# การคัดเลือกเชื้อบาซิลลัสโพรไบโอติกจากทางเดินอาหารของกุ้งก้ามกรามจากคลองธรรมชาติในจังหวัดนครปฐม

# Primary Selection For Probiotic Bacilli from Gastrointestinal Tract of Giant Fresh Water Prawn from Natural Canals in Nakhon Pathom Province

*อรวรรณ์ บุตรดี, [1*] พรพรรณ อู่สุวรรณ[1] และกัญญา สอนสนิท[2]*

***Orawan Boodde, [1*] Pornpun Usuwan[1] and Kanya sornsanit[2]***

## ABSTRACT

Probiotic bacteria have been more preferable for the control of contaminating bacterial diseases in prawn cultivation. This study attempted to isolate probiotic *Bacillus* spp. for the control of bacterial diseases of prawns from the gastrointestinal tract of fresh water prawn (*Macrobrachium rosenbergii* de Man) from three natural canals, Tasan (TS), Lam Luk Bua (LLB) and Huai Muang (HM) in Nakhon Pathom province, Thailand during July to October 2011. The bacterial isolates were purified. Their ability in inhibiting the growth of pathogenic bacteria by Agar Well Diffusion Assay and probiotic activities as abilities to grow in the presence of bile salt and high NaCl concentration were studied, The temperature and pH ranges for their growth were observed and species identification base on 16S rDNA gene sequencing was made. Eight satisfactory Bacillus isolates encoded as TSM33, TSM262, LLBM241, TSN262, TSM362, TSN63, TSM499-4 and HMN151 were obtained. They inhibited the growth of *Aromonas hydrophila*, *Vibrio harviyi* and *E. coli* but were unable to inhibit the growth of *V. parahaemolyticus*. All 8 isolates grew well in the medium containing 0-9% NaCl, pH 5-9 and at 20-42°C. However, They could not tolerate bile salt of higher concentration than 3 per cent. All isolates were identified as *Bacillus* spp. and as follows TSM33, TSM262, LLBM241 and TSN262 were *B. subtilis,* TSM362 was *B. aryabhattai*, TSN63 and TSN499-4 were *B. amyloliquefacians* while HMN 151 was *B. thuringiensis.* These results indicated that all isolates could probably be used as probiotics for giant fresh water prawn cultures.

**Keywords:** Probiotics, Giant Fresh water Prawn, Bacillus, 16Sr DNA

---

[1*] โปรแกรมวิชาเกษตรศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม อ.เมือง จ.นครปฐม 73000
Agricultural Program, Faculty of Science and Technology. Nakhon Pathom Rajabhat University 73000, Thailand.

[2] โปรแกรมวิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม อ.เมือง จ.นครปฐม 73000
Biology Program, Faculty of Science and Technology. Nakhon Pathom Rajabhat University, 73000, Thailand.

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

**บทคัดย่อ**

การศึกษาความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ที่คาดว่าเป็นประโยชน์ ซึ่งแยกได้จากทางเดินอาหารของกุ้งก้ามกรามจากคลองธรรมชาติ ได้แก่คลองท่าสาร (TS) คลองลำลูกบัว (LLB) และคลองห้วยม่วง (HM) ในเขตจังหวัดนครปฐม ระหว่างเดือน กรกฎาคม - ตุลาคม 2554 แยกเชื้อสกุลบาซิลลัส (Bacillus) ได้ จำนวน 8 ไอโซเลท ได้แก่ เชื้อไอโซเลท TSM33, TSM262, LLBM241, TSN262, TSM362, TSN63, TSM499-4 และ HMN151 นำเชื้อทั้งหมดมาทดสอบความสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค 4 ชนิด คือ *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio harviyi, Vibrio parahaemolyticus* และ *Escherichia coli* โดยวิธี Agar Well Diffusion Assay จากการศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อ พบว่า เชื้อทุกไอโซเลท สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ 3 ชนิด ได้แก่ *A. hydrophila*, *V. harviyi* และ *E. coli* แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *V. parahaemolyticus* เมื่อนำเชื้อทั้งหมดมาทดสอบความสามารถในการเจริญในสภาวะต่างๆ ได้แก่ ความเข้มข้นของ bile salt ความเข้มข้นของ NaCl การทนกรด-เบส และอุณหภูมิที่ระดับต่างๆ พบว่าเชื้อทุกไอโซเลทสามารถเจริญได้ดีในสภาวะความเข้มข้นของ NaCl ที่ 0-9% เจริญได้ดีในสภาวะอุณหภูมิตั้งแต่ 20-42 °C เจริญได้ดีในสภาวะที่มี pH 5-9 แต่พบว่าเชื้อทุกไอโซเลทเจริญในสภาวะเกลือน้ำดีได้เพียง 0-3 % เมื่อนำเชื้อทั้งหมดมาจำแนก โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสในส่วนของยีน 16S rDNA พบว่า เชื้อทั้งหมด เป็นเชื้อที่อยู่ในสกุลบาซิลลัส 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 ดังนั้นเชื้อเหล่านี้ จึงมีคุณสมบัติ เลือกใช้เป็นโพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามต่อไปได้

