การคัดแยกแบคทีเรียแลกติกจากลำไส้กั้งตั๊กแตนเพื่อพัฒนาเป็นโพรไบโอติก

Isolation of Lactic Acid Bacteria from Mantis Shrimp (*Harpiosquilla raphidea*) Intestine for Probiotic Development

มณฑกานต์ ทองสม* และ ลัญจกร จันทร์อุดม

Montakarn Thongsom* and Lanchakon Chanudom

Received: 11 May 2018, Revised: 9 August 2018, Accepted: 23 November 2018

บทคัดย่อ

จากการเก็บตัวอย่างกั้งตั๊กแตนที่ได้จากการทำประมงพื้นบ้านบริเวณอ่าวท่าศาลา จังหวัดนครศรีธรรมราช โดยตรวจนับแบคทีเรียทั้งหมดและคัดแยกแบคทีเรียแลกติกจากทางเดินอาหารของกั้งตั๊กแตน พบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียแลกติกได้ 139 ไอโซเลต เมื่อนำมาทดสอบสมบัติในการเป็นโพรไบโอติก พบว่าแบคทีเรียแลกติกจำนวน 7 ไอโซเลต สามารถเจริญได้ที่ pH ต่ำ (pH 3-6) ทนต่อเกลือน้ำดี (0.15% และ 0.30%) สามารถย่อยแป้ง โปรตีน และไขมัน สามารถเจริญได้ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน อีกทั้งยังสามารถยับยั้งเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* และ *V. harveyi* ได้ เมื่อศึกษาการเจริญและการสร้างสารยับยั้งพบว่าแลกติกแอซิดแบคทีเรียมีอัตราการเจริญสูงสุดที่เวลา 33 ชั่วโมง เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MRS (pH 6.0) เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากลำไส้กั้งตั๊กแตนมีสมบัติการเป็นโพรไบโอติก ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำมาพัฒนาเป็นโพรไบโอติกต่อไป

คำสำคัญ: กั้งตั๊กแตน, แบคทีเรียแลกติก, โพรไบโอติก

สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช อำเภอเมือง จังหวัดนครศรีธรรมราช 80280

Department of Biology, Faculty of Science and Technology, Nakhon Si Thammarat Rajabhat University, Meuang, Nakhon Si Thammarat 80280, Thailand.

* ผู้นิพนธ์ประสานงาน ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (Corresponding author, e-mail): montakarn2008@hotmail.com

ABSTRACT

The collecting sample of mantis shrimp from traditional fishing area of Thasala, Nakhon Si Thammarat province were counted for total bacteria and isolated for lactic acid bacteria (LAB) from mantis shrimp intestinal. It was found that 139 isolates of LAB could be isolated. Probiotic properties showed that 7 isolates could survive at low pH (pH 3-6), tolerated to bile salt (0.15% and 0.3%), utilized starch, protein and lipid, and could grow in anaerobic condition. Moreover, it could inhibite *Vibrio parahaemolyticus* and *V. harveyi*. For the studies of growth and inhibition properties, 7 isolates LAB showed the highest growth rate at 33 hours in MRS broth (pH 6.0) incubated at 35 ^{o}C. The results revealed that isolated LAB from mantis shrimp intestine had probiotic properties. Therefore, it is possible that the isolated LAB can be developped into probiotics.

