การคัดแยกโปรไบโอติกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Vibrio harveyi* และ *Vibrio parahaemolyticus* ในกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*, de Man)

Isolation of Probiotic Bacteria Protective Against *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus* Infection in Giant Freshwater Prawn (*Macrobrachium rosenbergii*, de Man)

กุสุมาวดี ฐานเจริญ[1*], จิราวรรณ ธงหาญ[1], สุพิชญา อุปปุย[1], วริดา พลาศรี[2]
Kusumawadee Thancharoen[1], Jirawan Thonghan[1], Supitchaya Auppui[1], Warida Palasri[2]
Received: 26 April 2017; Accepted: 30 April 2018

บทคัดย่อ

การคัดแยกแบคทีเรียจากทางเดินอาหารของกุ้งก้ามกราม โดยใช้ตัวอย่างกุ้งก้ามกราม จำนวน 45 ตัวอย่างที่มีน้ำหนัก 30-40 กรัม สามารถคัดแยกแบคทีเรียจำนวนทั้งหมด 327 ไอโซเลต คัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรค *Vibrio harveyi* และ *Vibrio parahaemolyticus* โดยพิจารณาจากการเกิดวงใสรอบโคโลนี พบว่า มีแบคทีเรียที่ยับยั้งเชื้อก่อโรคดังกล่าว จำนวน 118 และ 19 ไอโซเลตตามลำดับ จากผลการทดลองเชื้อรหัส PBKS289, PBKS292 และ PBKS184 ให้วงใสในการยับยั้ง *V.harveyi* สูงสุด เชื้อรหัส PBKS92, PBKS10, PBKS304 และ PBKS91 ให้วงใสในการยับยั้ง *V.parahaemolyticus* สูงสุด การศึกษาความทนต่อสภาวะต่างๆ ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้ง 7 ไอโซเลต พบว่า เชื้อรหัส PBKS289, PBKS292, PBKS184 PBKS92, PBKS10, PBKS304 และ PBKS91 สามารถทนต่อเกลือน้ำดีเข้มข้น 0- 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ทนต่อโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0- 9 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ส่วนใหญ่มีความทนพีเอชในช่วง 5-10 ยกเว้นเชื้อรหัส PBKS92 ทนพีเอชได้ถึง 3-10 ข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้สามารถคัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคจากจีนัส *Vibrio* และมีคุณสมบัติที่ดีในการเป็นโปรไบโอติกในการรอดชีวิตเมื่อใช้เป็นส่วนผสมในอาหารและเข้าสู่ทางเดินอาหารของกุ้ง นอกจากนี้ยังเป็นวิธีการในการลดการใช้ยาปฏิชีวนะและสารเคมี ซึ่งเป็นการลดสารตกค้างที่มีผลต่อผู้บริโภคและส่งผลให้กุ้งมีคุณภาพดีขึ้น

คำสำคัญ : การยับยั้ง, กุ้งก้ามกราม, เชื้อก่อโรค, โปรไบโอติก, วงใส

Abstract

Isolation of bacterial strains from the gastrointestinal tract by 45 samples giant freshwater prawns weighing 30-40 grams, found bacteria in 327 isolates. These were screened for antibacterial activity against shrimp pathogenic *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus* by the clear zone around the colonies. 118 and 19 bacterial isolates, were found the antibacterial activity against pathogenic *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus*, respectively. The results demonstrated that highest antibacterial activity was shown by seven strains, named PBKS289, PBKS292, PBKS92, PBKS10, PBKS304 and PBKS91. These bacteria were PBKS289, PBKS292, PBKS184 PBKS92, PBKS10, PBKS304 and PBKS91 grew well in a medium containing 0-5% (w/v) bile salt 0-9% NaCl (w/v) and pH 5-10 except PBKS92 could tolerate pH 3-10. The reults support the approach of screening using probiotic bacteria for activity against *Vibrio* species. The probiotics have a good effect on survival when used as a food in prawn culture. Moreover probiotic bacteria can reduce the need to use toxic chemicals and antibiotics in prawn culture.

Keywords : Antagonistic, Giant freshwater prawns, Pathogenic bacteria, Probiotics, Clear zone