**คำสำคัญ:** โพรไบโอติก กุ้งก้ามกราม บาซิลลัส 16SrDNA

**คำนำ**

กุ้งก้ามกรามเป็นกุ้งน้ำจืดที่พบทั่วไปในแหล่งน้ำธรรมชาติ และสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ทั้งน้ำกร่อยและน้ำจืด ที่ผ่านมาความอุดมสมบูรณ์ของกุ้งก้ามกรามในแหล่งน้ำธรรมชาติลดลงเรื่อยๆ เนื่องจากสาเหตุหลายประการ เช่น การทำประมงผิดวิธี การระบาดของโรค ตลอดจนปัญหามลภาวะสิ่งแวดล้อม จึงมีการเพาะเลี้ยงเพื่อชดเชยจากธรรมชาติ จนกลายเป็นอาชีพหนึ่งที่ทำรายได้ให้กับเกษตรกรมากว่า 40 ปี ปัจจุบันกุ้งก้ามกรามเป็นสัตว์น้ำที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจและมีราคาแพง ส่งเป็นสินค้าออก และทำรายได้ให้กับประเทศได้มาก ทำให้มีการเพิ่มปริมาณการผลิตมากขึ้นกว่าเดิม เกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงยังคงมีวิธีการเลี้ยงแบบที่มีการลงทุนน้อย แต่เลี้ยงแบบหนาแน่น ทำให้มีปัญหาและอุปสรรคตามมา อาทิ เช่น ปัญหาลูกกุ้งมีอัตราการรอดต่ำ กุ้งโตช้า มีสภาพแคระแกรนทำให้เกิดโรคระบาดจากเชื้อไวรัส และเชื้อแบคทีเรียได้ง่าย ทำให้ผลผลิตไม่ได้ตามที่ควร เกษตรกรพึ่งสารเคมี และยาปฏิชีวนะเป็นหลัก ต้นทุนการผลิตที่สูงขึ้น ผลกระทบที่ตามมาอีกคือ เกิดการตกค้างของยาและสารเคมีในตัวกุ้ง ก่อให้เกิดอันตรายต่อการบริโภคตามมา ระยะหลังเกษตรกรหันมาทดลองการเลี้ยงกุ้งแบบชีวภาพ มีการนำแบคทีเรียโพรไบโอติกมาใช้ควบคุมและป้องกันแบบชีววิธีในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ โดยเฉพาะการใช้เชื้อแบคทีเรียบางชนิดที่สามารถเข้าไปยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ก่อโรค รวมไปถึงการใช้เอนไซม์หรือผลิตภัณฑ์ที่สกัดได้จากแบคทีเรียใส่ลงในน้ำหรืออาหารเพื่อป้องกันโรคและกระตุ้นให้สัตว์น้ำมีการเจริญเติบโตดีขึ้น (ลิลา, 2541 ) จากข้อมูลดังกล่าว ชี้ให้เห็นว่าแบคทีเรียโพรไบโอติกมีความสำคัญ และมีความเป็นไปได้ในการนำมาใช้ในการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม วัตถุประสงค์ของการทำวิจัยครั้งนี้คือเพื่อศึกษา

คุณสมบัติเบื้องต้นและคัดเลือกเชื้อที่ที่มีสามารถนำไปพัฒนาเป็นโพรไบโอติกเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามต่อไป