Key words: Mantis shrimp, lactic acid bacteria, probiotic

บทนำ

กั้งตั๊กแตนจัดเป็นสัตว์ขาข้อ (Arthropod) พวกครัสเตเชียน (Subphylum Crustacea) ใน Class Malacostraca จัดอยู่ใน Order Stomatopoda มีชื่อสามัญว่า Mantis shrimp พบเฉพาะในทะเลและบริเวณน้ำกร่อยโดยเฉพาะในเขตร้อน โดยกั้งตั๊กแตนจะอาศัยอยู่ในรูหรือตามซอกหินหรือปะการัง ซึ่งพบได้ตั้งแต่เขตน้ำขึ้นน้ำลงไปจนถึงระดับความลึก 1,500 เมตร กั้งตั๊กแตนบางชนิดสามารถนำมาทำเป็นอาหาร ได้แก่ กั้งตั๊กแตนในสกุล *Harpiosquilla* ซึ่งเป็นกั้งตั๊กแตนในสกุลที่มีขนาดใหญ่ ได้แก่ *H. rahidea* และ *H. harpax* มีราคาค่อนข้างแพง นิยมใช้ประกอบอาหารในภัตตาคาร และชนิด *Miyakea nepa* เป็นกั้งตั๊กแตนที่พบในอ่าวไทยและทะเลอันดามัน และถูกจับได้จากการประมงอวนลากในปริมาณมาก ดังนั้นควรมีการส่งเสริมการเพาะเลี้ยงกั้งตั๊กแตนเพื่อการจำหน่าย ซึ่งจะสามารถสร้างอาชีพและรายได้ให้แก่เกษตรกร มีการศึกษาพบว่าแบคทีเรียแลกติกจัดอยู่ใน Family Lactobacillaceae สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสให้กรดแลกติก ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียที่ไม่ก่อให้เกิดโรค อีกทั้งยังสามารถปรับตัวเพื่อการเจริญภายใต้สภาวะต่างๆ จึงทำให้พบเชื้อกลุ่มนี้ทั้งในคนและสัตว์โดยเฉพาะบริเวณช่องปาก ลำไส้ ช่องคลอด และยังพบได้ในแมลง พืชและผลิตภัณฑ์จากพืช รวมถึงเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ (สมบูรณ์, 2538) ดังนั้นจึงมีการนำแบคทีเรียแลกติกมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกหลายชนิด Fuller (1992) กล่าวว่าโพรไบโอติกคืออาหารเสริมซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตและมีประโยชน์ต่อร่างกายของสิ่งมีชีวิตที่มันอาศัยอยู่ โดยช่วยปรับความสมดุลของเชื้อจุลินทรีย์ในลำไส้ ดังนั้นการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์บกและสัตว์น้ำ โดยช่วยเพิ่มน้ำหนักและกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ซึ่งโพรไบโอติกที่นำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำต้องสามารถทนต่อกรดและเกลือน้ำดี สามารถยึดเกาะและเจริญเติบโตในลำไส้ สามารถต่อต้านแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค อีกทั้งยังทนต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ ซึ่งการใช้โพรไบโอติกในสัตว์น้ำจะช่วยให้เกิดสมดุลในระบบทางเดินอาหาร ช่วยย่อยสารอาหาร ยับยั้งเชื้อก่อโรค กระตุ้นภูมิคุ้มกันให้กับสัตว์น้ำ และช่วยปรับปรุงคุณภาพน้ำ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกแบคทีเรียแลคติกที่มีสมบัติการเป็นโพรโอติกจากลำไส้ของกั้งตั๊กแตนเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงกั้งตั๊กแตน และสัตว์น้ำอื่นๆ ต่อไป ซึ่งเป็นการช่วยเพิ่มมูลค่าของกั้งตั๊กแตน พัฒนาองค์ความรู้และภูมิปัญญาท้องถิ่น และพัฒนาเศรษฐกิจของชุมชน อันจะนำไปสู่การแข่งขันและพึ่งพาตนเองต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างกั้งตั๊กแตนจากการทำประมงพื้นบ้านจำนวน 3 ครั้ง (30 ตัว) ในบริเวณอ่าวท่าศาลา อ.ท่าศาลา จ.นครศรีธรรมราชจำนวน 4 จุด ได้แก่ หมู่ที่ 4 บ้านท่าสูง หมู่ที่ 5 บ้านในถุ้ง หมู่ที่ 6 บ้านสระบัว และหมู่ที่ 7 บ้านหน้าทับ

2. การตรวจนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด แบคทีเรียแลกติก และการทดสอบสมบัติการเป็นโพรไบโอติก

นำลำไส้ของกั้งตั๊กแตนมาเจือจางด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.85 จากนั้นเกลี่ยลงบนผิวหน้าอาหาร Plate count agar (PCA) ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 1.5 สำหรับตรวจนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และคัดแยกแบคทีเรียแลกติกโดยการ pour plate ด้วยอาหารแข็ง de Man Rogosa and Sharpe (MRS) ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 และโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 1.5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง สุ่มเก็บตัวอย่างโคโลนีของแบคทีเรียแลกติกมาทดสอบการติดสีแกรม และการสร้างเอนไซม์คะตาเลส

3. การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีสมบัติการเป็นโพรไบโอติก

3.1 การทนต่อ pH ต่ำ

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลกติกลงในอาหาร MRS broth (pH 3-6) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตการเจริญของเชื้อโดยดูจากความขุ่น

3.2 การทนต่อเกลือน้ำดี

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลกติกลงในอาหาร MRS broth ที่เติมเกลือน้ำดีร้อยละ 0.15, 0.30 และ 0.45 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตการเจริญของเชื้อโดยดูจากความขุ่น

3.3 การย่อยโปรตีน

เขี่ยเชื้อลงบนอาหาร Skim milk agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตบริเวณใสรอบโคโลนี (clear zone) ซึ่งแสดงถึงความสามารถในการย่อยโปรตีน

3.4 การย่อยแป้ง

เขี่ยเชื้อลงบนอาหาร Starch agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นหยดสารละลายไอโอดีนให้ท่วมผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ สังเกตบริเวณใสรอบโคโลนี ซึ่งแสดงถึงความสามารถในการย่อยแป้ง

3.5 การย่อยไขมัน

เขี่ยเชื้อลงบนอาหาร Tributyrine agar นำไปบ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตบริเวณใสรอบโคโลนี ซึ่งแสดงถึงความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไลเปส

3.6 ความสามารถในการเจริญในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน

เขี่ยเชื้อลงบนอาหาร MRS agar นำไปบ่มใน anaerobic jar ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตการเจริญของเชื้อ

4. การยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยวิธี Agar spot (Spelhaug and Harlander, 1989)

เจือจางเชื้อแบคทีเรียแลกติกให้มีปริมาณเซลล์ 10^8 CFU/ml จากนั้นดูดเชื้อปริมาตร 5 ไมโครลิตร หยดลงบนผิวหน้าอาหาร MRS agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

แล้วเททับผิวหน้าอาหารด้วย BHI soft agar ซึ่งมีเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ (*Vibrio parahaemolyticus* และ *V. Harveyi*) ปริมาณเซลล์ 10^6 CFU/ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดขนาด clear zone ด้วยเวอร์เนียร์คาลิเปอร์

5. การยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยวิธี well diffusion (Spelhaug and Harlander, 1989)