---

[1] *สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม*

[2] *สาขาสถิติศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม*

*** Corresponding author. E-mail :** *Kthancharoen@gmail.com*

บทนำ

กุ้งก้ามกราม เป็นกุ้งน้ำจืดที่มีขนาดใหญ่ พบได้ทั่วไปตามแม่น้ำลำคลอง ลักษณะจะมีเปลือกสีเขียวอมฟ้าหรือสีม่วง ก้ามยาว มีสีครามหรือม่วงเข้ม กุ้งก้ามกรามสามารถพบได้ในภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้ของประเทศไทย ในต่างประเทศพบได้ทุกประเทศของภูมิภาคอินโดแปซิฟิก จนถึงตอนเหนือของออสเตรเลีย และฟิลิปปินส์ โดยพบในน้ำจืดและน้ำกร่อย กุ้งก้ามกรามเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญ และมีราคาแพง ได้รับความสนใจจากผู้บริโภคเป็นจำนวนมาก รวมทั้งในตลาดโลก จึงทำให้ปัจจุบันมีการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามกันอย่างแพร่หลาย จังหวัดกาฬสินธุ์เป็นอีกจังหวัดหนึ่งในภาคอีสานที่เกษตรกรมีการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามเชิงพาณิชย์จำนวนมากมีจำนวนฟาร์มเลี้ยงกุ้งก้ามกรามมากถึง 1,295 ราย แบ่งเป็นพื้นที่การเลี้ยง 6,220 ไร่ จำนวน 1,295 บ่อ ซึ่งมีจำนวนมากเนื่องจากมีแหล่งน้ำที่อุดมสมบูรณ์ได้รับน้ำจากเขื่อนลำปาว สภาพแวดล้อมเหมาะสมสำหรับการเลี้ยง อีกทั้งแรงงานในจังหวัดมีจำนวนมาก หาได้ง่าย และราคาค่าจ้างแรงงานค่อนข้างถูก สามารถผลิตกุ้งก้ามกรามป้อนให้กับผู้บริโภคได้มากกว่า 10,000 ตันต่อปี[1] ปัญหาของการเกิดโรคจากแบคทีเรียส่วนใหญ่มาจากการจัดการระหว่างการเลี้ยงโดยเลือกพื้นที่ไม่เหมาะสม ปล่อยกุ้งหนาแน่น ให้อาหารมากเกินไป ขาดการดูแลคุณภาพน้ำและสุขภาพกุ้ง โรคแบคทีเรียที่พบในกุ้งมักมีสาเหตุจากเชื้อ *V. harveyi*, *V. penaecida*, *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus*[2,3,4] เชื้อ *Vibrio* สามารถพบได้ทั่วไปในแหล่งน้ำเค็มและน้ำกร่อยเป็นสาเหตุของโรคกุ้งเกือบทุกชนิดที่พบในประเทศไทย โดยเป็นแบคทีเรียในกลุ่มไมโครฟลอร่า (microflora) พบได้ทั่วไปในธรรมชาติและบ่อเลี้ยงกุ้ง เป็นแบคทีเรียพวกฉวยโอกาส จะฉวยโอกาสทันทีเมื่อกุ้งอ่อนแอ ทำให้กุ้งเป็นโรค และอาจพบอยู่ร่วมกับเชื้อโรคชนิดอื่นๆ โดยทั่วไปแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถพบได้ในทางเดินอาหาร ตับ ตับอ่อน และน้ำเลือดของกุ้งที่เป็นปกติ เมื่อกุ้งอยู่ในสภาวะที่เครียด เช่น เกิดการติดเชื้อจากจุลินทรีย์ต่างๆ ปริมาณของแอมโมเนียในน้ำเพิ่มขึ้น อุณหภูมิมีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว และความเค็มที่สูงเกินไปก็สามารถก่อให้เกิดโรคได้ โรคที่ก่อให้เกิดปัญหาอย่างมากในการเลี้ยงกุ้ง คือ โรคแบคทีเรียเรืองแสง (luminescent disease) เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ลักษณะทั่วไปของโรคจะพบกุ้งป่วยขึ้นมาอยู่บริเวณขอบบ่อหรือว่ายอยู่ที่ผิวน้ำ ทำให้มองการเรืองแสงที่ส่วนหัวได้อย่างชัดเจนในเวลากลางคืน เมื่อนำกุ้งป่วยมาตรวจสอบโดยนำส่วนของตับและตับอ่อน หรือเลือดกุ้งมาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์จะพบแบคทีเรียท่อนสั้นเคลื่อนที่ได้จำนวนมาก มีผลทำให้กุ้งอ่อนแอ และตายในที่สุด[5] นอกจากนี้ยังมีโรคตายด่วนในกุ้ง (Shrimp Early Mortality Syndrome: EMS) หรือเรียกอีกชื่อว่ากลุ่มอาการตับและตับอ่อนเสื่อมสภาพอย่างฉับพลัน (Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome: AHPNS) โดยพบว่าโรคนี้เกิดจาก *Vibrio parahaemolyticus* เป็นสาเหตุของการตายเป็นจำนวนมากของกุ้งในระยะเวลาสองปีที่ผ่านมา ซึ่งได้สร้างความเสียหายเป็นวงกว้างต่อการเพาะเลี้ยงกุ้งในหลายประเทศในแถบเอเชีย[6] บ่อเลี้ยงกุ้งที่มีการติดโรคได้ประสบกับปัญหาการตายของกุ้งเป็นปริมาณสูงมากในช่วงระยะแรกของการเจริญเติบโตของกุ้ง ซึ่งอัตราการตายของกุ้งในบางฟาร์มอาจสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ อาการของโรคนี้ประกอบด้วยกุ้งอ่อนแอ โตช้า ไม่มีอาหารในกระเพาะและลำไส้ ตับและตับอ่อนมีสีซีดและฝ่อลีบ และมักจะพบเส้นสีดำภายในตับและตับอ่อน และจะพบการตายของกุ้งเป็นจำนวนมากภายใน 30 วันแรกของการลงกุ้งในบ่อเลี้ยง[7] ในอดีตจนถึงปัจจุบันการป้องกันและรักษาโรคในกุ้งเกษตรกรพึ่งสารเคมีและยาปฏิชีวนะเป็นหลัก ได้แก่ ยาปฏิชีวนะกลุ่มคลอแรมฟินิคอล ออกซิเตตร้าซัยคลิน ซัลฟานิลาไมด์ และไนโตรฟูแรน โดยการผสมในอาหารและใส่ในน้ำแช่และมีการใช้ยาติดต่อกันเป็นเวลานาน และมีการเพิ่มปริมาณยา เนื่องจากเชื้อก่อโรคดื้อยาและการใช้ยาปริมาณเท่าเดิมไม่ได้ผล ส่งผลให้มีต้นทุนการผลิตที่สูงขึ้น ผลกระทบที่ตามมาอีกคือ เกิดการตกค้างของยาและสารเคมีในตัวกุ้งก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค เทคโนโลยีชีวภาพได้มีความสำคัญอย่างยิ่งกับประเทศไทยในการพัฒนาอุตสาหกรรมการผลิตกุ้ง โดยมีวัตถุประสงค์ทดแทน หรือลดปริมาณการใช้สารเคมีให้อยู่ในสัดส่วนที่เหมาะสมเพื่อตอบสนองความต้องการของผู้บริโภคทั่วโลก โดยเฉพาะการวิจัยและพัฒนาสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพ ส่งเสริมการเจริญเติบโตและป้องกันการเกิดโรคระบาดในการเลี้ยงกุ้ง การควบคุมปริมาณเชื้อ *Vibrio* sp. ด้วยวิธีการทางชีวภาพ จากรายงานพบว่า มีเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *Nitrosomonas* sp., *Alteromonas* sp. และ *V. alginolyticus* ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะคัดแยกแบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นโปรไบโอติกที่ดีและมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรค *V.harveyi* และ *V. parahaemolyticus* ที่เป็นปัญหาสำคัญในกุ้งก้ามกราม