## อุปกรณ์และวิธีการ

### การแยกและคัดเลือกเชื้อที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรค

นำตัวอย่างทางเดินอาหารส่วนที่เป็นกระเพาะและลำไส้ของกุ้งก้ามกรามจากคลองธรรมชาติ 3 แห่ง ได้แก่คลองท่าสาร (TS) คลองลำลูกบัว (LLB) คลองห้วยม่วง (HM) จำนวน 60 ตัวอย่าง นำมาทำความสะอาด ตัดเอาเฉพาะส่วนที่เป็นลำไส้และกระเพาะ นำมาบดด้วยแท่งแก้ว จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมด โดยวิธี pour plate ในอาหารเลี้ยงเชื้อ plate count agar นำโคโลนีที่แยกได้ มาเลี้ยงบนอาหาร NA (nutrient agar) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ตรวจสอบโคโลนีเดี่ยวๆ ทำซ้ำอีกครั้ง เพื่อทำให้เชื้อบริสุทธิ์มากขึ้น แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24-48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปย้อมสีแกรม และคัดเลือกเฉพาะเชื้อแบคทีเรียที่ติดสีแกรมบวก มาทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรคด้วยวิธีซึมผ่านวุ้น (Agar Well Diffusion Assay) ดัดแปลงตามวิธีการของ Barefoot และ Klaenhammer (1984) นำมาทดสอบกับเชื้อก่อโรคทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ เชื้อ *Aeromonas hydrophila*, *V. harveyi* , *V. paraheamolyicus* และ *E. coli* โดยนำเชื้อทั้ง 4 ชนิด มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB (nutrient broth) ในปริมาตร 10 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเชื้อ *V. paraheamolyicus* และ *V. harveyi* เลี้ยงในอาหาร NB ที่มี NaCl ผสมอยู่ 2 % นำเชื้อก่อโรคแต่ละชนิดผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB (nutrient broth) ในปริมาตร 250 ml เทวุ้นอาหารที่มีเชื้อก่อโรคผสมอยู่ลงในจานเลี้ยงเชื้อ ทิ้งจนวุ้นแข็งตัว จึงทำการเจาะหลุมในแต่ละจานๆ ละ 4 หลุม จากนั้นดูดเชื้อทดสอบเฉพาะเชื้อแกรมบวกที่ผ่านการเลี้ยงในอาหาร NB ครบ 24 ชั่วโมง หยดลงไปในหลุมๆ ละ 50 µl บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบบริเวณใสและวัดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีที่เวลา 6, 8, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง

### การทดสอบความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ในการเจริญที่สภาวะต่าง ๆ

ทดสอบการเจริญในสภาวะความเข้มข้นของ bile salt

นำเชื้อที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรค มาเลี้ยงในอาหาร NB โดยมีส่วนผสมของ bile salt ผสมอยู่ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10% โดยเลี้ยงลงในหลุม micro plate จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 12- 24 ชั่วโมง แล้วอ่านผลด้วยเครื่อง ELISA reader ที่ความยาวคลื่น 620 nm.

ทดสอบการเจริญในสภาวะความเข้มข้นของเกลือ NaCl

นำเชื้อที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรค มาเลี้ยงในอาหาร NB โดยมีส่วนผสมของ NaCl ผสมอยู่ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0,1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10% โดยเลี้ยงลงในหลุม micro plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 12- 24 ชั่วโมง แล้วอ่านผลด้วยเครื่อง ELISA reader ที่ความยาวคลื่น 620 nm.

ทดสอบการเจริญในสภาวะความเป็นกรดและเบส

นำเชื้อที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรค มาเลี้ยงในอาหาร NB ที่มีระดับ pH 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 โดยเลี้ยงลงในหลุม micro plate บ่มที่ อุณหภูมิ 37°C นาน 12- 24 ชั่วโมง แล้วอ่านผลด้วยเครื่อง ELISA reader ที่ความยาวคลื่น 620 nm.

ทดสอบเจริญในสภาวะอุณหภูมิต่างๆ

นำเชื้อที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรค มาเลี้ยงในอาหาร NB โดยเลี้ยงลงในหลุม micro plate แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 15, 20, 30, 37 และ 42 °C เป็นเวลา 12- 24 ชั่วโมง อ่านผลด้วยเครื่อง ELISA reader ที่ความยาวคลื่น 620 nm.

**การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกด้วยวิธี 16S rDNA**

ตรวจสอบและจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ที่เพาะแยกได้และมีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก ด้วยเทคนิคทางอณูชีวโมเลกุล (Molecular biology) โดยใช้หลักการของ 16s rDNA universal primers ในการสังเคราะห์ Genomic DNA ที่เคยมีรายงานไว้ คือ forward primer 5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3', reverse primer 5'ACGGCTACCTTGTTACGACTT 3' ( Weisburg *et al*., 1991 ) จากนั้นนำ PCR product หรือ DNA ของเชื้อมาทำให้บริสุทธิ์มากขึ้น เพื่อส่งวิเคราะห์ หาลำดับเบสด้วยวิธีการทำ DNA sequence analysis

## ผลการทดลองและวิจารณ์

**ผลการแยกและคัดเลือกเชื้อที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคโดยวิธีซึมผ่านวุ้น ( Agar Well Diffusion Assay)**

จากการแยกเชื้อแบคทีเรียจากกุ้งก้ามกรามในแหล่งน้ำธรรมชาติ 3 แหล่ง สามารถเลือกเชื้อแกรมบวกได้ จำนวน 237 ไอโซเลท เมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคด้วยวิธีซึมผ่านวุ้น พบว่า ได้เชื้อที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคโดยสร้างโซนใสรอบโคโลนีของเชื้อ จำนวน 8 ไอโซเลท ได้แก่ เชื้อไอโซเลท TSM33, TSM262, LLBM241, TSN262, TSM362, TSN63, TSM499-4 และ HMN151 เชื้อทั้งหมดสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ 3 ชนิด คือ *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio harviyi* และ *E. coli* แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ได้ จากการศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งของเชื้อทั้งหมด พบว่า มีเชื้อจำนวน 3 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ดีที่สุด ได้แก่ ไอโซเลท HMN151, TSM499-4 และ TSN 63 สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคทั้ง 3 ชนิดได้เร็ว เมื่อเวลาผ่านไป 12 ชั่วโมง และยับยั้งสูงสุดเมื่อเวลา 48 ชั่วโมง (Figure 1A, 1D และ 1G) เชื้อไอโซเลท TSM33, LLBM241 และTSM262 (Figure 1B, 1E และ1H) เชื้อรหัส TSM362 และTSN262 (Figure 1C,1F และ1I) สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้เร็วที่สุด ที่เวลาผ่านไป 18 ชั่วโมง และยับยั้งสูงสุดเมื่อเวลา 48 ชั่วโมง

**การทดสอบความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ในการเจริญที่สภาวะต่าง** ๆ

ผลการทดสอบการทนต่อ bile salt

การทดสอบความสามารถในการทนต่อ bile salt ของเชื้อที่คัดแยกได้ทั้งหมด พบว่าเชื้อทุกไอโซเลท สามารถเจริญได้ในเกลือน้ำดีไม่เกิน 3 % เชื้อที่สามารถเจริญได้ดีที่สุด ได้แก่ เชื้อรหัส HMN151 สามารถเจริญเติบโตได้ตั้งแต่ความเข้มข้นของ bile salt 1-3 % โดยวัดค่าความขุ่นของเชื้อผ่านความยาวคลื่นแสงที่ 620 nm. ได้เท่ากับ 0.6, 0.4 และ 0.3 นอกเหนือจากนั้นจะเจริญได้ที่ความเข้มข้นของ bile salt เพียง1 % ( Figure 2) ซึ่งผลการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับผลการวิจัยของศิริรัตน์ และคณะ (2548) ได้รายงานไว้ว่าเชื้อในสกุลบาซิลลัสจะเจริญเติบโตได้ใน bile salt ไม่เกิน 3 % ดังนั้นเชื้อในสกุลบาซิลลัสที่แยกได้ อาจมีข้อด้อยในแง่ของการจะเจริญได้ดีในทางเดินอาหารที่มีความเข้มข้นของ bile salt สูง แต่เนื่องจากยังไม่มีการศึกษาอย่างเด่นชัดถึงระบบการย่อยอาหารโดยมี bile salt เป็นองค์ประกอบหรือไม่ของกุ้งก้ามกราม เช่นเดียวกับในสัตว์บกอื่นๆ ประกอบกับเชื้อทุกไอโซเลทที่แยกได้ มาจากส่วนที่เป็นกระเพาะและลำไส้ของกุ้งก้ามกราม จึงเป็นข้อสังเกตว่าเชื้อ

เหล่านี้จึงมีคุณสมบัติเบื้องต้นในการนำมาใช้เป็นโพรไบโอติกได้

ผลการทดสอบการทนต่อความเข้มข้นของ NaCl

ผลการทดสอบสภาวะการเจริญของเชื้อที่แยกได้ในอาหารที่มี NaCl ผสมอยู่ 0-10 % พบว่าเชื้อจำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ เชื้อรหัส TSN499-4 และ TSN63 สามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้นของ NaCl ที่ 10 % ซึ่งเชื้อส่วนใหญ่ที่แยกได้ จะเจริญได้ที่ระดับความเข้มข้นของ NaCl 9% ( Figure 3)