เจือจางเชื้อแบคทีเรียแลกติกเช่นเดียวกับวิธี agar spot จากนั้นถ่ายเชื้อร้อยละ 1 ลงในอาหาร MRS broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge (Cryste separation technology, Korea) ความเร็วรอบ 5,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 20 นาที จากนั้นดูดส่วนใสปริมาตร 100 µl หยดลงในหลุมบนอาหาร Nutrient Agar เข้มข้นร้อยละ 1 ซึ่งผ่านการเกลี่ยด้วยแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่มีปริมาณเซลล์ 10^6 CFU/ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดขนาด clear zone ด้วยเวอร์เนียร์คาลิเปอร์

6. การเจริญเติบโตของแบคทีเรียแลกติก

เตรียม inoculums ของแบคทีเรียแลกติกในอาหาร MRS broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มีโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 1.5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เจือจางจนได้ค่า optical density (O.D.) เท่ากับ 0.5 วัดความขุ่นด้วยเครื่อง Spectrophotometer (Thermo scientific, Genesys10S UV-Vis Spectrophotometer, USA) ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร จากนั้นดูดเชื้อร้อยละ 1 ลงในอาหารเหลว MRS บ่มใน shaker incubator (Cryste puricell shaking, Korea) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยใช้ความเร็วรอบ 150 rpm ตรวจวัดความขุ่นที่เวลา 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 30, 33, 38 และ 47 ชั่วโมง

7. สภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

7.1 ผลของ pH ต่อการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

เตรียมเชื้อแบคทีเรียแลกติก เช่นเดียวกับวิธี Agar spot โดยถ่ายเชื้อร้อยละ 1 ลงในอาหาร MRS broth ที่มีโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 1.5 ปรับ pH ให้ได้ 5.0, 5.5 และ 6.0 จากนั้นนำไปบ่มใน shaker incubator เช่นเดียวกับข้อ 6 วัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร โดยเก็บตัวอย่างที่เวลา 33 ชั่วโมง ซึ่งเป็นเวลาที่แบคทีเรียแลกติกมีการเจริญสูงที่สุด จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ แล้วนำส่วนใสไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยวิธี well diffusion

7.2 ผลของอุณหภูมิต่อการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

เตรียมเชื้อแบคทีเรียแลกติกเช่นเดียวกับวิธี Agar spot จากนั้นถ่ายเชื้อร้อยละ 1 ลงในอาหาร MRS broth ที่มีโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 1.5 โดยเลือก pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างสารยับยั้งที่คัดเลือกได้จากข้อ 7.1 บ่มใน shaker incubator ที่ความเร็วรอบ 150 rpm อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บตัวอย่างและทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์เช่นเดียวกับข้อ 7.1

8. การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ทุกการทดลองทำการทดลอง 3 ซ้ำ และแสดงผลการวิเคราะห์ข้อมูลในรูปของค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย (Mean ± S.E.M.) และวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยโปรแกรม SPSS (p<0.05)

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

1. จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียแลกติกในทางเดินอาหารกั้งตั๊กแตน

กั้งตั๊กแตนมีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และแบคทีเรียแลคติกอยู่ในช่วง 1.85×10^2- 6.95×10^6 CFU/g และ 1.14×10^2 - 7.76×10^5 CFU/g ตามลำดับ (ตารางที่ 1) จากการคัดแยกแบคทีเรียแลกติกพบว่ามีทั้งหมด 139 ไอโซเลต โดยแบคทีเรียแลกติกมีโคโลนีเป็นรูปกระสวยขนาดประมาณ 0.1-0.3 มิลลิเมตร และมีวงใสรอบๆ โคโลนี ซึ่งเกิดจากการสร้างกรดของแบคทีเรียแลกติกที่สามารถย่อยแคลเซียมคาร์บอเนต ไม่สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสย้อมติดสีแกรมบวก โดยเซลล์มีรูปร่างกลม จัดเรียงตัวแบบเดี่ยวๆ และแบบคู่

ปกติในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ทุกชนิดมีจุลินทรีย์ในปริมาณหนึ่ง ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายและช่วยเพิ่มการดูดซึมของอาหาร จากการศึกษาของ Gournier-Chatean (1994) พบว่าแบคทีเรียแกรมบวกในกลุ่มของ facultative anaerobe เป็นจุลินทรีย์ที่มีบทบาทในลำไส้ของคนและสัตว์ Conway (1997) พบว่าแบคทีเรียแลกติกเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นสามารถเจริญได้ในบริเวณทางเดินอาหารของสัตว์บก Dempsey and Rosson (1989) ตรวจพบว่าแบคทีเรียทั้งหมดที่แยกได้จากทางเดินอาหารกุ้งกุลาดำสีน้ำตาลมีจำนวน 7.5×10^6- 2.6×10^7CFU/g

ตารางที่ 1 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียแลกติกที่คัดแยกได้จากลำไส้กั้งตั๊กแตน