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการศึกษา

1. การคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย

นำตัวอย่างกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii* de Man) จำนวน 45 ตัวอย่าง น้ำหนัก 30-40 กรัม นำมาทำความสะอาด ตัดเอาเฉพาะส่วนที่เป็นลำไส้และกระเพาะอาหาร บดด้วยแท่งแก้ว จากนั้นเติมโซเดียมคลอไรด์

ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ในปริมาตร 5 มิลลิลิตรต่อตัวอย่าง 1 กรัม ทำการเจือจางตัวอย่าง (serial dilution) และ Spread Plate บนอาหาร Nutrient agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำให้เชื้อบริสุทธิ์อีกครั้งด้วยวิธี Cross streak บนอาหารชนิดเดิม ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และรูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรค

การทดลองครั้งนี้ มีแผนการทดลองแบบ CRD โดยคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคด้วยวิธีซึมผ่านกระดาษกรอง (Paper disc diffusion) โดยแบ่งเป็นสองชุดการทดลอง คือ ชุดการทดลองที่หนึ่ง ทดสอบคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกจากทางเดินอาหารของกุ้งก้ามกรามในการยับยั้งเชื้อก่อโรค คือ *V. harveyi* และชุดการทดลองที่สอง ทดสอบคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกจากทางเดินอาหารของกุ้งก้ามกรามในการยับยั้งเชื้อก่อโรค คือ *V. parahaemolyticus* (ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำชายฝั่ง จังหวัดสงขลา) โดยเลี้ยงในอาหาร NB (Nutrient Broth) ที่มี NaCl ผสมอยู่ 1.5เปอร์เซ็นต์ ในปริมาตร 20 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้เลี้ยงในอาหาร NB ปริมาณ 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หยดเชื้อแบคทีเรีย (เชื้อตั้งต้น $1x10^6$ CFU/ml) ที่คัดแยกได้ ปริมาตร 20 ไมโครลิตรลงบนกระดาษกรองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วและวางบนอาหาร NA ที่ผสมกับเชื้อก่อโรค บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บันทึกผลการยับยั้งจากการเกิดบริเวณใส (clear zone, แสดงในรูปแบบ mean±SD) รอบโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำค่าเฉลี่ยที่ได้ไปวิเคราะห์ผลทางสถิติ One way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธีของ Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับนัยสำคัญ ที่ $p \leq 0.05$

3. การทดสอบคุณสมบัติในการเป็นโปรไบโอติก (ดัดแปลงจากอรวรรณ์ และคณะ, 2556)

3.1 การเจริญในอาหารที่มีเกลือน้ำดี

เลี้ยงแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคเพาะเลี้ยงในอาหาร NB ที่มีส่วนผสมของเกลือน้ำดี 0-5เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงบันทึกผลจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