ผลการทดสอบการเจริญในสภาวะความเป็นกรด-ด่าง

จากผลการทดลองพบว่า เชื้อทุกไอโซเลทจะเจริญได้ตั้งแต่ ช่วงของ pH ระหว่าง 5-10 ซึ่งมีเชื้อจำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่เชื้อรหัส HMN151, TSM499-4, LLBM241 และ TSM262 ที่สามารถเจริญได้ในช่วงของ pH ที่ 5-10 สำหรับเชื้อที่เจริญได้ดีตั้งแต่ช่วง pH 5-9 จำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ เชื้อรหัส TSN63, TSM33, TSN362 และ TSN262 โดยเชื้อทั้งหมดที่คัดเลือกได้ จะไม่สามารถเจริญได้ที่สภาวะความเป็นกรด ที่ pH 3-4 (Figure 4)

ผลการทดสอบการเจริญในสภาวะอุณหภูมิต่างๆ

จากผลการทดลองพบว่า เชื้อทุกไอโซเลทสามารถเจริญได้ตั้งแต่อุณหภูมิต่ำ ที่ 15°C จนถึงอุณหภูมิสูงที่ 42°C พบว่าเชื้อที่เจริญเติบโตได้เร็วที่อุณหภูมิต่ำได้ดีกว่าเชื้ออื่น ๆ ได้แก่ เชื้อรหัส HMN 151 โดยวัดค่าความขุ่นของเชื้อผ่านความยาวคลื่นแสงที่ 620 nm. ได้ค่า OD เท่ากับ 1.6 นอกเหนือจากนั้น จะวัดค่า OD ได้เท่ากับ 0.3 ซึ่งเชื้อทั้งหมด สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่ช่วงของอุณหภูมิ 20-37 °C
(Figure 5) ชี้ให้เห็นว่า เชื้อที่แยกได้ สามารถเจริญเติบโตได้ช่วงอุณหภูมิที่กว้าง จึงเหมาะสมในการนำไปใช้เป็นโพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามต่อไป

**ผลการจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกด้วยวิธี 16S rDNA**

เมื่อนำเชื้อ จำนวน 8 ไอโซเลท มาสกัดดีเอ็นเอ และเพิ่มจำนวนด้วย ไพรเมอร์16s rDNA และทำให้ DNA ของเชื้อบริสุทธิ์ นำไปวิเคราะห์หาลำดับเบส โดยวิเคราะห์ทั้งดีเอ็นเอสายไปข้างหน้าและสายย้อนกลับ พบว่าเชื้อทั้งหมด อยู่ในสกุลบาซิลลัส ได้แก่ *B. subtilis* มีจำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่เชื้อรหัส TSM33, TSM262, LLBM241 และ TSN262 เชื้อ *B. amyloliquefacian* มีจำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่เชื้อรหัส TSN 63 และ TSM499-4 และ*เชื้อ B. thuringiensis* ได้แก่ เชื้อรหัส HMN151 และ เชื้อ *B. aryabhattai* ได้แก่ เชื้อรหัส TSM 362 (Figure6)