ตัวที่	แบคทีเรียทั้งหมด (CFU/g)	แบคทีเรียแลกติก (CFU/g)	ตัวที่	แบคทีเรียทั้งหมด (CFU/g)	แบคทีเรียแลกติก (CFU/g)
1	2.88×10^5	<30	16	2.1×10^6	8.0×10^2
2	1.08×10^5	6.5×10^5	17	2.15×10^4	1.5×10^3
3	4.48×10^3	6.5×10^5	18	2.85×10^4	1.14×10^2
4	3.20×10^5	4×10^5	19	6.6×10^4	1.63×10^3
5	4.67×10^3	8.0×10^2	20	6.95×10^6	>300
6	2.99×10^5	9.12×10^4	21	7.5×10^4	1.10×10^5
7	4.25×10^4	3.26×10^5	22	>300	4.0×10^3
8	6.02×10^4	7.76×10^5	23	4.00×10^5	4.2×10^2
9	3.85×10^6	2.57×10^5	24	8.0×10^5	9.2×10^2
10	4.5×10^3	1.36×10^5	25	2.0×10^3	<30
11	>300	2.0×10^2	26	9.00×10^3	1.19×10^3
12	49×10^3	0.51×10^5	27	1.08×10^3	1.19×10^3
13	2.16×10^5	7.22×10^5	28	2.55×10^6	3.0×10^3
14	3.35×10^4	8.30×10^2	29	2.9×10^3	7.5×10^2
15	1.85×10^2	1.75×10^2	30	6.95×10^5	1.54×10^4

* นับจำนวนโคโลนีแบคทีเรียแลกติกที่อยู่ในช่วง 30-300 โคโลนี

ซึ่งใกล้เคียงกับ Yuthachit *et al*. (1990) ที่พบว่าแบคทีเรียทั้งหมดที่แยกได้จากทางเดินอาหารกุ้งกุลาดำสีน้ำตาลมีจำนวน 7.5×10^6- 1.3 x 10^7 CFU/g ในขณะที่มณฑกานต์ (2547) พบว่าในทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำมีแบคทีเรียแลกติกอยู่ในช่วง <20 - 1.2 $\times 10^5$ CFU/g ซึ่งมากกว่าที่ตรวจพบในทางเดินอาหารปลา Atlantic Salmon ที่มีปริมาณแบคทีเรียแลกติก 2×10^3 CFU/g (Ringo and Gastesoupe, 1998)

2. สมบัติการเป็นโพรไบโอติกของแบคทีเรียแลกติก

จากการทดสอบการเป็นโพรไบโอติกพบว่าแบคทีเรียแลกติกมีสมบัติในการเป็นโพรไบโอติก โดยมี 139 ไอโซเลต ที่สามารถทนต่อ pH 6 และสามารถเจริญได้ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน แต่ไม่สามารถย่อยแป้งได้ ในขณะที่แบคทีเรียแลกติกจำนวน 108 ไอโซเลต สามารถทนต่อ pH 4 และ pH 5 มีเพียงแบคทีเรียแลกติกจำนวน 3 ไอโซเลตเท่านั้นที่สามารถทนต่อ pH 3 แบคทีเรียเลกติกจำนวน 43 ไอโซเลต สามารถย่อยโปรตีน ในขณะที่ 66 ไอโซเลต สามารถย่อยไขมัน (ตารางที่ 2) ซึ่งความสามารถในการทนต่อน้ำย่อยเป็นคุณสมบัติที่สำคัญของแบคทีเรียโพรไบโอติก (Succi *et al*., 2005) ทั้งนี้เนื่องจากในกระเพาะอาหารของคนและสัตว์บางชนิด เช่น ไก่ สุกร และวัว มีการหลั่งกรดไฮโดรคลอริกทำให้ pH ในระบบทางเดินอาหารลดลง ส่งผลให้แบคทีเรียส่วนใหญ่ไม่สามารถทนและเจริญเติบโตได้ (Jin *et al*., 1996) ซึ่งเมื่อบริโภคอาหารเข้าไปจะทำให้ความเป็นกรดลดลงและมีสภาวะความเป็นกรด-ด่างที่แตกต่างกันไป จากการศึกษาของ Conway (1997) พบว่า *Lactobacillus acidophilus* สามารถทนสภาวะกรดได้ดีกว่าแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์อื่น

แบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากกั้งตั๊กแตนสามารถย่อยไขมันและโปรตีน แต่ไม่สามารถย่อยแป้ง ซึ่งแสดงถึงแบคทีเรียแลกติกมีส่วนช่วยในการทำงานของระบบการย่อยอาหารของกั้งตั๊กแตน ทำให้การดูดซึมสารอาหารเกิดได้เร็วขึ้น สอดคล้องกับการทดลองของ Austin *et al*. (1995) ที่พบว่าแบคทีเรียแลกติกสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งโปรตีน และไขมัน จึงช่วยส่งเสริมการเจริญของสัตว์น้ำ Duangchitchareon (2006) รายงานว่าแบคทีเรียแลกติก 44 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากผักดองในประเทศไทย มีเพียง 32 สายพันธุ์ ที่สามารถย่อยได้ทั้งโปรตีนและแป้ง ในขณะที่แบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ทางการค้าสามารถย่อยได้เฉพาะโปรตีน

ตารางที่ 2 สมบัติการเป็นโพรไบโอติกของแบคทีเรียแลกติก

Isolate	การทนต่อ pH				การทนต่อเกลือน้ำดี		การย่อย			การเจริญในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน
	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	0.15 %	0.3 %	โปรตีน	แป้ง	ไขมัน	
จำนวน	3	106	108	139	11	1	43	0	66	139