3.2 การเจริญในอาหารที่มีโซเดียม คลอไรด์

เลี้ยงแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคเพาะเลี้ยงในอาหาร NB ที่มีส่วนผสมของโซเดียมคลอไรด์ 0-9 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงบันทึกผลจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

3.3 การเจริญในอาหารพีเอชต่าง ๆ

เลี้ยงแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคเพาะเลี้ยงในอาหาร NB ที่มีการปรับพีเอชเท่ากับ 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง บันทึกผลจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

ผลการศึกษา

1. การคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย

ผลการคัดแยกแบคทีเรียที่คัดแยกจากทางเดินทางอาหารของกุ้งก้ามกรามมีทั้งหมด 327 ไอโซเลต โดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาส่วนใหญ่โคโลนีมีสีขาวขุ่น ขอบมีลักษณะแบบขอบเรียบ(Entire) ความนูนมีลักษณะแบนราบ (flat) เนื้อโคโลนีมีลักษณะมันวาว และรัศมีส่วนใหญ่มีขนาด 0.1-0.5 มิลลิเมตร แบ่งเป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างกลม 267 ไอโซเลต และแบคทีเรียที่มีรูปร่างท่อน 60 ไอโซเลต (ไม่ได้แสดงผล)

2. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรค

แบคทีเรียทั้งหมด 327 ไอโซเลต ทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรค *V.haveyi* และ *V.parahaemolyticus* โดยพิจารณาจากการเกิดวงใสรอบ ๆ โคโลนี โดยแสดงขนาดวงใสในการยับยั้งดังแสดงใน Table 1 และ 2

Table 1 The clear zone size (mean±SD) from probiotic bacteria inhibited *V. harveyi* at 48 hours. Means values with different letters significantly different (P < 0.05).

No.	Isolates	Clear zone size (mm.)
1	PBKS26	20±0.76
2	PBKS91	18±0.58
3	PBKS104	19±0.50
4	PBKS184	21±0.29
5	PBKS204	13±0.76
6	PBKS243	13±0.76
7	PBKS286	14±0.76
8	PBKS289	23±0.29
9	PBKS291	18±0.50
10	PBKS292	21±0.76

Table 2 The clear zone size from probiotic bacteria inhibited *V. parahaemolyticus* at 48 hours. Means values with different letters significantly different (P < 0.05).

No.	Isolates	Clear zone size (mm.)
1	PBKS10	20±0.50
2	PBKS35	10±1.00
3	PBKS89	16±0.29
4	PBKS91	18±0.29
5	PBKS92	24±0.76
6	PBKS271	13±0.29
7	PBKS272	14±1.00
8	PBKS304	18±0.29
9	PBKS309	11±1.00
10	PBKS317	9±0.58

จากผลการทดลองแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากทางเดินอาหารของกุ้งก้ามกราม จำนวน 118 ไอโซเลตที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรค*V.harveyi* โดยรหัสที่มีขนาดวงใสกว้างสูงสุด 10 ลำดับแรกจะมีวงใสตั้งแต่ 13-23 มิลลิเมตร เชื้อรหัส PBKS289, PBKS184 และ PBKS292 ให้ขนาดวงใสกว้างสูงสุด เท่ากับ 23, 21 และ 21 มิลลิเมตร และแบคทีเรีย จำนวน 19 ไอโซเลตที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรค*V.parahaemolyticus* โดยรหัสที่มีขนาดวงใสกว้างสูงสุด 10 ลำดับแรกจะมีวงใสตั้งแต่ 9-24 มิลลิเมตร เชื้อรหัส PBKS92, PBKS10, PBKS304 และ PBKS91 ให้ขนาดวงใสกว้างสูงสุด เท่ากับ 24, 20, 18 และ 18 มิลลิเมตร

3. การทดสอบคุณสมบัติในการเป็นโปรไบโอติก

3.1 ผลการทดสอบความทนต่อเกลือน้ำดี

ผลการทดสอบความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดี (Bile salt) พบว่า แบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้ง 7 ไอโซเลต ได้แก่ PBKS10, PBKS91, PBKS92, PBKS184, PBKS289, PBKS292 และ PBKS304 สามารถทนต่อเกลือน้ำดีความเข้มข้นสูงสุด 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) (ดังแสดงใน Figure 1)

3.2 ผลการทดสอบความทนต่อโซเดียมคลอไรด์

ผลการทดสอบความทนต่อโซเดียมคลอไรด์ของเชื้อที่เลี้ยงในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ผสมอยู่ 0-9 เปอร์เซ็นต์ พบว่า แบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้ง 7 ไอโซเลต ได้แก่ PBKS10, PBKS91, PBKS92, PBKS184, PBKS289, PBKS292 และ PBKS304 ทนต่อโซเดียมคลอไรด์ในช่วง 3-9 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยเชื้อรหัส PBKS92 สามารถทนต่อโซเดียมคลอไรด์ได้สูงที่สุด เท่ากับ 9 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) (ดังแสดงใน Figure 2)