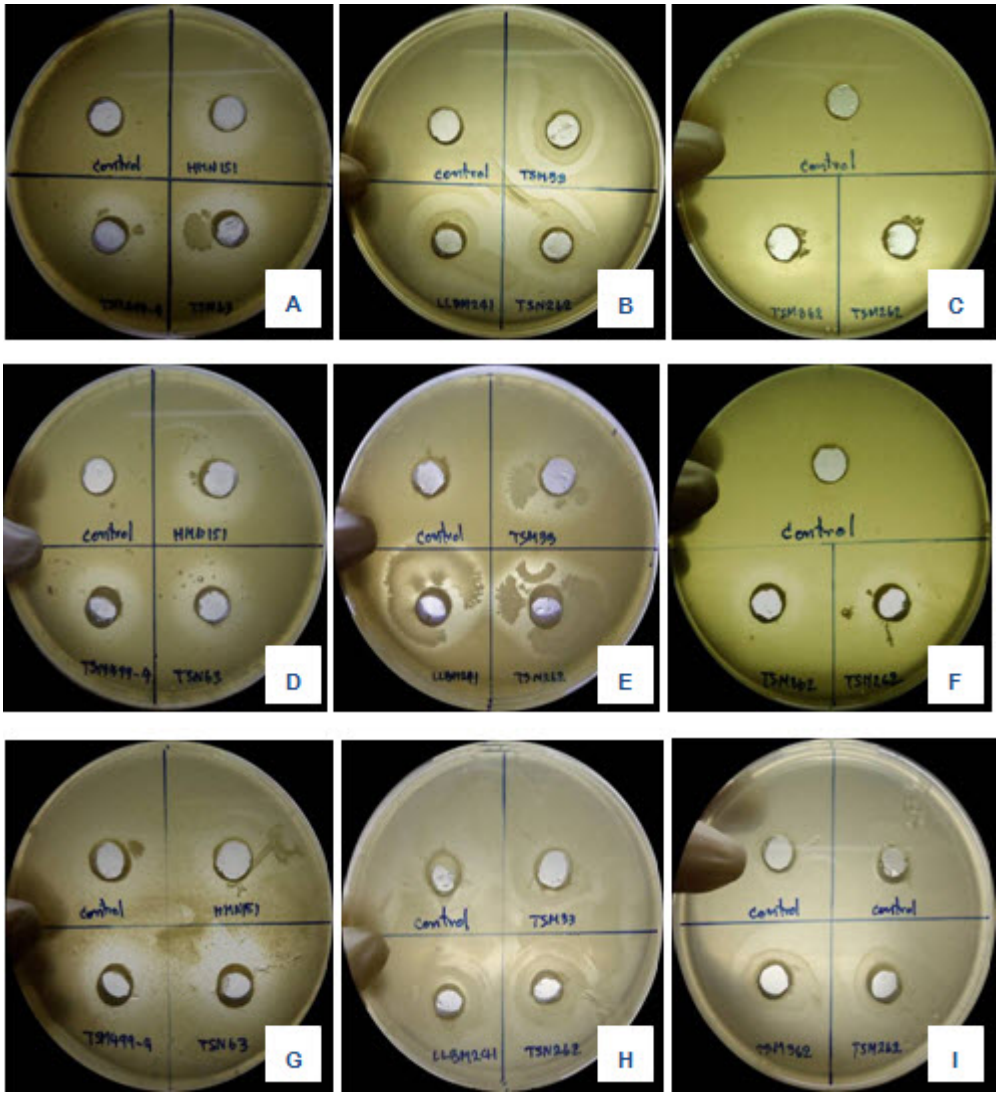


**Figure 1** Clear inhibition zone of pathogenic bacterial growth by 8 gram positive bacteria isolates from gastrointestinal tract of giant fresh water prawn.

A = Isolate HMN151, TSN499-4, TSN63; B = TSM33, LLBM241, TSN263; C = TSM362, TSM262 on growth inhibition for *V. harveyi*.

C = Isolate HMN151, TSN499-4, TSN63; D = TSM33, LLBM241, TSN263; E = TSM362, TSM262 on growth inhibition for *A. hydrophilla.*

G = Isolate HMN151, TSN499-4, TSN63; H = TSM33, LLBM241, TSN263; I = TSM362, TSM262 on growth inhibition for *E. coli.*

