ว.วิทย. มข. 41(2) 404-413 (2556) KKU Sci. J. 41(2) 404-413 (2013)

การคัดเลือกและการจำแนกชนิดแบคทีเรียที่แยกได้จากทางเดินอาหารของกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii* de Man)

Screening and Identification of Bacteria Isolated from Giant Freshwater Prawn (*Macrobrachium rosenbergii* de Man)

อรวรรณ์ บุตรดี[1] *พรพรรณ อู่สุวรรณ*[1] *และ กัญญา สอนสนิท*[2*]

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้ ได้ทำการทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นของเชื้อจุลินทรีย์โพรไบโอติก เพื่อนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกราม ที่แยกได้จากทางเดินอาหารของกุ้งก้ามกรามจากคลองธรรมชาติ ในจังหวัดนครปฐม แยกเชื้อได้ทั้งหมด 442 ไอโซเลท เป็นเชื้อที่ติดสีแกรมบวกจำนวน 237 ไอโซเลท เมื่อนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรค 4 ชนิด ได้แก่ *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli*, *Vibrio harveyi* และ *Vibrio parahaemolyticus* ด้วยวิธีซึมผ่านวุ้น พบว่าได้เชื้อที่สร้างโซนใสรอบโคโลนีของเชื้อก่อโรค จำนวน 8 ไอโซเลท และได้เชื้อที่ไม่สร้างโซนใส แต่สามารถเจริญคลุมพื้นที่โคโลนีของเชื้อก่อโรคได้ดี จำนวน 5 ไอโซเลท จากการจัดจำแนกเชื้อโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสในส่วนของยีน 16S rDNA พบว่า เชื้อทั้งหมด เป็นเชื้อที่อยู่ในสกุลบาซิลลัส ได้แก่ *B. pumilus* TSN33, *B. pumilus* LLBM499, *B. subtilis* TSM33, *B. subtilis* TSM262, *B. subtilis* LLBM241, *B. subtilis* TSN262, *B. aryabhattai* TSM362, *B. amyloliquefaciens* TSN63, *B. amyloliquefaciens* TSM499-4, *B. cereus* HMN142, *B. cereus* LLBM202, *B. thuringiensis* HMN151 และ *B. licheniformis* HMN152 เชื้อเหล่านี้ จึงมีคุณสมบัติเบื้องต้นในการคัดเลือกไปใช้เป็นโพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามต่อไปได้

[1]โปรแกรมวิชาเกษตรศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม อ.เมือง จ.นครปฐม

[2]โปรแกรมวิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม อ.เมือง จ.นครปฐม

*Corresponding Author, E-mail: Oboodde@yahoo.com

ABSTRACT

In this study, the preliminary character of probiotic bacteria which were isolated from the gastrointestinal tract of Giant Freshwater Prawn (*Macrobrachium rosenbergii* de Man) from natural canel in Nakhon Pathom province Thailand were studied. Out of 442 isolates of gram positive bacteria detected were tested for growth inhibition activity against 4 pathogenic bacteria which were *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli*, *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyicus* by Agar Well Diffusion Assay method. The result showed that 8 isolates of *Bacillus* species were able to form clear zone. Five isolates grew rapidly and covered the pathogenic-bacterial colonies. The genetic analysis by 16S rRNA gene sequenceing identified that all bacterial isolates are *B. pumilus* TSN33, *B. pumilus* RBM499, *B. subtilis* TSM33, *B. subtilis* TSM262, *B. subtilis* LLBM241, *B. subtilis* TSN262, *B. aryabhattai* TSM362, *B. amyloliquefaciens* TSN63, *B. amyloliquefaciens* TSM499-4, *B. cereus* HMN142, *B. cereus* LLBM202, *B. thuringiensis* HMN151 and *B. licheniformis* HMN152. These bacteria can be selected as the probiotic agents for giant freshwater prawn.

