. การคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อนำมาใช้เป็นโพรไบโอติกในกุ้งกุลาดำ

ในการคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อนำมาใช้เป็นโพรไบโอติกที่ดีสำหรับกุ้งกุลาดำ ซึ่งสามารถช่วยในการเจริญเติบโต และเพิ่มอัตรารอดของกุ้งกุลาดำในครั้งนี้ ได้นำจุลินทรีย์ทางการค้าที่นำมาจากผลการทดลองของปฏิมา ชัยพิริยะศักดิ์ (2546) และจุลินทรีย์ในลำไส้ของกุ้งกุลาดำที่นำมาจากผลการทดลองของวุฒิศักดิ์ ศักดิ์สิทธิ์ (2546) มาทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอาหารคาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน แล้วคัดเลือกจุลินทรีย์จำนวน 7 เชื้อ ที่ให้ผลในการย่อยสลายสารอาหารโปรตีนได้สูงสุดเป็นหลัก เนื่องจากกุ้งกุลาดำเป็นสัตว์ที่ต้องการสารอาหารประเภทโปรตีนสูง (ลิลา เรืองแป้น, 2542ค) ประกอบกับให้ผลในการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต และไขมันได้ดี ซึ่งพบว่าเป็นจุลินทรีย์ที่คัดเลือกทั้ง 7 เชื้อเป็นจุลินทรีย์กลุ่ม *Bacillus* และ *Micrococcus*

โดยจุลินทรีย์กลุ่ม *Bacillus* เป็นกลุ่มถูกที่นำมาใช้กันอย่างกว้างขวาง เนื่องจากจุลินทรีย์กลุ่ม *Bacillus* ส่วนมากเป็นจุลินทรีย์กลุ่มที่ไม่ก่อโรคทั้งในมนุษย์และสัตว์ Ochoa-Solano & Olmos-Soto (2005), Duc et al. (2003) มีการใช้เป็น Immunostimulatory Agent ในการรักษาโรคหลายชนิด Green et al. (1999) เป็นจุลินทรีย์ที่ให้สารปฏิชีวนะ (มาลิน จุลศิริ, 2540) และยังมีการใช้เป็นโพรไบโอติกทางการค้าอีกด้วย Casula and Simon (2002)

ส่วนจุลินทรีย์กลุ่ม *Micrococcus* นั้นเป็นจุลินทรีย์กลุ่มที่ไม่ก่อโรคเช่นกัน และมีการใช้จุลินทรีย์กลุ่ม *Micrococcus* กับอาหารประเภทต่าง ๆ ที่ช่วยให้อาหารมีรสชาติ และรสสัมผัสดีขึ้น Morales et al. (2005), Fernandez et al. (2004), Bohme et al. (1996) และจุลินทรีย์กลุ่ม *Micrococcus* ยังสามารถผลิตสารที่จัดเป็น Bacteriocin ที่มีความใกล้เคียงกับ Nisin ที่เป็น Bacteriocin ที่สร้างโดยจุลินทรีย์พวก *Lactococcus* ที่ถูกนำมาใช้เป็นเหมือนสารกันเสียในอาหารด้วย Kim et al. (2006)

จากนั้นนำเชื้อที่ทำการคัดเลือกทั้ง 7 เชื้อมาทดสอบความไวของเชื้อจุลินทรีย์ต่อยาต้านจุลชีพ โดยเลือกยาต้านจุลชีพที่มักถูกคัดเลือกเป็นอันดับแรก คือเป็นยาต้านจุลชีพที่เชื้อจุลินทรีย์ดื้อต่อยาได้ง่าย และเลือกตามลักษณะของเชื้อจำนวน 3 ชนิด โดยพิจารณาวิธีการคัดเลือกยาต้านจุลชีพจาก คณะแพทย์ศาสตร์ศิริราชพยาบาลมหาวิทยาลัยมหิดล (2537) และคณะทำงานจัดทำคู่มือการใช้ยาต้านจุลชีพ (2539) เพื่อให้แน่ใจว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำการคัดเลือกมาใช้มีความปลอดภัย

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

เนื่องจากสามารถถูกยับยั้งได้ด้วยการให้ยาต้านจุลชีพขนาดธรรมดา (จันทร์เพ็ญ วิวัฒน์, 2526) เนื่องจากจุลินทรีย์ที่ดื้อต่อยาไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้จริงในสภาพแวดล้อม เพื่อเป็นการป้องกันการถ่ายทอดยีนที่มีความสามารถในการดื้อต่อยาต้านจุลชีพไปสู่จุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อม (มาลิน จุลศิริ, 2540), Vandenberghe et al. (1999), McCracken & Gaskins (1999))