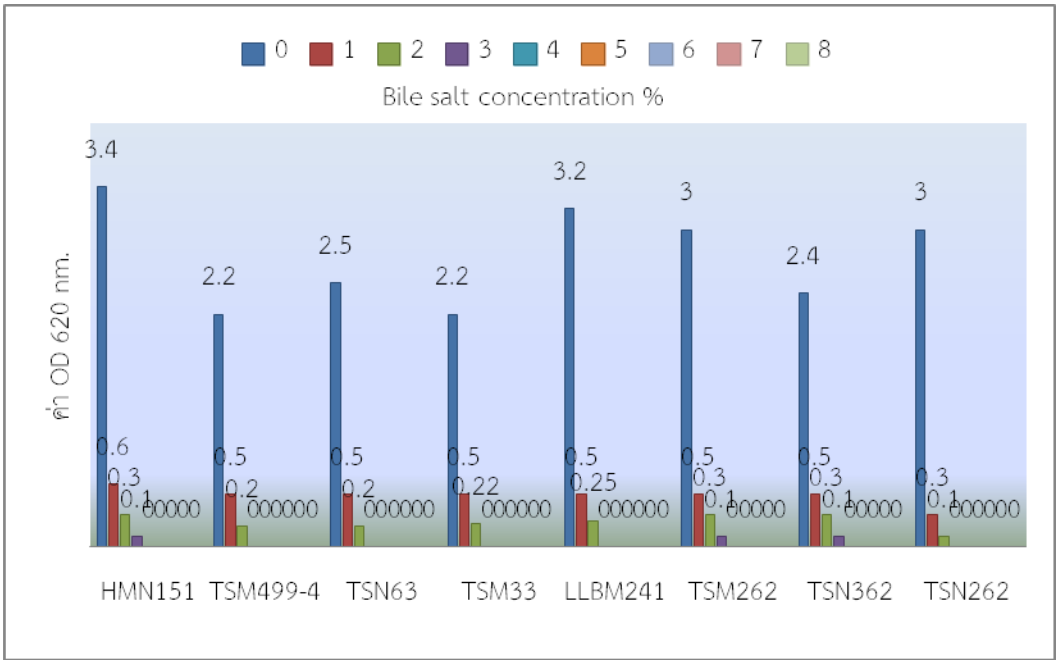


**Figure 2** Bacterial growths as OD $_{620}$ after 24 hrs cultivation at 37°C of the selected bacterial isolates in the presence of 0-10% of bile salt in the culture medium.