3.3 ผลการทดสอบความทนต่อพีเอช

ผลการทดสอบความทนต่อพีเอช พบว่า แบคทีเรียที่คัดเลือกได้ส่วนใหญ่ทุกไอโซเลต ได้แก่ PBKS10, PBKS91, PBKS184, PBKS289, PBKS292 และ PBKS304 มีความทนต่อพีเอชในช่วง 5-10 ยกเว้นเชื้อรหัส PBKS92 สามารถทนต่อพีเอชในช่วง 3-10 (ดังแสดงใน Figure 3)

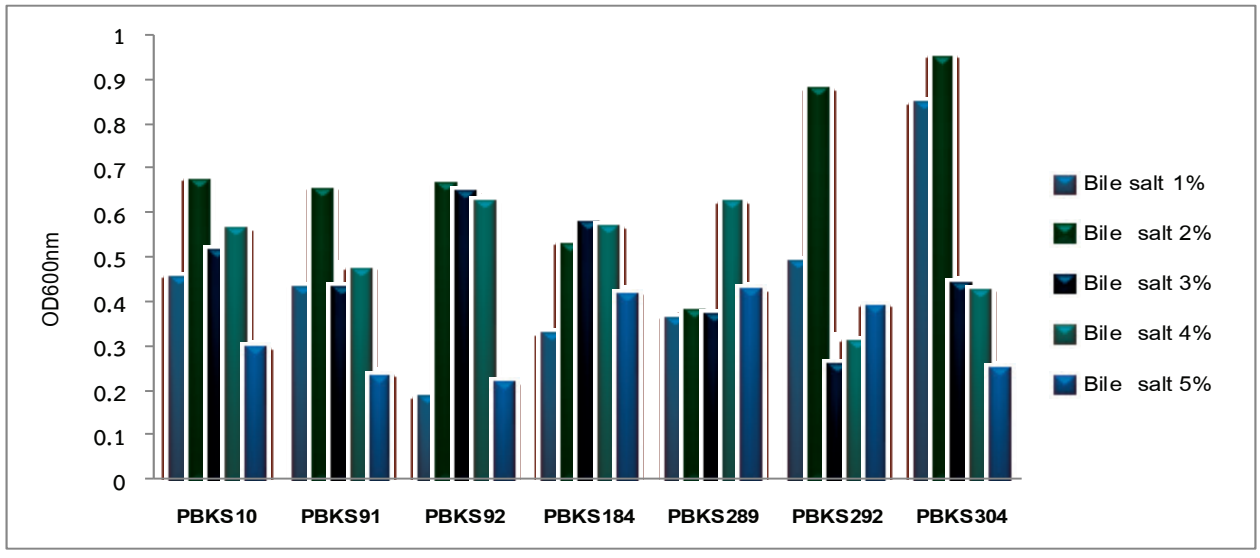

Figure 1 Bile salt tolerance of bacteria isolated from intestinal tract of Giant freshwater prawn.

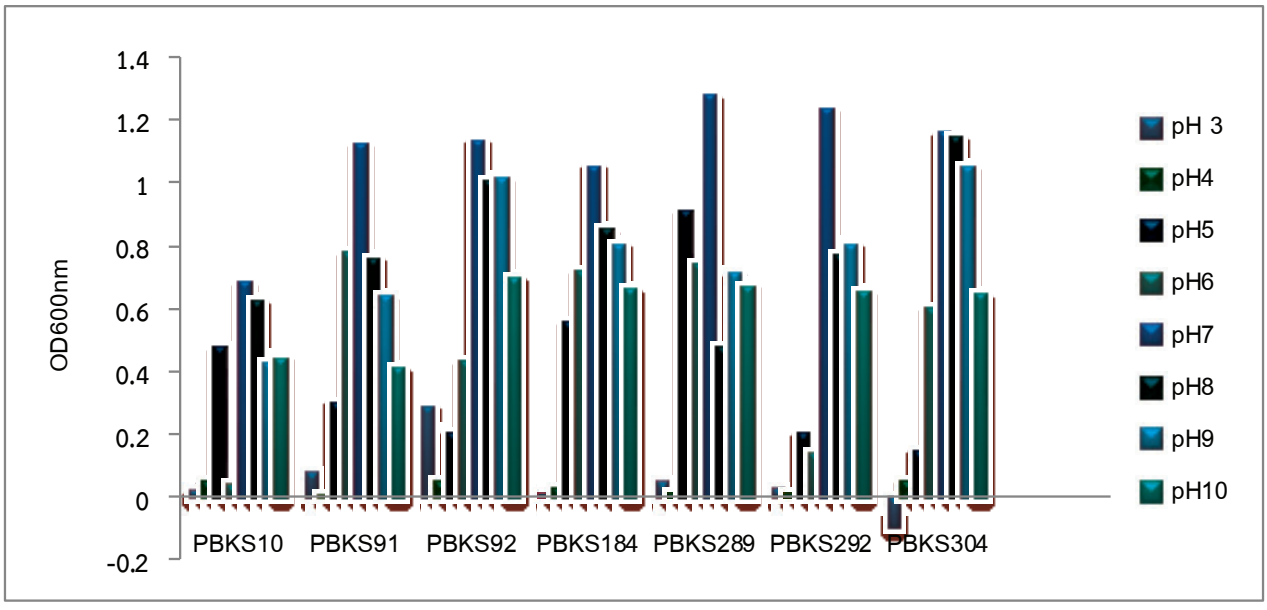

Figure 2 NaCl tolerance of bacteria isolated from intestinal tract of Giant freshwater prawn.