แล้วนำเชื้อที่ทำการคัดเลือกทั้ง 7 เชื้อ มาทำการจับคู่แบบต่างสายพันธุ์ แล้วทำการทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอาหารคาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมันแบบเชื้อคู่ และผสมเชื้อทั้ง 7 เชื้อเข้าด้วยกัน แล้วทำการทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอาหารคาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมันอีกครั้ง เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอาหารของจุลินทรีย์ เชื้อเดี่ยว เชื้อคู่และเชื้อรวม

และนำจุลินทรีย์เชื้อเดี่ยว เชื้อคู่ และเชื้อรวมไปทดสอบความสามารถในการต้านทานเชื้อก่อโรค *V. harveyi* ซึ่งพบว่า สอดคล้องกับ วุฒิศักดิ์ ศักดิ์สิทธิ์ (2546) ที่พบว่า จุลินทรีย์เดี่ยวที่ทำการคัดเลือกมาจากลำไส้ของกุ้งกุลาดำไม่มีเชื้อใดเลยที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรค *V. harveyi* และสอดคล้องกับ ปฏิมา ชัยพิริยะศักดิ์ (2546) ที่พบว่า ผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกที่มีเชื้ออยู่รวมกันหลายชนิดที่นำมาทดสอบ ไม่มีผลิตภัณฑ์ใดเลยที่มีความสามารถในการต้านทานเชื้อก่อโรค *V. harveyi* แต่ในการศึกษาทดลองครั้งนี้ พบว่า จุลินทรีย์เชื้อคู่บางคู่มีความสามารถในการต้านทานเชื้อก่อโรค *V. harveyi* ซึ่งอาจเป็นผลเนื่องมาจากจุลินทรีย์คู่น่าจะมีความสามารถในการเสริมกระบวนการยับยั้งเชื้อ *V. harveyi* แต่อย่างไรก็ตามควรทำการศึกษาถึงกลไกการทำงานที่แน่ชัดเพิ่มเติมต่อไป

จากผลการศึกษาทดลองทั้งหมด เมื่อทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอาหารคาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน รวมถึงความสามารถในการต้านทานเชื้อก่อโรคแล้ว ได้คัดเลือกจุลินทรีย์เชื้อคู่ F6_S2 คือ *B. subtilis* (F6) กับ *Micrococcus* sp. (S2) มาใช้เป็นโพรไบโอติกสำหรับการศึกษาทดลองขั้นต่อไป ซึ่งสอดคล้องกับ Rengpipat et al. (2000), Moriaty (1998) & Meunpol et al. (2003) ได้นำ *Bacillus* มาศึกษาโดยใช้เป็นโพรไบโอติกสำหรับกุ้งกุลาดำ และสอดคล้องกับวุฒิศักดิ์ ศักดิ์สิทธิ์ (2546) ที่คาดว่า *Micrococcus* น่าจะเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถใช้เป็นโพรไบโอติกได้ดีที่สุด เนื่องจากมีความสามารถในการย่อยสลายสารอาหารโปรตีน และไขมันที่ดี ทนต่ออุณหภูมิ ความเข้มข้นของเกลือ และความเป็นกรดเป็นด่างได้ดี รวมถึง Lansing, John, & Donald (2002) กล่าวว่า *Micrococcus* จัดเป็นจุลินทรีย์ที่สร้างกรดแลคติกที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์อื่นได้

อย่างไรก็ดีการใช้เชื้อคู่ที่มีความเหมาะสมจะให้ผลต่อการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำได้ดีกว่าการใช้เชื้อเดี่ยว และเชื้อรวม Purivirojkul et al. (2005) และเนื่องจาก F6_S2 เป็นจุลินทรีย์ที่

อยู่ร่วมกันแล้วมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอาหารคาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมันได้ค่อนข้างสูง เมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์เชื้อเดี่ยว เชื้อคู่ และเชื้อรวมประกอบกับตามวัตถุประสงค์ที่ต้องการใช้โพรไบโอติกเพื่อเพิ่มอัตรารอดให้กับกุ้งกุลาดำ ซึ่งจุลินทรีย์คู่ F6_S2 ก็เป็นจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการต้านทานเชื้อก่อโรคได้ดี จึงคาดว่าน่าจะเป็นโพรไบโอติกที่ดี ที่ช่วยให้กุ้งกุลาดำมีอัตราการเจริญและอัตรารอดสูงได้