คำสำคัญ: โพรไบโอติก กุ้งก้ามกราม บาซิลลัส 16S rRNA

Keywords: Probiotics, Giant freshwater prawn, Bacillus 16S rRNA

บทนำ

กุ้งก้ามกรามเป็นกุ้งน้ำจืดที่พบทั่วไปในแหล่งน้ำธรรมชาติ และสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ทั้งน้ำกร่อยและน้ำจืด ที่ผ่านมาความอุดมสมบูรณ์ของกุ้งก้ามกรามในแหล่งน้ำธรรมชาติลดลงเรื่อย ๆ เนื่องจากสาเหตุหลายประการ เช่น การทำประมงผิดวิธี การระบาดของโรค ตลอดจนปัญหามลภาวะสิ่งแวดล้อม จึงมีการเพาะเลี้ยงเพื่อชดเชยจากธรรมชาติ จนกลายเป็นอาชีพหนึ่งที่ทำรายได้ให้กับเกษตรกรจนถึงปัจจุบัน กุ้งก้ามกรามเป็นสัตว์น้ำที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจและมีราคาแพง ส่งเป็นสินค้าออก และทำรายได้ให้กับประเทศ จากข้อมูลของกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ปี 2553 ได้รายงานไว้ว่า กุ้งก้ามกรามเป็นสัตว์น้ำที่กำลังเป็นที่ต้องการของตลาดโลก โดยเฉพาะร้านอาหารไทยในต่างประเทศ มีตลาดส่งออกที่สำคัญ ได้แก่ สหรัฐอเมริกา จีน ออสเตรเลีย สิงคโปร์ เกาหลี และญี่ปุ่น (วชิรภรณ์, 2553) ซึ่งในปี 2553 มีปริมาณการส่งออกที่เพิ่มขึ้นถึง 2,081 ตันมีมูลค่า 364.5 ล้านบาท มีปริมาณการส่งออกมากที่สุดคือ ประเทศจีน สหรัฐอเมริกา เวียดนาม ตามลำดับ (กลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง, 2553) ทำให้มีการเพิ่มปริมาณการผลิตมากขึ้นกว่าเดิม แต่วิธีการเลี้ยงส่วนใหญ่ที่นำมาใช้ คือวิธีที่มีการลงทุนน้อย แต่เลี้ยงแบบหนาแน่น ทำให้มีปัญหาและอุปสรรคตามมา อาทิเช่น ลูกกุ้งมีอัตราการรอดต่ำ กุ้งโตช้า มีสภาพแคระแกร็น ทำให้เกิดโรคระบาดจากเชื้อไวรัส และเชื้อแบคทีเรียได้ง่าย ทำให้ผลผลิตไม่ได้ตามที่ควร เกษตรกรพึ่งสารเคมีและยาปฏิชีวนะเป็นหลัก ต้นทุนการผลิตที่สูงขึ้น ผลกระทบที่ตามมาอีกคือ เกิดการตกค้างของยาและสารเคมีในตัวกุ้ง ก่อให้เกิดอันตรายต่อบริโภคตามมา

(วิศณุ, 2541) ระยะหลังเกษตรกรหันมาทดลองการเลี้ยงกุ้งแบบชีวภาพ มีการทดลองนำแบคทีเรียโพรไบโอติกมาใช้ควบคุมและป้องกันแบบชีววิธีในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ โดยนำเชื้อแบคทีเรียบางชนิดที่สามารถเข้าไปยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ก่อโรค การใช้เอนไซม์หรือผลิตภัณฑ์ที่สกัดได้จากแบคทีเรียใส่ลงในน้ำหรืออาหารเพื่อป้องกันโรคและกระตุ้นให้สัตว์น้ำมีการเจริญเติบโตดีขึ้น (สนธิ, 2541)

จากข้อมูลดังกล่าว ชี้ให้เห็นว่าแบคทีเรียโพรไบโอติกมีความสำคัญ และมีความเป็นไปได้ในการนำมาใช้ในการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม วัตถุประสงค์ของการทำวิจัยครั้งนี้คือเพื่อศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นและคัดเลือกเชื้อที่มีความสามารถนำไปพัฒนาเป็นโพรไบโอติกเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามต่อไป