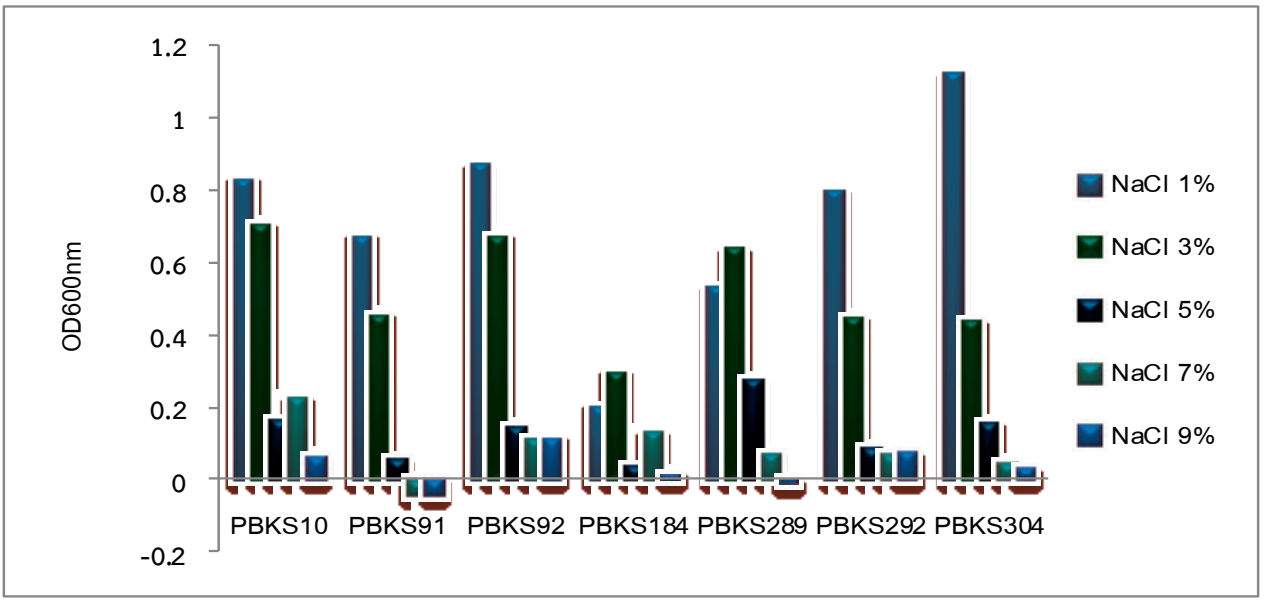

Figure 3 pH tolerance of bacteria isolated from intestinal tract of Giant freshwater prawn.

วิจารณ์และสรุปผล

ผลการคัดแยกแบคทีเรียจากทางเดินอาหารของกุ้งก้ามกรามพบว่า สามารถคัดแยกแบคทีเรียจำนวนทั้งหมด 327 ไอโซเลต โดยแบคทีเรียจำนวน 7 ไอโซเลต มีศักยภาพที่ดีในการใช้เป็นโปรไบโอติก โดยสามารถสร้างวงใสยับยั้งเชื้อก่อโรค *V. harveyi* และ *V. parahaemolyticus* และมีความทนต่อสภาวะต่างๆ คือ สามารถทนต่อเกลือน้ำดีความเข้มข้นสูงสุด 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ทนต่อโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นสูงสุด 3-9 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และทนต่อพีเอช 5-10 โดยคุณสมบัติดังกล่าวมีข้อดี

คือสามารถทนต่อสภาวะที่เป็นกรดในกระเพาะอาหาร ทนต่อเกลือน้ำดีในลำไส้ ซึ่งทำหน้าที่ขับสารตกค้าง และสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นได้ ดังนั้นคุณสมบัติเหล่านี้จึงจำเป็นต่อการรอดชีวิตของ โปรไบโอติกเมื่อผสมในอาหารเลี้ยงกุ้ง