3. การยับยั้งแบคทีเรียแลกติกโดยวิธี Agar spot

จากการทดลองพบว่ามีแบคทีเรียแลกติกจำนวน 28 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 0.05 (ตารางที่ 3) โดยแบคทีเรียแลกติกจำนวน 11 ไอโซเลต สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ทั้ง 2 สายพันธุ์ ในขณะที่แบคทีเรียแลกติกจำนวน 15 ไอโซเลต สามารถยับยั้ง

การเจริญของ *V. parahaemolyticus* แต่ไม่ยับยั้งการเจริญของ *V. harveyi* และมีเพียง 1 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *V. harveyi* แต่ไม่ยับยั้งการเจริญของ *V. parahaemolyticus* ในขณะที่มีเพียง 1 ไอโซเลต ที่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ทั้ง 2 สายพันธุ์

ตารางที่ 3 การยับยั้ง *V. parahaemolyticus* และ *V. harveyi* ของแบคทีเรียแลกติกโดยวิธีการ Agar spot

Isolate number	**Inhibition zone (cm)**		Isolate number	**Inhibition zone (cm)**	
	V. parahaemolyticus	***V. harveyi***		***V. parahaemolyticus***	***V. harveyi***
H14	$0.85\pm0.01^{d,e}$	-	H79	1.40 ± 0.01^{n}	1.06 ± 0.03^{c}
H20	$1.12\pm0.015^{i,j}$	1.32 ± 0.02^{e}	H80	1.17 ± 0.01^{k}	1.41 ± 0.07^{f}
H21	-	-	H87	1.34 ± 0.01^{m}	$1.23\pm0.07^{d,e}$
H22	0.67 ± 0.012^{b}	-	H121	$0.86\pm0.01^{d,e,f}$	-
H23	1.15 ± 0.035^{k}	0.94 ± 0.06^{b}	H122	$0.88\pm0.02^{e,f}$	-
H36	$0.82\pm0.01^{c,d}$	-	H124	$0.95\pm0.01^{g,h}$	-
H37	1.28 ± 0.08^{l}	1.22 ± 0.08^{d}	H126	0.96 ± 0.02^{h}	-
H40	$0.94\pm0.03^{f,g}$	-	H127	-	1.12 ± 0.03^{c}
H43	$0.87\pm0.06^{e,f}$	-	H130	1.06 ± 0.02^{i}	-
H47	$0.97\pm0.05^{g,h}$	$1.28\pm0.05^{d,e}$	H131	1.35 ± 0.02^{m}	-
H49	1.25 ± 0.03^{l}	1.24 ± 0.10^{d}	H132	1.24 ± 0.05^{l}	-
H50	1.31 ± 0.01^{m}	$1.29\pm0.07^{d,e}$	H133	0.78 ± 0.02^{c}	-
H52	$1.16\pm0.06^{j,k}$	$1.26\pm0.04^{d,e}$	H134	$0.83\pm0.01^{c,d,e}$	-
H60	1.17 ± 0.02^{k}	1.21 ± 0.09^{d}	H138	$0.95\pm0.05^{g,h}$	-

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงการมีค่าเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

แสดงค่า mean ± SD ของวงใสในการยับยั้ง

- หมายถึง ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้

4. ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียแลกติกโดยวิธี well diffusion

V. harveyi และ *V. Parahaemolyticus* เป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคติดเชื้อในกุ้ง โดยธรรมชาติแล้ว *Vibrio* sp. เป็นจุลินทรีย์ที่พบตามตัวกุ้ง เหงือก และทางเดินอาหาร แต่จะก่อให้เกิดโรคกับกุ้งเมื่อสภาวะแวดล้อมต่างๆ ไม่เหมาะสม เช่น ขาดสารอาหาร กุ้งเกิดความเครียดและอ่อนแอ โดยอาจแสดงอาการร่วมกับไวรัสชนิดอื่น ทำให้กุ้งกินอาหารน้อยลง ลำไส้มีสีขาว ตัวหลวม ตับและตับอ่อนผิดปรกติ สีเนื้อขุ่น และมีตะกอนเกาะตามผิว โดยกุ้งจะขึ้นมาเกาะตามขอบบ่อ เมื่อนำตับและตับอ่อนมาแยกเชื้อจะพบเชื้อ *Vibrio* sp. เป็นจำนวนมาก ซึ่งหากปล่อยไว้นาน จะเกิดอาการรุนแรงและรักษาได้ยาก ก่อให้เกิดความเสียหายต่อการเพาะเลี้ยงกุ้งเป็นอย่างมาก จากการทดลองพบว่าแบคทีเรียแลกติกซึ่งมี

ความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 0.05 และสามารถยับยั้งแบคทีเรีย อินดิเคเตอร์ทั้ง 2 สายพันธุ์ มีจำนวน 7 ไอโซเลต ได้แก่ H20, H37, H49, H50, H52, H79 และ H80 โดยมีแบคทีเรียแลกติกเพียง 2 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้ง *V. parahaemolyticus* แต่ไม่ยับยั้ง *V. harveyi* (ตารางที่ 4)

ซึ่งความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์แตกต่างกันตามแหล่งที่ตรวจพบแบคทีเรียแลกติก โดยดนุวัต และคณะ (2551) รายงานว่าสามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากปลาเผาะได้ทั้งหมด 37 ไอโซเลต ซึ่งมีคุณสมบัติในการ

ตารางที่ 4 การยับยั้ง *V. harveyi* และ *V. parahaemolyticus* ของแบคทีเรียแลกติกโดยวิธีการ Well diffusion