วัสดุและวิธีการดำเนินการวิจัย

1. การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค

นำตัวอย่างทางเดินอาหารส่วนที่เป็นกระเพาะและลำไส้ของกุ้งก้ามกรามจากคลองธรรมชาติ 3 แห่ง ได้แก่คลองท่าสาร (TS) คลองลำลูกบัว (LLB) คลองห้วยม่วง (HM) จำนวน 60 ตัวอย่าง นำมาทำความสะอาด ตัดเอาเฉพาะส่วนที่เป็นลำไส้และกระเพาะ นำมาบดด้วยแท่งแก้ว จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมด โดยวิธี pour plate ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA (plate count agar, Merck, Germany) และ MRS (de Man Rogosa and Sharpe, Himedia, India) ที่ประกอบด้วย 0.5% แคลเซียมคาร์บอเนต โดยเจือจาง 10 เท่า (serial dilution) ที่ระดับความเข้มข้น 10^{-1}-10^{-6} จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ก่อนนำมานับจำนวนแบคทีเรียจากจานเลี้ยง เชื้อที่มีโคโลนีอยู่ระหว่าง 25-250 โคโลนี นำโคโลนีที่แยกได้บนอาหาร PCA มาเขี่ยบนอาหาร NA (nutrient agar) ส่วนในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS จะคัดเลือกเฉพาะโคโลนีที่เกิดบริเวณโซนใสรอบ ๆ นำมาเขี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตรวจสอบโคโลนีเดี่ยว ๆ ทำซ้ำอีกครั้ง เพื่อทำให้เชื้อบริสุทธิ์มากขึ้น แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง จึงเขี่ยเชื้อนำไปย้อมสีแกรม จากนั้นคัดเลือกเฉพาะเชื้อแบคทีเรียที่ติดสีแกรมบวก มาทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรคด้วยวิธีซึมผ่านวุ้น (agar well diffusion assay) ดัดแปลงตามวิธีการของ Barefoot and Klaenhammer (1984) โดยทดสอบกับเชื้อก่อโรค 4 ชนิด ได้แก่ เชื้อ *Aeromonas hydrophila* , *Escherichia coli, V. harveyi* และ *Vibrio parahaemolyticus* โดยนำเชื้อทั้ง 4 ชนิด มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB (nutrient broth)ในปริมาตร 10 มิลลิลิตร เลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อ *V. harveyi* และ *V. paraheamolyicus* จะเลี้ยงในอาหาร NB ที่มี NaCl ผสมอยู่ ร้อยละ 2 นำเชื้อก่อโรคแต่ละชนิดผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ในปริมาตร 250 มิลลิลิตรที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ และทิ้งให้อุณหภูมิเย็นลง 45-50 องศาเซลเซียส ผสมเชื้อในวุ้นอาหารให้เข้ากันดี จากนั้นเทลงในจานเลี้ยงเชื้อ ทิ้งจนวุ้นแข็งตัว จึงทำการเจาะหลุมในแต่ละจาน จานละ 4 หลุม จากนั้นดูดเชื้อทดสอบลงในหลุม หลุมละ 50 ไมโครลิตร โดยหยดเชื้อ 1 หลุมต่อเชื้อ 1 ไอโซเลท บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสและวัดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีพร้อมบันทึกผล

2. การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกด้วยวิธีการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน16S rRNA

ตรวจสอบและจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ที่เพาะแยกได้ และมีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส โดยใช้ 16s rRNA universal primers คือ forward primer 5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3' reverse primer 5'ACGGCTACCTTGTTACGACTT 3' (Weisburg et al., 1991) ในการสังเคราะห์ DNA โดยนำโคโลนีของเชื้อที่แยกได้มาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ genomic DNA isolation kit (Favorgen®) มีวิธีการโดยย่อคือ นำเชื้อปริมาตร 200 ไมโครลิตรใส่ลงใน micro tube แล้วเติม RNase A ปริมาตร 4 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 2 นาที ครบเวลาจึงเติม 20 ไมโครลิตรของ proteinase K ที่มีความเข้มข้น 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จึงเติม PABG buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตรลงในหลอดตัวอย่างทุกหลอด แล้วนำไปวางลงใน heat box ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นนำมาปั่นที่ความเร็วรอบ 6,000 rpm.นาน 1 วินาที แล้วเติม 200 ไมโครลิตรของ 100% ethanol ผสมให้เข้ากันดี นำไปปั่นโดยใช้ความเร็วรอบ 6,000 rpm.นาน 30 วินาที นำไปผ่าน FABG Column ปั่นที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm นาน 1 นาที แล้วทิ้งส่วนใสที่อยู่ในหลอด ปั่นล้างด้วย 500 ไมโครลิตรของ buffer W1 อีกครั้งนาน 1 นาที ทิ้งส่วนใสในหลอดตัวอย่าง ปั่นล้างที่ 13,000 rpm นาน 1 นาที จากนั้นเติม elution buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ทำการ elute ให้ได้ DNA ของเชื้อ จากนั้นนำ DNA ที่ได้ มาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ มีวิธีการ คือ ทำการผสม mixture ประกอบด้วย 10 ไมโครลิตรของ 10X PCR buffer, 2 ไมโครลิตรของ 10 mM dNTP, 1 ไมโครลิตรของ 16S reverse primers ความเข้มข้น 20 mM, 1 ไมโครลิตรของ 16S forward primers ความเข้มข้น 20 mM, primer เติม 0.5 ไมโครลิตรของ Taq DNA polymerase ก่อนนำไปผสมกับ DNA template ใส่อัตราส่วน 1:10 (DNA template:mixture) เมื่อผสมเสร็จแล้วนำไปเข้าเครื่องพีซีอาร์ โดยโปรแกรมการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ใช้คือ initial denature ที่ 95 องศาเซลเซียส (3 นาที) denature ที่ 95 องศาเซลเซียส (1 นาที) annealing ที่ 42 องศาเซลเซียส (30 วินาที) extension ที่ 72 องศาเซลเซียส (2 นาที) จำนวน 35 รอบ และต่อด้วยขั้นตอน extension ที่ 72 องศาเซลเซียส (10 นาที) ตรวจสอบ PCR product ที่ได้บนอะกาโรสเจล ด้วยวิธีอีเล็กโทรโฟรีซิส โดยเทียบกับ 1 kb DNA marker (fermentas®) นำ DNA ของเชื้อผ่าน column เพื่อให้บริสุทธิ์มากขึ้นโดยใช้ genomic DNA purification kit (Favorgen®) จากนั้นส่งวิเคราะห์หาลำดับเบสด้วยเครื่อง auto sequencing ที่ First BASE Laboratories Sdn Bhd ประเทศมาเลเซีย นำผลที่ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน gene bank database ผ่านเวปไซต์ http//www.ncbi.nim.nih.gov/BLAST โดยใช้โปรแกรม BLAST version 2.2.5

3. การจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยวิธีทางชีวเคมี

นำเชื้อที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรค มาทดสอบเพื่อแยกชนิดด้วยชุดทดสอบ API 50 CHB โดยทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ให้บริสุทธิ์ (pure culture) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เขี่ยเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี phenol red เป็นอินดิเคเตอร์ นำไปวัดค่าความขุ่นให้ได้เท่ากับ 2.0 McFarland จึงดูดเชื้อในปริมาตร 120 ไมโครลิตร ลงในช่องที่บรรจุสารชีวเคมีชนิดแห้ง (dehydrated substrates) ซึ่งมีจำนวน 50 ช่อง บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน

24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงนำมาตรวจดูผล เพื่อตรวจสอบหาสปีชีส์ของเชื้อที่แยกได้ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป APICHB version 4.0 (BioMerieux, France) ผ่านเครือข่ายอินเตอร์เนต http//www.apiwep.biomerieux.com/servlet/Identify

ผลการวิจัย

1. ผลการแยกและคัดเลือกเชื้อที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคโดยวิธีซึมผ่านวุ้น (agar well diffusion assay)

จากการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ ได้เชื้อทั้งหมด 442 ไอโซเลท แบ่งเป็นเชื้อที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA จำนวน 256 ไอโซเลท เชื้อที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS มีจำนวน 186 ไอโซเลท เมื่อนำเชื้อทั้งหมดมาศึกษารูปร่างทางสัณฐานวิทยาด้วยการย้อมสีแกรม พบว่าสามารถแบ่งเชื้อได้เป็น 6 กลุ่มด้วยกัน คือ แบคทีเรียรูปกลมติดสีแกรมบวก จำนวน 110 ไอโซเลท แบคทีเรียรูปกลม ติดสีแกรมลบ จำนวน 84 ไอโซเลท แบคทีเรียรูปท่อนสั้นติดสีแกรมบวก จำนวน 105 ไอโซเลท แบคทีเรียรูปท่อนสั้นติดสีแกรมลบ จำนวน 101 ไอโซเลท แบคทีเรียรูปท่อนยาวแกรมบวก จำนวน 22 ไอโซเลท และแบคทีเรียรูปท่อนยาวย้อมติดสีแกรมลบ จำนวน 20 ไอโซเลท (ไม่ได้แสดงผลข้อมูล) เมื่อคัดเลือกเชื้อแกรมบวก จำนวน 237 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคด้วยวิธีซึมผ่านวุ้น พบว่า ได้เชื้อที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคโดยสร้างโซนใสรอบโคโลนีของเชื้อ จำนวน 8 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท TSM33, TSM262, LLBM241, TSN262, TSM362, TSN63, TSM499-4 และ HMN151 ซึ่งเชื้อทั้งหมด สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ 3 ชนิด ได้แก่ เชื้อ *A. hydrophila, E. coli* และ *V. harveyi* สำหรับเชื้อก่อโรค *V. parahaemolyticus* พบว่า ไม่มีเชื้อที่ยับยั้งได้ เชื้อที่สามารถยับยั้งได้ดีที่สุดมี 3 ไอโซเลท ได้แก่ เชื้อรหัส TSM33, HMN151 และ TSM499-4 (รูปที่ 1 2 และ 3) โดย เชื้อรหัส TSM33 ให้ค่าอัตราส่วนระหว่างโซนใสต่อโคโลนีของเชื้อทดสอบทั้ง 3 ชนิด ได้ดีที่สุด คือ 2.0, 2.0, และ 1.8 มิลลิเมตร รองลงมาคือเชื้อรหัส HMN151 วัดได้ 2.0, 1.5, 2.0 มิลลิเมตร และเชื้อรหัส TSM499-4 วัดได้ 1.5, 2.0, 1.5 มิลลิเมตร นอกจากนี้ ยังพบว่า มีเชื้อจำนวน 5 ไอโซเลท ที่ไม่สร้างบริเวณใสรอบโคโลนี แต่สามารถเจริญเติบโตได้รวดเร็ว เข้าคลุมพื้นที่ไม่ให้เชื้อก่อโรคเจริญเติบโตได้ ได้แก่เชื้อ TSN 33, HMN142, HMN152, LLBM202 และ LLBM499 (ตารางที่ 1)

2. ผลการจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกด้วยวิธีการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA

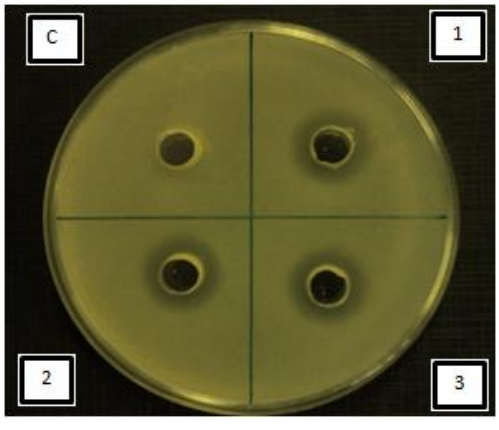
จากผลการทดลอง เมื่อนำเชื้อที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรค จำนวน 13 ไอโซเลท มาสกัดดีเอ็นเอ และเพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ 16s rDNA นำไปวิเคราะห์หาลำดับเบส เพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียในระดับสปีชีส์ พบว่าเชื้อทั้งหมด อยู่ในสกุลบาซิลลัส แยกได้เป็น 7 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ เชื้อ TSM33, TSM262, LLBM241 และ TSN262 เป็นเชื้อชนิดเดียวกันคือ *B. subtilis* กลุ่มที่ 2 ได้แก่ ไอโซเลท TSN 63 และ TSM499-4 คือเชื้อ *B. amyloliquefaciens* กลุ่มที่ 3 ไอโซเลท HMN151 เป็นเชื้อ *B. thuringiensis* กลุ่มที่ 4 ได้แก่ ไอโซเลท TSM 362 เป็นเชื้อ *B. aryabhattai* กลุ่มที่ 5 ได้แก่ ไอโซเลท TSN33 และ LLBM499 เหมือนเชื้อได้ 2 ชนิด คือ *B. pumilus* และเชื้อ *B. altitudinis* กลุ่มที่ 6 ได้แก่ ไอโซเลท HMN142 และ LLBM202 คือ เชื้อ *B. cereus* และกลุ่มที่ 7 ได้แก่ ไอโซเลท HMN152 คือเชื้อ *B. licheniformis*

ตารางที่ 1 แสดงรหัสและจำนวนเชื้อที่สามารถสร้างบริเวณใสเข้ายับยั้งเชื้อก่อโรค และแสดงเชื้อที่ไม่สร้างโซนใส แต่เจริญคลุมพื้นที่เชื้อก่อโรคได้ดี ทดสอบด้วยวิธีซึมผ่านวุ้น (agar well diffusion assay)

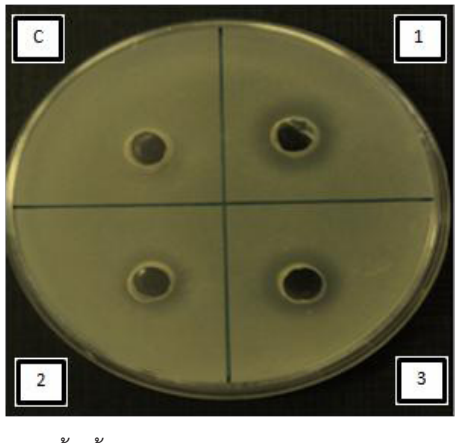
รหัสของเชื้อ	อัตราส่วนระยะความกว้างของโซนใส/ความกว้างของโคโลนีเชื้อทดสอบ (มม.)				
	A. hydrophilla	*E. coli*	*V. harveyi*	*V. parahaemolyticus*	หมายเหตุ
TSM33	2.0	1.8	2.0	-	
TSM262	1.2	1.2	1.2	-	
LLBM241	1.2	1.3	1.0	-	
TSN262	1.3	1.3	1.1	-	
TSM362	1.4	1.3	1.3	-	
TSN63	1.2	1.2	1.1	-	
TSM499-4	1.5	2.0	1.5	-	
HMN151	2.0	1.5	2.0	-	
TSN33	-	-	-	-	คลุมเชื้อก่อโรคได้ดี
HMN142	-	-	-	-	คลุมเชื้อก่อโรคได้ดี
HMN152	-	-	-	-	คลุมเชื้อก่อโรคได้ดี
LLBM202	-	-	-	-	คลุมเชื้อก่อโรคได้ดี
LLBM499	-	-	-	-	คลุมเชื้อก่อโรคได้ดี