2. การศึกษาการเจริญเติบโตและอัตรารอดของกุ้งกุลาดำ

ในการศึกษาการเจริญเติบโต และอัตราการรอดของกุ้งกุลาดำ โดยการนำจุลินทรีย์คู่ F6_S2 ที่ทำการคัดเลือกเป็นโพรไบโอติกมาผสมกับอาหารทางการค้าโครเบสท์ให้กุ้งกุลาดำ และเติมโพรไบโอติกลงในน้ำให้กับกุ้งกลาดำโดยตรง ซึ่งสอดคล้องกับ Skjermo and Vadstein (1999) ที่กล่าวว่า สามารถเติมโพรไบโอติกได้ทั้งในน้ำ ในอาหารมีชีวิต และผสมในอาหารสำเร็จรูป

จากผลการศึกษาทดลอง พบว่า กุ้งกุลาดำที่ได้รับการเสริมโพรไบโอติกในอาหาร กุ้งกุลาดำที่ได้รับการเสริมโพรไบโอติกลงในน้ำ และกุ้งกุลาดำที่ไม่ได้รับการเสริมโพรไบโอติกมีการเจริญเติบโตใกล้เคียงกัน สอดคล้องกับผลการทดลองของ Rengpipat et al. (2000) ที่พบว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับโพรไบโอติกมีการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกับกุ้งกุลาดำที่ไม่ได้รับโพรไบโอติก และสอดคล้องกับ Ziaei-Nejad et al. (2006) ที่พบว่า การเติมโพรไบโอติกให้กุ้งขาวอินเดียในระยะ Farming Stage (PL-30 ถึง PL-120) อย่างเดียวมีการเจริญเติบโตไม่แตกต่างจากกุ้งขาวอินเดียที่ไม่ได้รับโพรไบโอติก และการเติมโพรไบโอติกให้กุ้งขาวอินเดียในระยะ Early Larval Stage (Nauplius 1-2 & Zoea 3) อย่างเดียว มีการเจริญเติบโตไม่แตกต่างจากกุ้งขาวอินเดียที่ไม่ได้รับโพรไบโอติก เช่นเดียวกับ Shariff et al. (2001) and McIntosh et al. (2000) พบว่า ในกุ้งกุลาดำ และกุ้ง *Litopenaeus vannamei* ที่ได้รับ *Bacillus* โพรไบโอติกทางการค้า ไม่พบการเพิ่มการเจริญให้กับกุ้ง

อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบน้ำหนักของกุ้งกุลาดำที่เวลาต่าง ๆ พบว่า ในวันที่ 14 กุ้งกุลาดำที่ได้รับโพรไบโอติกในอาหารมีน้ำหนักเฉลี่ยมากที่สุด ขณะที่ในวันที่ 70 กุ้งกุลาดำที่ได้รับโพรไบโอติกในน้ำมีความยาวเฉลี่ยมากที่สุด และเมื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ กับการศึกษาทดลองของ พรชัย นุชา (2544) และ อิสราพร เภรินทวงศ์ (2544) ในระยะ เวลาการเลี้ยงที่เท่ากัน พบว่า ความยาวและน้ำหนักของกุ้งที่สุ่มวัดตามช่วงอายุต่าง ๆ มีค่าใกล้เคียงกัน

แล้วทำการศึกษาอัตราการรอดของกุ้งกุลาดำหลังจากเลี้ยงด้วยอาหารเสริมโพรไบโอติก เสริมโพรไบโอติกในน้ำ และไม่ได้เสริมโพรไบโอติก เป็นเวลา 90 วัน แล้วเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* ต่อไปอีก 10วัน พบว่า มีความสอดคล้องกับรายงานของ Rengpipat et al.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

(1998, 2000), Moriarty (1998) and Ziaei-Nejad et al. (2006) คือ การเสริมโพรไบโอติกมีผลต่ออัตราการรอดตายของกุ้งกุลาดำสูงกว่ากุ้งกุลาดำที่ไม่ได้รับการเสริมโพรไบโอติก