Isolate number	Inhibition zone (cm)	
	V. parahaemolyticus	***V. harveyi***
H20	$1.31\pm0.06^{c,d}$	1.23 ± 0.18^{c}
H37	1.11 ± 0.05^{a}	$1.09\pm0.13^{b,c}$
H49	$1.16\pm0.05^{a,b}$	1.05 ± 0.07^{b}
H50	$1.16\pm0.09^{a,b}$	$1.16\pm0.01^{b,c}$
H52	$1.27\pm0.10^{a,b,c,d}$	$1.16\pm0.04^{b,c}$
H60	$1.17\pm0.08^{a,b,c}$	-
H79	1.41 ± 0.08^{d}	$1.09\pm0.03^{b,c}$
H80	$1.22\pm0.02^{a,b,c,d}$	$1.16\pm0.08^{b,c}$
H87	$1.34\pm0.22^{b,c,d}$	-

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงการมีค่าเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

แสดงค่า mean ± SD ของวงใสในการยับยั้ง,

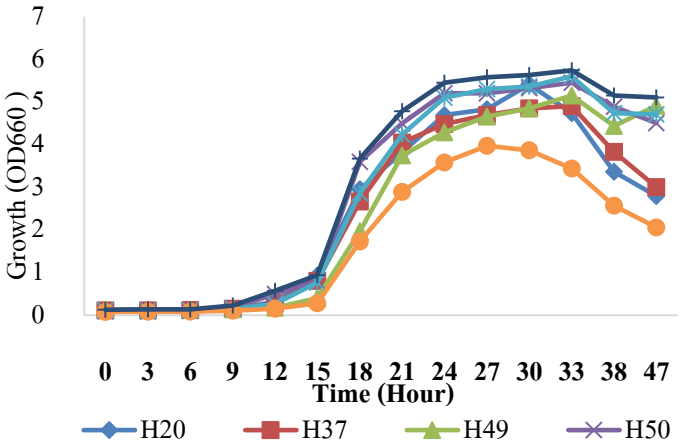
- หมายถึง ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้

ยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค ได้แก่ *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* และ *Aeromonas hydrophila* ทนต่อสภาพความเป็นกรดสูงที่ pH 3 ทนต่อเกลือน้ำดีเข้มข้นร้อยละ 0.3 อีกทั้งยังสามารถต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ นอกจากนี้ยังพบว่ามีแบคทีเรียจำนวน 36 ไอโซเลท ที่สามารถทนต่ออุณหภูมิ สูงที่ 45 องศาเซลเซียส จากการศึกษาของ คมแข และคณะ (2553) พบว่าแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท Sb2 ซึ่งแยกได้จากระบบทางเดินอาหารของปลากะพง สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์แกรมบวกและแกรมลบ ในขณะที่วลัยพร และคณะ (2544) พบว่า *Lactobacillus plantarum* และ *Lactobacillus casei* ที่คัดแยกได้จากลำไส้สัตว์น้ำจืด ไส้ไก่ มูลสุกร มูลวัว ผลิตภัณฑ์นม และผลิตภัณฑ์หมักดอง สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคในกุ้งก้ามกราม ได้แก่ *Aeromonas sobria* และ *Vibrio alginolyticus*

การที่แบคทีเรียแลกติกสามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้นั้น อาจเนื่องจากแบคทีเรียแลกติกสามารถเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสที่เป็นส่วนประกอบในอาหาร MRS ไปเป็นกรดแลกติก อีกทั้งการบ่มเชื้อในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนทำให้แบคทีเรียแลกติกสามารถสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ดังนั้นจึงสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ เช่นเดียวกับที่มีรายงานการยับยั้งจุลินทรีย์ของแบคทีเรียแลกติก (มลิวรรณ, 2542) นอกจากนี้แบคทีเรียแลกติกยังสามารถผลิต extracellular product ได้แก่ กรดแลกติก ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไดอะซิทิล และแบคเทอริโอซิน ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์และแบคทีเรียก่อโรคหลายชนิด มีรายงานว่าแบคเทอริโอซินสามารถยับยั้งแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ซึ่งส่วนใหญ่เชื้อก่อโรคในสัตว์น้ำจะเป็นแบคทีเรียแกรมลบ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำแบคทีเรียแลกติกมาใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (Verschuere *et al*., 2000)

5. การเจริญของแลกติกแอซิดแบคทีเรีย

จากการศึกษาการเจริญของแบคทีเรียแลกติกที่มีสมบัติในการเป็นโพรไบโอติกจำนวน 7 ไอโซเลต (H20, H37, H49, H50, H52, H79 และ H80) ที่ระยะเวลาต่างๆ คือ 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 38 และ 47 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียแลกติกไอโซเลต H 20 สามารถเจริญได้สูงสุดที่เวลา 30 ชั่วโมง ในขณะที่แบคทีเรียแลกติกไอโซเลต H37, H49, H50, H52, H79 และ H80 สามารถเจริญเติบโตได้สูงสุดที่เวลา 33 ชั่วโมง (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 การเจริญเติบโตของแบคทีเรียแลกติก

6. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างสารยับยั้งของแบคทีเรียแลกติกที่มีสมบัติการเป็นโพรไบโอติก

6.1 ผลของ pH ต่อการเจริญและการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