ตารางที่ 2 แสดงการจัดจำแนกแบคทีเรียโพรไบโอติกด้วยชุดตรวจสอบ API50CHB และ 16S rRNA

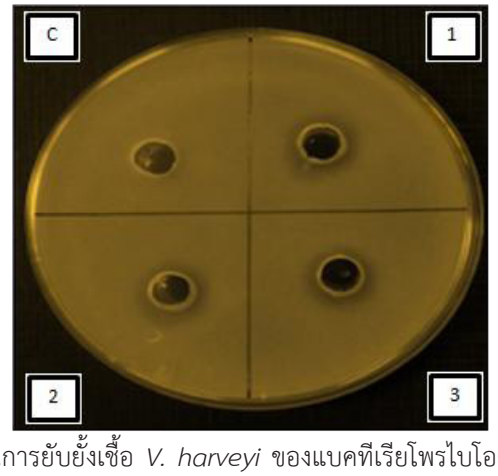
ไอโซเลท	การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย			
	ชุดตรวจ API 50 CHB		16S rRNA sequence analysis	
	Identification	% Identify	Identification	%Similarity
TSM33	*B. licheniformis*	91.0	*B. subtilis*	99.0
TSM262	*B. amyloliquefaciens, B. subtilis*	97.4	*B. subtilis*	99.0
LLBM241	*B. subtilis*	97.0	*B. subtilis*	99.0
TSN262	*B. subtilis*	97.0	*B. subtilis*	99.0
TSM362	*B. amyloliquefaciens, B. subtilis*	95.6	*B. aryabhattai*	99.0
TSN63	*B. licheniformis*	91.0	*B. subtilis*	99.0
TSM499-4	*B. amyloliquefaciens, B. subtilis*	98.8	*B. amyloliquefacien*	99.0
HMN151	*B. thuringiensis*	61.0	*B. thuringiensis*	99.0
TSN33	*B. pumilus, B. altitudinis*	91.0	*B. pumilus, B. altitudinis*	99.0
HMN142	*B. cereus*	97.0	*B. cereus*	99.0
HMN152	*B. licheniformis*	91.0	*B. licheniformis*	99.0
LLBM202	*B. cereus*	97.0	*B. cereus*	99.0
LLBM499	*B. pumilus, B. altitudinis*	91.0	*B. pumilus, B. altitudinis*	99.0



รูปที่ 1 แสดงความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *A. hydrophilla* ของแบคทีเรียโพรไบโอติก ได้แก่ C= Control, 1= *B. thuringiensis* HMN151, 2= *B. subtilis* TSM33 และ 3= *B. amyloliquefaciens* TSM499-4



รูปที่ 2 แสดงความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ของแบคทีเรียโพรไบโอติก ได้แก่ C= Control, 1= *B. thuringiensis* HMN151, 2= *B. subtilis* TSM33 และ 3= *B. amyloliquefaciens* TSM499-4



รูปที่ 3 แสดงความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *V. harveyi* ของแบคทีเรียโพรไบโอติก ได้แก่ C= Control, 1= *B. thuringiensis* HMN151, 2= *B. subtilis* TSM33 และ 3= *B. amyloliquefaciens* TSM499-4

3. ผลการจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีทางชีวเคมี

จากการศึกษาทางชีวเคมี โดยใช้ชุดตรวจสำเร็จรูป API50 CHB พบว่า ผลที่ได้มีความสอดคล้องกับวิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rRNA โดยสามารถแบ่งเชื้อได้ 7 สปีชีส์ ได้แก่ เชื้อ *B. subtilis, B. pumilus, B. amyloliquefaciens, B. thuringiensis, B. licheniformis* และ *B. cereus* เมื่อนำผลที่ได้ทั้งสองวิธีเปรียบเทียบกัน พบว่ามีจำนวน 11 โอโซเลทให้ผลที่มีความสอดคล้องกัน ได้แก่ *B. subtilis* TSM262, *B. subtilis* LLBM241, *B. subtilis* TSN262, *B. amyloliquefaciens* TSN63, *B. amyloliquefaciens* TSM499-4, *B. thuringiensis* HMN151, *B. cereus* HMN142 และ *B. cereus* LLBM202 ส่วนเชื้อที่ให้ผลที่ต่างกันจำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ เชื้อรหัส TSM33 ผลการวิเคราะห์ ด้วย 16SrRNA เป็นเชื้อ *B. subtilis* มีค่าความเหมือน (similarity) ที่ 99% แต่ให้ผลทางชีวเคมี เป็นเชื้อ *B. licheniformis* ซึ่งให้ผลการจำแนก (identify) สูงสุดที่ 91% เชื้อรหัส TSM362 ให้ผลการวิเคราะห์ ด้วย 16S rRNA เป็นเชื้อ *B. aryabhattai* มีค่าความเหมือน (similarity) ที่ 99% แต่ให้ผลทางชีวเคมี เป็นเชื้อได้ 2 ชนิด ได้แก่ *B. amyloliquefaciens* และ *B. subtilis* ผลการจำแนก (identify) สูงสุด ที่ 95.6% อย่างไรก็ตาม ควรต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม เพื่อให้สามารถแยกชนิดของเชื้อทั้ง 2 ชนิดนี้ให้ได้ถูกต้อง แม่นยำมากขึ้น