ผลการทดลอง พบว่า แบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากความกว้างของวงใสสูงสุด ได้แก่ ได้แก่ PBKS10, PBKS91, PBKS92, PBKS184, PBKS289, PBKS292 และ PBKS304 มีคุณสมบัติในการทนต่อเกลือน้ำดี 1-5 เปอร์เซ็นต์ โดยที่ความเข้มข้นเกลือน้ำดีที่แบคทีเรียส่วนใหญ่เจริญได้ดีเท่ากับ 2 เปอร์เซ็นต์ (Figure 1) การทนโซเดียมคลอไรด์ในช่วง 1-9 เปอร์เซ็นต์ โดยที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ที่แบคทีเรียส่วนใหญ่เจริญได้ดีเท่ากับ 1 เปอร์เซ็นต์ (Figure 2) และความทนพีเอชในช่วง 3-10 โดย พีเอชที่แบคทีเรียส่วนใหญ่เจริญได้ดีเท่ากับ 5 (Figure 3) การศึกษาความทนต่อสภาวะดังกล่าวมีความจำเป็น เนื่องจากเมื่อใช้เป็นส่วนผสมในอาหารเลี้ยง กุ้งก้ามกราม โปรไบโอติกที่ดีต้องสามารถทนต่อความเป็นกรดในกระเพาะอาหาร ทนต่อเกลือน้ำดีในลำไส้ (ซึ่งมีหน้าที่ขับสารตกค้าง) และสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นได้จึงจะมีการรอดชีวิตและทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ สอดคล้องกับงานวิจัยของอรวรรณ์ และคณะ[8] ทดสอบความสามารถในการเจริญในสภาวะต่างๆ ได้แก่ ความเข้มข้นของเกลือน้ำดีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ การทนกรด-เบส และอุณหภูมิในระดับต่างๆ พบว่าแบคทีเรียทุก ไอโซเลตสามารถเจริญได้ดีในสภาวะความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่ 0-9 เปอร์เซ็นต์ เจริญได้ดีในสภาวะอุณหภูมิตั้งแต่ 20-42 องศาเซลเซียส เจริญได้ดีที่ พีเอช 5-9 แต่เจริญในเกลือน้ำดีได้เพียง 0-3 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำเชื้อทั้งหมดมาจำแนกโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสในส่วนของยีน 16S rDNA พบว่า แบคทีเรียทั้งหมดจัดอยู่ในสกุลบาซิลลัส ได้แก่ *B. subtilis* TSM33, *B. subtilis* TSM262, *B. subtilis* LLBM241, *B. subtilis* TSN262, *B. aryabhattai* TSM362, *B. amyloliquefacian* TSN63, *B. amyloliquefacian* TSM499-4 และ *B. thuringiensis* HMN151 ดังนั้นแบคทีเรียเหล่านี้จึงมีคุณสมบัติในการเป็นโปรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามต่อไปได้ และงานวิจัยของวลัยพร และคณะ[9] ทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็น โปรไบโอติกเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามที่แยกได้จากตัวอย่างลำไส้สัตว์น้ำจืด ไส้ไก่ มูลสุกร มูลวัว ผลิตภัณฑ์นม ผลิตภัณฑ์หมักดองจากเนื้อสัตว์และสัตว์ต่างๆ สามารถแยกเชื้อได้ทั้งหมด 267 ไอโซเลท เป็นเชื้อที่ติดสีแกรมบวก 178 ไอโซเลท และเมื่อนำเชื้อไปทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรคในกุ้งก้ามกรามได้แก่ *Aeromonas sobrai* และ *Vibrio alginolyticus* พบว่าเชื้อที่เจริญในอาหาร MRS จำนวน 54 ไอโซเลต มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในกุ้งก้ามกรามได้ จึงทำการทดสอบคุณสมบัติของเชื้อที่มีความเหมาะสมเพื่อใช้เป็นโปรไบ

โอติก โดยการทดสอบการย่อยเม็ดเลือดแดง การเจริญในความเข้มข้นของเกลือ (NaCl) 0-1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ความเข้มข้นเกลือน้ำดี 1-7 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ความเป็นกรดด่างตั้งแต่ 2 ถึง 10 การเจริญในสภาพที่มีและไม่มีอากาศ พบว่า เชื้อแบคทีเรียรหัส LP64 LM64 LM67 LM62-1 LM66 และ LS15 มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก ซึ่งจากการจำแนกเชื้อในระดับสปีชีส์ พบว่า เชื้อ LP64 และ LP15 เป็นเชื้อ *Lactobacillus plantarum* และเชื้อ LM64 LM67 LM62-1 และ LM66 เป็นเชื้อ *Lactobacillus casei*