โดยทั่วไปแบคทีเรียแลกติกสามารถเจริญได้ในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่ค่อนข้างกว้าง (pH 4-7.5) แต่ในสภาวะความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมทั่วๆ ไป คือ pH 6-6.5 แต่เนื่องจากแบคทีเรียแลกติกสามารถใช้น้ำตาลและสร้างเป็นกรดแลกติกมีผลทำให้ความเป็นกรด-ด่างของอาหารลดลงจึงมีผลทำให้เชื้อเจริญได้ช้าลง จากการศึกษาผลของ pH ต่อการสร้างสารยับยั้งของแบคทีเรียแลกติกจำนวน 7 ไอโซเลต พบว่าแบคทีเรียแลคติกสามารถสร้างสารยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์ได้ทั้ง 2 สายพันธุ์ คือ

V. harveyi และ *V. parahaemolyticus* ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 0.05 โดยแบคทีเรียแลคติกสามารถสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงที่ pH 6.0 (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ผลของ pH และอุณหภูมิต่อการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยวิธีการ well diffusion

Isolate number	Antibacterial activity by agar well diffusion (cm)					
	pH 5.0		pH 5.5		pH 6.0	
	V. parahaemolyticus	*V. harveyi*	*V. parahaemolyticus*	*V. harveyi*	*V. parahaemolyticus*	*V. harveyi*
H20	1.29±0.02^{c}	1.4±0.07^{d}	1.33±0.03^{b}	1.31±0.03^{a}	1.36±0.02^{a,b}	1.41±0.02^{a,b}
H37	1.13±0.03^{a}	1.05±0.03^{a}	1.25±003^{a,b}	1.3±0.03^{a}	1.39±0.04^{b,c,d}	1.34±0.02^{a}
H49	1.16±0.01^{a}	1.13±0.05^{a,b}	1.28±0.05^{a,b}	1.3±0.04^{a}	1.30±0.06^{a}	1.42±0.03^{b}
H50	1.19±0.02^{a,b}	1.15±0.05^{a}	1.29±0.03^{a}	1.32±0.03^{a}	1.41±0.02^{c,d}	1.36±0.04^{a}
H52	1.23±0.04^{b,c}	1.25±0.02^{b,c}	1.30±0.06^{b}	1.28±0.02^{a}	1.34±0.03^{a,b,c}	1.38±0.04^{a,b}
H79	1.33±0.04^{d}	1.32±0.09^{c}	1.34±0.04^{a,b}	1.35±0.04^{a}	1.36±0.03^{a,b,c,d}	1.39±0.01^{a}
H80	1.22±0.05^{c}	1.16±0.04^{a}	1.27±0.04^{a,b}	1.3±0.04^{a}	1.43±0.03^{d}	1.38±0.02^{a}

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงถึงการมีค่าเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

แสดงค่า mean ± SD ของวงใสในการยับยั้ง

6.2 ผลของอุณหภูมิต่อการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อให้ได้ปริมาณเชื้อที่มาก และสามารถผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ได้ในปริมาณสูงจำเป็นต้องควบคุมอุณหภูมิให้เหมาะสมกับการเจริญของจุลินทรีย์สายพันธุ์นั้นๆ จากการทดลองพบว่าแบคทีเรียแลกติกจำนวน 7 ไอโซเลต สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ทั้ง 2 สายพันธุ์ คือ *V. harveyi* และ *V. Parahaemolyticus* มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 0.05 ซึ่งผลการยับยั้งดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลกติกที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 6) โดยแบคทีเรียแลกติกมีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดที่ pH 6.0 ที่ระยะเวลา 33 ชั่วโมง

การนำจุลินทรีย์มาใช้เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์แต่ละชนิด ควรเลือกใช้จุลินทรีย์ประจำถิ่น (normal flora) ของสัตว์ชนิดนั้นๆ เนื่องจากมีลักษณะเป็นโพรไบโอติกที่ดี โดยสามารถอยู่รอดและทำงานได้ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ ช่วย

ส่งเสริมการเติบโต ช่วยต้านทานการเกิดโรค และไม่เป็นสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรค (Fuller, 1992) จากการทดลองพบว่าแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้มีสมบัติในการเป็นโพรไบโอติก ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่ช่วยส่งเสริมการเพาะเลี้ยงกั้งตั๊กแตนและสัตว์น้ำอื่นๆ ซึ่งจะช่วยแก้ไขปัญหาการขาดแคลนกั้งตั๊กแตนได้ การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาในเบื้องต้น ดังนั้นจึงควรศึกษาเพิ่มเติมถึงสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญ และการเก็บรักษาโพรไบโอติกแบคทีเรียให้มีอัตราการรอดชีวิตอยู่ในระดับที่ทนต่อสภาวะจำลองในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กของกั้งตั๊กแต่และสัตว์น้ำอื่นๆ ซึ่งต้องทำในระดับ *in situ* และ *in vivo* ต่อไป

ตารางที่ 6 ผลของอุณหภูมิต่อการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยวิธีการ well diffusion