ซึ่งการที่กุ้งกุลาดำที่ได้รับโพรไบโอติก ทำให้มีอัตราการรอดตายของกุ้งกุลาดำสูงกว่ากุ้งกุลาดำที่ไม่ได้รับโพรไบโอติกนั้น น่าจะเป็นผลเนื่องมาจากจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโพรไบโอติกมีความ สามารถในการเข้าไปยึดพื้นที่ในลำไส้ของกุ้งกุลาดำและเจริญได้ดี ทำให้เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ถูก เติมเข้ามาในภายหลัง ไม่สามารถเข้ายึดพื้นที่เพื่อเจริญและก่อโรคได้ ทำให้ผู้ให้อาศัยมีโอกาสเสี่ยงต่อการติดโรคในทางเดินอาหารลดลง ทำให้กุ้งมีสุขภาพดี (ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์, 2539; คณึงนิจ ก่อธรรมฤทธิ์, 2540; Lansing, John & Donald, 2002; Rengpipat et al., 2000 & Itami et al., 1998) พบว่า Bacillus Surface Antigen หรือ เมทาบอไลท์ ของ *Bacillus* จะแสดงผลเป็นเหมือนภูมิคุ้มกันโรคให้กุ้งกุลาดำ โดยกระตุ้นกิจกรรมของ Phagocytic ของ Granulocytes

ผลการศึกษาทดลองครั้งนี้ พบว่า กุ้งกุลาดำที่ได้รับโพรไบโอติกในน้ำมีอัตราการรอดสูงกว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับโพรไบโอติกในอาหาร และมีอัตรารอดสูงกว่ากุ้งกุลาดำที่ไม่ได้รับโพรไบโอติก ซึ่งสอดคล้องกับ Skjermo and Vadstein (1999) ที่กล่าวว่าการเสริมโพรไบโอติกลงในน้ำ เพื่อทำให้กุ้งมีความต้านทานต่อโรคได้ดี ควรเสริมโพรไบโอติกช่วงที่กุ้งอยู่ในระยะวัยอ่อน และ Griffith (1995) พบว่า การเติมโพรไบโอติกลงในน้ำในบ่อเพาะฟักสามารถลดการเกิดโรคจาก จุลินทรีย์ก่อโรคได้ และ Ringo and Vadstein (1998) ได้เสนอแนะว่าการเติมโพรไบโอติกควรเติม ลงในน้ำก่อนการให้อาหารกุ้ง และ Ziaei-Nejad et al. (2006) พบว่า การเสริมโพรไบโอติกลงในน้ำ ช่วยให้กุ้งขาวอินเดียมีอัตรารอดสูง

3. แอคติวิตีจำเพาะของทริปซินและไคโมทริปซินในกุ้งกุลาดำ

ในการศึกษาค่าแอคติวิตีจำเพาะของทริปซิน และค่าแอคติวิตีจำเพาะของไคโมทริปซินในกุ้งกุลาดำที่ช่วงอายุต่าง ๆ นั้น ได้ทำการศึกษาแอคติวิตีจำเพาะของทริปซินและแอคติวิตีจำเพาะของไคโมทริปซินของกุ้งกุลาดำก่อนการทดลอง และเริ่มการทดลองหลังการให้อาหารมื้อแรกชั่วโมงที่ 3, 6, 12 วันที่ 1, 3, 5, 7, 14, 21, 28, 42, 56, 70 และวันที่ 84 โดยนำค่าแอคติวิตีของทริปซินและแอคติวิตีของไคโมทริปซิน (μmol p-Nitroaniline min^{-1} ml^{-1}) มาหารด้วยปริมาณโปรตีนรวมในน้ำย่อยอาหารของกุ้งกุลาดำ (mg ml^{-1}) จะได้เป็นค่าแอคติวิตีจำเพาะของทริปซินและแอคติวิตีจำเพาะของไคโมทริปซิน (μmol p-Nitroaniline min^{-1} mg^{-1} Protein)

ซึ่งพบว่า ค่าแอคติวิตีจำเพาะของทริปซิน และแอคติวิตีจำเพาะของไคโมทริปซินในกุ้งกุลาดำโดยรวม ที่ช่วงอายุต่าง ๆ กันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สอดคล้องกับ Fernandez et al. (2001); Fang and Lee (1992); Lovett and Felder (1996) พบว่า

ค่าแอคติวิตีจำเพาะของทริปซิน และแอคติวิตีจำเพาะของไคโมทริปซินจะมีความแตกต่างกันไปตามระยะต่าง ๆ ของการ เจริญเติบโตของกุ้ง และเป็นไปตามสมมติฐานของการทดลองในครั้งนี้