จากผลการทดลองที่ได้จากงานวิจัยนี้ พบว่า ผลการคัดแยกแบคทีเรียจากทางเดินอาหารของ กุ้งก้ามกรามพบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียจำนวนทั้งหมด 327 ไอโซเลท โดยแบคทีเรียจำนวน 7 ไอโซเลท มีศักยภาพที่ดีในการใช้เป็นโปรไบโอติก โดยสามารถสร้างวงใสยับยั้งเชื้อก่อโรค *V. harveyi* และ *V. parahaemolyticus* และมีความทนต่อสภาวะต่างๆ คือ สามารถทนต่อเกลือน้ำดีความเข้มข้นสูงสุด 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ทนต่อโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นสูงสุด 3-9 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และทนต่อพีเอช 5-10 โดยคุณสมบัติดังกล่าวมีข้อดี คือสามารถทนต่อสภาวะที่เป็นกรดในกระเพาะอาหาร ทนต่อเกลือน้ำดีในลำไส้ ซึ่งทำหน้าที่ขับสารตกค้าง และสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นได้ ดังนั้นคุณสมบัติเหล่านี้จึงจำเป็นต่อการรอดชีวิตของ โปรไบโอติกเมื่อผสมในอาหารเลี้ยงกุ้ง โดยแบคทีเรียที่คัดเลือกได้มีศักยภาพที่ดีในการใช้เป็นโปรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามที่มีแพร่หลายในท้องถิ่นจังหวัดกาฬสินธุ์และจังหวัดใกล้เคียง โดยคัดเลือกเชื้อที่มีศักยภาพจากการพิจารณาวงใสในการยับยั้งเชื้อ *V. harveyi* ที่ทำให้เกิดโรคเรืองแสง และ *V. parahaemolyticus* ที่ทำให้เกิดโรคตัวแดงหรือโรค ขี้ขาว รวมทั้งความทนต่อสภาวะต่างๆที่เป็นปัจจัยต่ออารรอดชีวิตเมื่อโปรไบโอติกแบคทีเรียอาศัยอยู่ในลำไส้กุ้ง การใช้โปรไบโอติกที่มีศักยภาพจะทำให้เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งมีรายได้เพิ่มมากขึ้นและไม่มียาปฏิชีวนะหรือสารเคมีตกค้างในกุ้งก้ามกราม

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณกลุ่มเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งบัวบาน 1 ตำบลบัวบาน อำเภอยางตลาด จังหวัดกาฬสินธุ์ ในการให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างกุ้งก้ามกราม และอำนวยความสะดวกในการลงพื้นที่วิจัย สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำชายฝั่ง จังหวัดสงขลาที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อแบคทีเรีย ก่อโรค ตลอดจนสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม ในการสนับสนุนทุนวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2560 ทำให้งานวิจัยครั้งนี้ลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. สำนักงานประมงจังหวัดกาฬสินธุ์. การเลี้ยงกุ้งก้ามกราม. 2556.สืบค้นจากhttp://www.fisheries.go.th/fpo-kalasin/main.html. ค้นเมื่อวันที่ 21 กันยายน 2559.
2. Nash, G., Nithimathachoke, C., Tungmandi, C., Arkarjamorn, A., Prathanpipat, P.,Ruamthaveesub, P. Vibriosis and its control in pond-reared Penaeus monodon in Thailand. In: Shariff, I. M.. Subasinghe, R. P.. Arthur, J. R.(eds.) Diseases in Asian aquaculture. I. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila; 1992. 143-155.
3. Ishimaru, K. M., Akagawa, M., and Muroga, K. *Vibrio penaeicida* sp nov.: A pathogen of kuruma shrimp (*Penaeus japonicus*). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1995; 1: 134–138.
4. Lightner, D. V. Disease of culture penaeid shrimp. *In* “Handbook of Mariculture: Crustacean Aquaculture” (J. P. McVey, Ed.), 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL.; 1996.
5. ปาจรีย์ จือเหลียง, ชลอ ลิ้มสุวรรณ, นิติ ชูเชิด และวัชริยา ภูรีวิโรจน์กุล. ผลของการใช้แบคทีเรียกลุ่มสร้างสปอร์ต่อ *Vibrio* spp. การเจริญเติบโต และอัตรารอดของกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) ในฟาร์มเลี้ยงกุ้ง . วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง. 2555; 6 (1): 65-74.
6. องค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ (FAO). 2556. สาเหตุของการตายเป็นจานวนมากของกุ้งในเอเชีย. สืบค้นจาก www.fisheries.go.th/ems/images/15.05.56/FAO%20Cause%20of%20AHPNS_p.pdf. ค้นเมื่อวันที่ 11 ธันวาคม 2559.
7. วิกิพีเดีย. โรคกุ้งตายด่วน. 2559. สืบค้นจาก www.fisheries.go.th/ems/images/15.05.56/FAO%20Cause%20of%20AHPNS_p.pdf. ค้นเมื่อวันที่ 11 ธันวาคม 2559.
8. อรวรรณ์ บตุรดี, พรพรรณ อู่สวุรรณ, และกัญญา สอนสนิท. การคัดเลือกเชื้อบาซิลลัสโพรไบโอติกจากทางเดินอาหารของกุ้งก้ามกรามจากคลองธรรมชาติในจังหวัดนครปฐม. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 2556; 2(1): 10-20.
9. วลัยพร ทิมบุญธรรม. การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไอติกในการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม. 2551, มิถุนายน. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39 สาขาอุตสาหกรรมเกษตร. 5 - 7 กุมภาพันธ์ 2544. 370-377. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.