Isolate number	Antibacterial activity by agar well diffusion (cm)			
	Temperature 30 °C		Temperature 35 °C	
	V. parahaemolyticus	*V. harveyi*	*V. parahaemolyticus*	*V. harveyi*
H20	1.25±0.03[c]	1.14±0.05[b,c]	1.39±0.01[b]	1.36±0.01[b]
H37	1.23±0.02[a,b,c]	1.05±0.03[a]	1.33±0.08[a]	1.34±0.02[b]
H49	1.16±0.01[a]	1.13±0.04[b,c]	1.38±0.11[a]	1.30±0.03[b]
H50	1.19±0.02[a,b]	1.15±0.05[a,b]	1.34±0.08[a]	1.32±0.02[b]
H52	1.23±0.04[b,c]	1.25±0.02[d]	1.3±0.05[a,b]	1.28±0.02[a]
H79	1.23±0.04[c]	1.22±0.02[c,d]	1.34±0.04[a,b]	1.35±0.03[b]
H80	1.22±0.03[c]	1.16±0.45[b,c]	1.38±0.06[a,b]	1.36±0.01[b]

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงถึงการมีค่าเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

แสดงค่า mean ± SD ของวงใสในการยับยั้ง

สรุป

แบคทีเรียแลกติกจำนวน 139 ไอโซเลต ที่แยกได้จากทางเดินอาหารของกั้งตั๊กแตนมีสมบัติการเป็นโพรไบโอติก โดยสามารถเจริญและสร้างสารยับยั้ง *V. harveyi* และ *V. Parahaemolyticus* ได้ที่เวลา 33 ชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงที่ pH 6.0 และอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ในการนำแบคทีเรียแลกติกไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช ที่ให้ทุนอุดหนุนวิจัย

ขอขอบคุณศูนย์วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ที่สนับสนุนสถานที่และเครื่องมือในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

คมแข พิลาสมบัติ, จุฑารัตน์ เศรษฐกุล และ อดิศร เสวตวิวัฒน์. 2553. สมบัติการเป็นโปรไบโอติกของแบคทีเรียกรดแลกติกที่ผลิตแบคทิโอชินซึ่งคัดแยกได้จากระบบทางเดินอาหารของปลากะพง. **วารสารเกษตรพระจอมเกล้า** 28(3): 1-8.

ดนุวัต เพ็งอ้น, ภัทธนาวรรณ์ พรมนิ่ม และ สุชัญญา อรุณรุ่งโรจน์. 2551. การแยกและคัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรียเพื่อใช้ในปลา. *ใน* **บทคัดย่อการประชุมทางวิชาการ ประจำปี 2551.** มหาวิทยาลัยแม่โจ้, เชียงใหม่.

มลิวรรณ ส่งเสริม. 2542. **การยับยั้ง *E. coli* O157: H7 และ *Listerria monocytogenes* ของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากนมและผลิตภัณฑ์นม.** ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.

มณฑกานต์ ทองสม. 2547. แบคทีเรียแลกติกในระบบทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

วลัยพร ทิมบุญธรรม, มังกร โรจน์ประภากร, สุริยา สาสนรักกิจ, เสรี เจริญกิจมงคล และ เปรมสุดา สมาน. 2544. การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม, น. 370-377. *ใน* **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 39 (สาขาอุตสาหกรรมเกษตร).** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์. 2538. **เอกสารประกอบการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่องการจำแนกและการใช้ประโยชน์จากแบคทีเรียผลิตกรดอะซิติคและกรดแลคติค.** ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

Austin, B., Stuckey, L.F., Robertson, P.A., Efendi, I. and Griffith, D. R. W. 1995. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases cause by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrioordalii*. **Journal of Fish Diseases** 18: 93-96.

Conway, P. L. 1997. Development of intestinal microbiota, pp 3-38. *In* Mackie, R.I., White, B. A. and Isaacson, R. E. , eds. **Gastrointestinal microbes and Host Interaction.** Chapman & Hall, New York.

Fuller, R. 1992. **Probiotic the scientific basis.** Chapman & Hall, London.

Dempsey, A.C. and Rosson, R.A. 1989. Bacterial variability among individual penaeid shrimp digestive tracts. **Crustaceana** 56: 267-276.

Duangchitchareon, Y. 2006. Selection of Probiotic lactic acid Bacteria from Pickles and Fermented Plant Product. Master of Science Degree Thesis, Chiang Mai University.

Gournier-Chateau, N., 1994. La microflore intestinale et son role. pp. 9-38. *In* Gournier-Chateau, N., Larpent, J.P., Castellanos, I., Larpent, J.L., eds. **Les Probiotiques en Alimentation Animale**

et Humaine. Technique et Documentation Lavoisier, Paris.

Jin, L.Z., Ho, Y.W., Ali, M.A., Abdullah, N. and Jalaludin, S. 1996. Effect of adherent *Lactobacillus* spp. on in vitro adherence of salmonellae to the intestinal epithelial cell of chicken. **Journal of Applied Bacteriology** 81: 201-206.

Ringo, E. and Gastesoupe, F.J. 1998. Lactic acid bacteria in fish: a review. **Aquaculture** 160: 177-203.

Spelhaug, S.R. and Halander, S.K. 1989. Inhibition of foodborne bacteria pathogens by bacteriocin from *Lactococcus lactis* and *Pediococcus pentosaceous*. **Journal of Food Protection** 52: 856-862.

Succi, M., Tremonte, P., Reale, A., Sorrentino, E. and Grazia, L. 2005. Bile salt and acid tolerance of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from *Parmioiano Reggiano* cheese. **FEMS Microbiology Letters** 244: 129-137.

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.

Yuthachit, P., Vaoravuthikunchai, S. and Suntinanalert, P. 1990. Studies of bacteria microbiota in the gastrointestinal tract of cultured tiger prawn (*Penaeus monodon*). **Journal of Science and Technology** 12: 151-157.