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

ผลการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จากทางเดินอาหารของกุ้งก้ามกราม พบว่าได้เชื้อที่มีคุณสมบัติเบื้องต้นในการเป็นโพรไบโอติกทั้งหมด 13 ไอโซเลท พบว่าเชื้อที่มีความสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ดี ได้แก่ เชื้อ *B. thuringiensis* HMN151, *B. subtilis* TSM33 และ *B. amyloliquefaciens* TSM499-4 สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ 3 ชนิด คือ *A. hydrophila, V. harveyi* และ *E. coli* โดยมีความยาวของเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสได้มากกว่าเชื้อชนิดอื่น ๆ โดยเชื้อ *B. thuringiensis* เป็นเชื้อที่พบในดิน และสามารถแยกได้จากลำไส้ของหนอนผีเสื้อหลายชนิด เชื้อชนิดนี้สามารถสร้างสารโปรตีนผลึกเข้าทำลายแมลงศัตรูพืช ถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายทางการเกษตร เช่นการนำมาใช้ควบคุมตัวอ่อนของหนอนใยผัก เนื่องจากเชื้อชนิดนี้ จะไม่ก่ออันตรายให้แก่มนุษย์ ปลา หรือสัตว์ชนิดอื่น ๆ (Madigan and Martinko, 2005) อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการนำเชื้อชนิดนี้ใช้เป็นโพรไบโอติก จึงควรที่จะมีการศึกษาการนำเชื้อชนิดนี้มาใช้เป็นโพรไบโอติกในกุ้งก้ามกรามต่อไป

เชื้อ *B. subtilis* เป็นเชื้อที่พบในสภาพแวดล้อมทั่วไป สามารถผลิต polypeptide antibiotics ได้แก่ bacitracin (Kenneth Todar University, 2006b) และผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิด ช่วยในการลอกของชั้นเมือกกุ้ง (slime layer) และยังช่วยย่อยสลายของเสียในบ่อกุ้ง ช่วยเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนโตรเจนและออกซิเจนโดยขบวนการ nitrification (Zymonutrients Private Limited, 2006) ปัจจุบันเป็นเชื้อที่ได้มีการพัฒนาเป็นโพรไบโอติกในทางการค้า (commercial probiotics) นำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในสัตว์น้ำ สำหรับเชื้อ *B. amyloliquefaciens* เป็นเชื้อที่สามารถผลิตสาร Polypeptide คือ Iturin ซึ่งมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อรา (antifungal agent) สามารถผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิด เช่น lipase, amylase, sucrase, protease และ peptidase ได้มีการศึกษานำเชื้อชนิดนี้ใช้ในการควบคุมราในโรคพืชได้หลายชนิด จึงเป็นเชื้อที่น่าสนใจ