เมื่อพิจารณาผลของการเสริมโพรไบโอติกต่อค่าแอคติวิตีของทริปซิน และแอคติวิตีของไคโมทริปซินที่แต่ละช่วงเวลาของกุ้งกุลาดำ พบว่า แอคติวิตีของทริปซินของ กุ้งกุลาดำที่ได้รับการเสริมโพรไบโอติกมีค่าสูงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับ การเสริมโพรไบโอติก อาจเนื่องมาจากตัวจุลินทรีย์ที่คัดเลือกมาใช้เป็นโพรไบโอติกสามารถสร้าง เอนไซม์ Protease ได้สูง (Lansing, John, & Donald, 2002) จึงสามารถย่อยสลายสารอาหาร และช่วยในการดูดซึมสารอาหารได้ดี ส่งผลให้กุ้งกุลาดำมีการเพิ่มขนาดของส่วนทางเดินอาหาร ทำให้สามารถสร้างเอนไซม์ได้มากขึ้น (Lemieux, Blier, & Dutil, 1999) จึงทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงขึ้น

อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถบอกได้ชัดเจนระหว่างแอคติวิตีของเอนไซม์ที่สังเคราะห์โดยกุ้งกับแอคติวิตีของเอนไซม์ที่สังเคราะห์โดยจุลินทรีย์ (Ziaei-Nejad et al., 2006)

สรุปผลการทดลอง

1. เชื้อจุลินทรีย์คู่ของ *B. subtilis* (F6) กับ *Micrococcus* sp. (S2) ที่ทำการ คัดเลือกมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นโพรไบโอติกสำหรับกุ้งกุลาดำเพื่อเพิ่มอัตรารอด และช่วยให้กุ้งมีความต้านทานต่อเชื้อก่อโรค

2. กุ้งกุลาดำที่ได้รับการเสริมโพรไบโอติกในน้ำมีอัตราการรอดตายหลังจากเหนี่ยวนำให้เกิดโรคสูงที่สุด (ร้อยละ 60.83) ซึ่งสูงกว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับการเสริมโพรไบโอติกในอาหาร (ร้อยละ 50.33) และกุ้งกุลาดำที่ไม่ได้รับการเสริมโพรไบโอติก (ร้อยละ 38.33)

3. กุ้งกุลาดำที่ได้รับการเสริมโพรไบโอติกในอาหาร และในน้ำมีการเจริญเติบโตใกล้เคียงกับกุ้งกุลาดำที่ไม่ได้รับการเสริมโพรไบโอติก

4. แอคติวิตีจำเพาะของทริปซินของกุ้งกุลาดำ มีค่าสูงที่สุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ในช่วงวันที่ 70 และ 84 ของการทดลอง

5. แอคติวิตีจำเพาะของไคโมทริปซินของกุ้งกุลาดำมีค่าสูงที่สุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสในวันที่ 70 ของการทดลอง

6. เชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* (F6) กับ *Micrococcus* sp. (S2) น่าจะมีความ เหมาะสมที่จะใช้เป็นโพรไบโอติก เพื่อเพิ่มอัตราการรอดให้กุ้งกุลาดำ ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์ย่อย อาหารในกุ้งกุลาดำมีความแตกต่างกันตามช่วงอายุของกุ้งกุลาดำ โดยโพรไบโอติกที่ใช้อาจมีส่วน ช่วยในการเพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์ในกุ้งกุลาดำ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ข้อเสนอแนะ

1. ควรหาวิธีในการสุ่มเก็บกุ้งกุลาดำที่ส่งผลกระทบต่อความเครียดของกุ้งน้อยที่สุด

2. ควรทำการเก็บตัวอย่างและสกัดเอนไซม์ในตู้หรือห้องที่สามารถควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 4 องศาเซลเซียสได้ เพื่อลดการสูญเสียความสามารถของเอนไซม์

3. การศึกษาครั้งนี้ เป็นการจับคู่เชื้อจุลินทรีย์ เพื่อใช้เป็นโพรไบโอติก แต่ผลการศึกษาและผลการวิจัยส่วนใหญ่ที่มีการตีพิมพ์ในปัจจุบัน เป็นการศึกษาโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์เดี่ยวเป็นโพรไบโอติก ในขณะที่ผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกทางการค้าส่วนใหญ่เป็นเชื้อจุลินทรีย์ผสมรวม จึงควรมีการทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ที่จะนำมาใช้เป็นโพรไบโอติกให้มีความหลากหลายมากขึ้น

4. วัสดุที่ใช้สำหรับให้กุ้งกุลาดำหลบซ่อนในระหว่างการลอกคราบเพื่อการเจริญเติบโตอาจจะยังไม่เหมาะสม จึงควรทดลองหาวัสดุอื่น ๆ เพื่อใช้ในการทดลองต่อไปในอนาคต

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University