ในการนำมาศึกษา เพื่อใช้เป็นโพรไบโอติกในกุ้งก้ามกรามได้อีกชนิดหนึ่ง

เชื้อ *B. ayahbhattai* มีรายงานการแยกเชื้อชนิดนี้ได้จากส่วนรากของพืชน้ำชนิดหนึ่ง เรียกว่า *Lamna* sp. เป็น เชื้อแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน ให้ผลบวกต่อเอนไซม์หลายชนิด เช่น oxidase, urease, gelatinase ช่วยในขบวนการ nitrate reduction และการย่อยสารจำพวกแป้งได้ มีความสามารถในการเจริญเติบโตได้ในอุณหภูมิต่ำถึง 4 องศาเซลเซียส แต่ไม่ทนอุณหภูมิที่มากกว่า 37 องศาเซลเซียส จากการศึกษาเบื้องต้น เชื้อชนิดนี้ให้ผลลบต่อการทดสอบการผลิตสารปฏิชีวนะ ปัจจุบันได้เริ่มมีนักวิจัยให้ความสนใจศึกษาคุณสมบัติในการผลิตยาปฏิชีวนะของเชื้อชนิดนี้เพิ่มเติม เพื่อจะนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านการแพทย์ (Semanti Ray, 2012) ในการวิจัยครั้งนี้พบว่า เชื้อชนิดนี้ให้ผลในการยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ 3 ชนิด คือ เชื้อ *A. hydrophila* , *E. coli* และ *V. harveyi* ประกอบกับเชื้อชนิดนี้สามารถเจริญได้ในอุณหภูมิต่ำ จึงมีความเหมาะสมที่จะคัดเลือกพัฒนาเป็นโพรไบโอติกได้ สำหรับเชื้อที่พบว่า ไม่สามารถสร้างบริเวณใสออกมายับยั้งเชื้อก่อโรค แต่สามารถเจริญเติบโตเข้าควบคุมเชื้อก่อโรคได้ดี ได้แก่ เชื้อ 3 ชนิด ได้แก่ เชื้อ *B. pumilus*, *B. licheniformis* และเชื้อ *B. cereus* โดยเฉพาะเชื้อ *B. pumilus*, *B. licheniformis* เป็นเชื้อที่มีการนำมาทดสอบใช้เป็นโพรไบโอติก ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยสามารถช่วยในการย่อยสลายสารอินทรีย์ และสารประกอบไคตินและสารตะกอนต่าง ๆ ในบ่อกุ้งได้ดี (สุวรรณา, 2549) สำหรับเชื้อ *B. cereus* นั้น มีความสามารถในการเจริญเติบโต เข้าแย่งพื้นที่เชื้อก่อโรคทั้ง 4 ชนิดได้ดี แต่เนื่องจาก เชื้อชนิดนี้ เป็นเชื้อที่สร้างสารพิษที่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ได้ จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติม หากนำมาใช้เป็นโพรไบโอติกต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา หน่วยงานชันสูตรโรคสัตว์ ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อก่อโรคทั้ง 4 ชนิด เพื่อใช้ในการทดลองครั้งนี้ และขอบคุณห้องปฏิบัติการวิจัยโรคทางสัตว์-เศรษฐกิจ ภาควิชาเวชศาสตร์และทรัพยากรการผลิตสัตว์คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ในการดำเนินการวิจัยครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ดี

เอกสารอ้างอิง

กลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง. (2553) พื้นที่การเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามและสถิติการส่งออก, แหล่งข้อมูล: http//fishco.fisheries.go.th/fish economic/bigshirm magazine: _magazine 52. ค้นเมื่อ วันที่ 29 มกราคม 2555.

วิศณุ บุญญาวิวัฒน์. (2541) โรคและความถดถอยทางพันธุกรรมของกุ้งก้ามกราม. จากการอภิปรายทางวิชาการงาน เกษตรแห่งชาติประจำปี 2541. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม.

วชิราภรณ์ ไกรอ่ำ. (2553) สถานการณ์กุ้งก้ามกรามไตรมาส 1 ปี 2552, แหล่งข้อมูล http//fishco.fisheries.go.th /fisheconomic/bigshirm magazine 52. ค้นเมื่อ วันที่ 29 มกราคม 2555.

สนธิ แดงสกุล และลิลา เรืองแป้น. (2541). ประสิทธิภาพของโพรไบโอติกที่ผลิตจาก *Bacillus* การเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. วารสารการประมง 51(5): 446-456.

สุวรรณา วรสิงห์. (2549).การตรวจหาแบคทีเรียบาซิลลัสและแลคโตบาซิลลัสในดิน น้ำ และเนื้อกุ้งของบ่อกุ้งกุลาดำ จังหวัดตราด สำนักวิจัยและพัฒนาประมง

ชายฝั่ง กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรุงเทพมหานคร. 44: 18 p.

Axelsson, L. (1998). Lactic acid bacteria: classification and physiology In, S. Salminen and A. Von Wright (eds). Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects, 2nd edition. New York: Marcel Dekker Inc. 1-72.

Barefoot, S.F. and Klaenhammer, T.R. (1984). Purification and characterization of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin lactacin B. Antimicrob Agents Chemother. Sep 26 (3): 328–334.

Kenneth Todar University. (2006b). Antimicrobial Agents Used in Treatment of Infectious Disease. Wisconsin-Madison Department of Bacteriology, http//www.textbookofbacteriolog.net/antimicrobial.html. 25 January 2012

Madigan, M. and Martinko, J. (2005). Brock Biology of Microorganisms. 11th Edn., New Jersey: Prentice Hall. USA.

Semanti, R. Rohini, D., Poilomi, B., Bodhisatwa C. and Arup, K M. (2012). From the space to earth: *Bacillus aryabhattai* found in the Indian sub-continent. Bioscience Discovery 3(1): 138-145.

Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., and Lane, D.J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. Journal of Bacteriology 173: 697-703.

Zymonutrients Private Limited. (2006). Probiopond. http//www.zeusindia.net/stimm.html.

❑❑❑❑❑