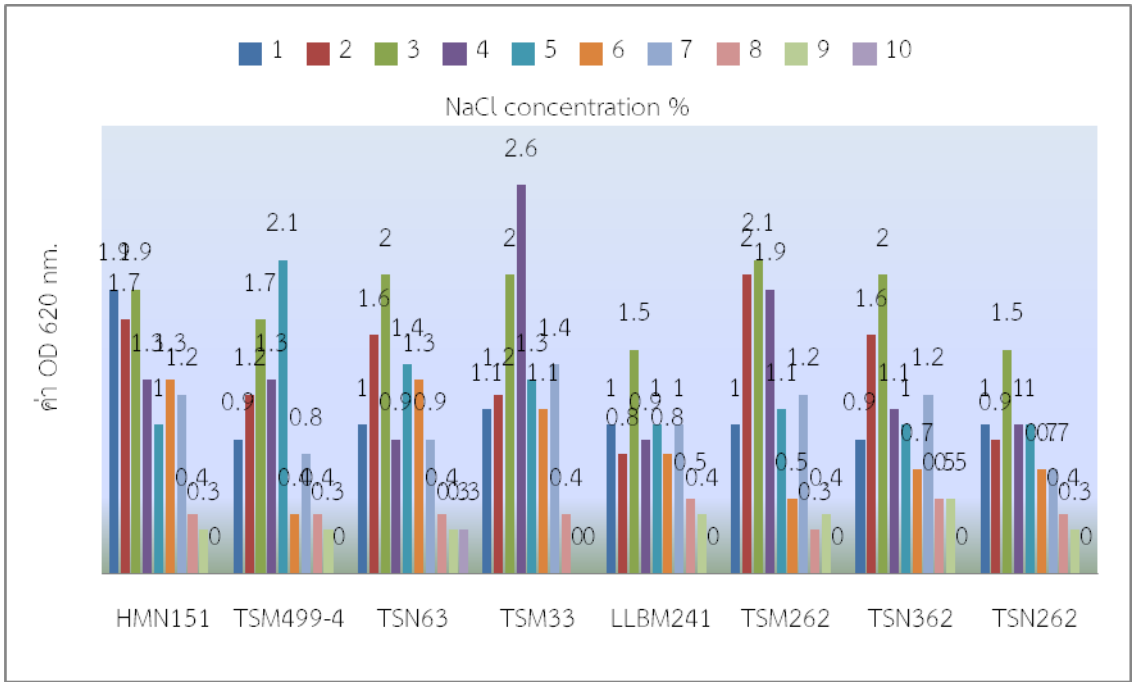


**Figure 3** Bacterial growths as OD $_{620}$ after 24 hrs incubation in Nutrient broth containing NaCl 0-10%

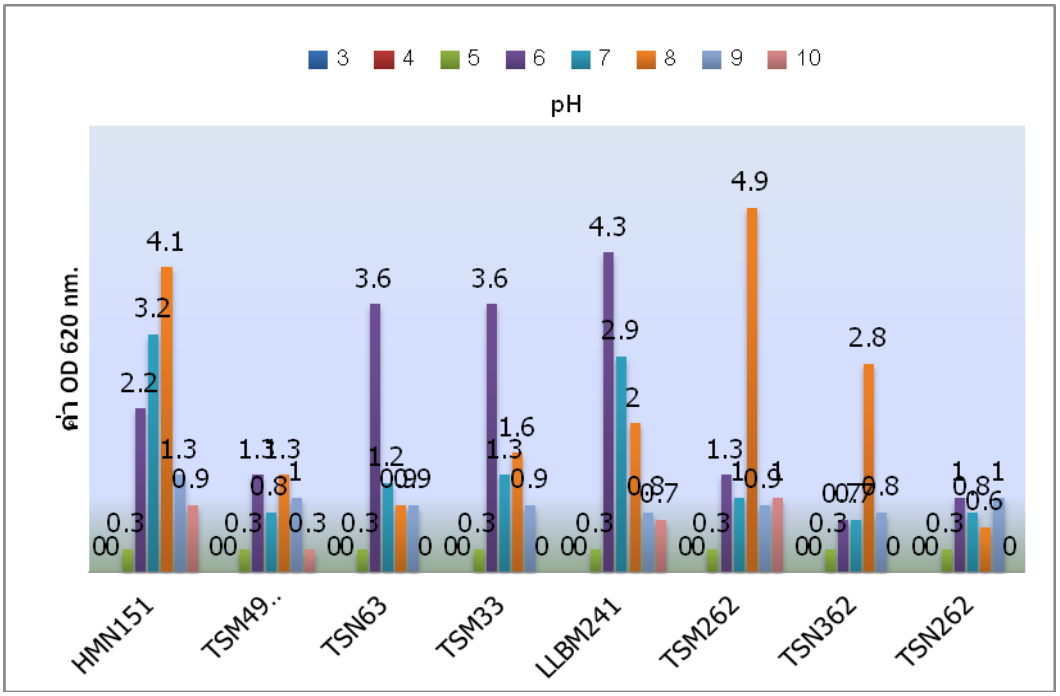


**Figure 4** Bacterial growths as OD $_{620}$ after 24 hrs incubation in Nutrient broth medium pH 1-10

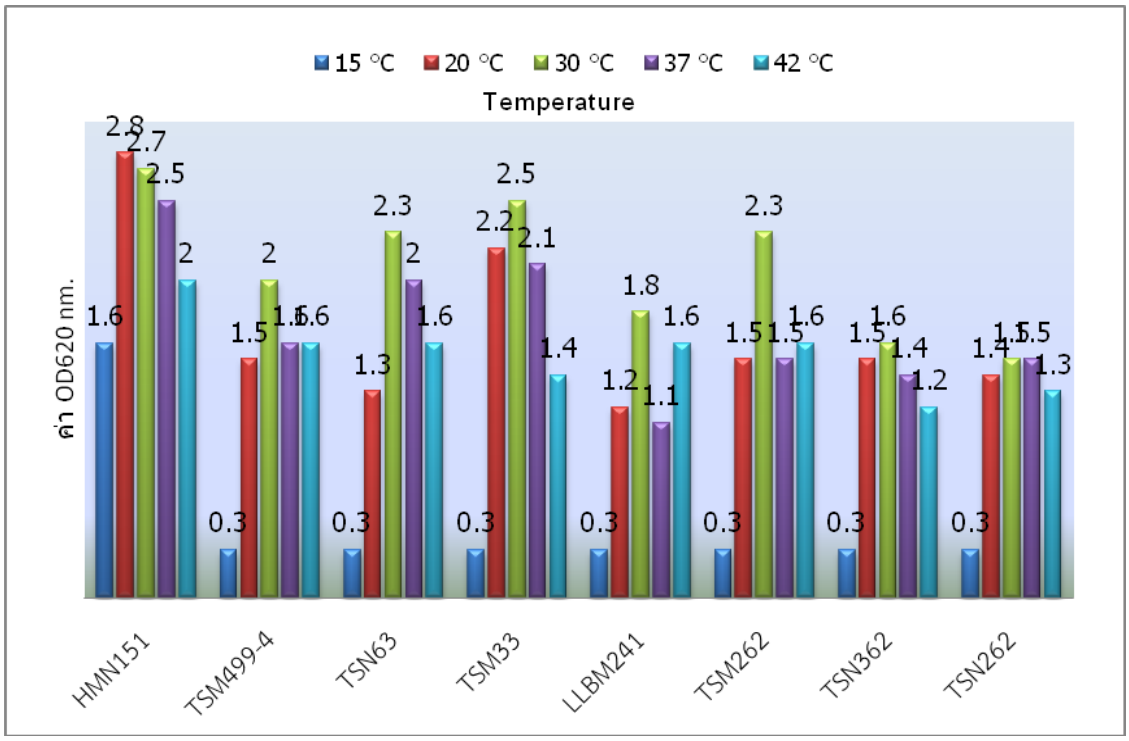


**Figure 5** Bacterial growths as OD $_{620}$ after 24 hrs incubation in Nutrient broth medium at 15-42°C

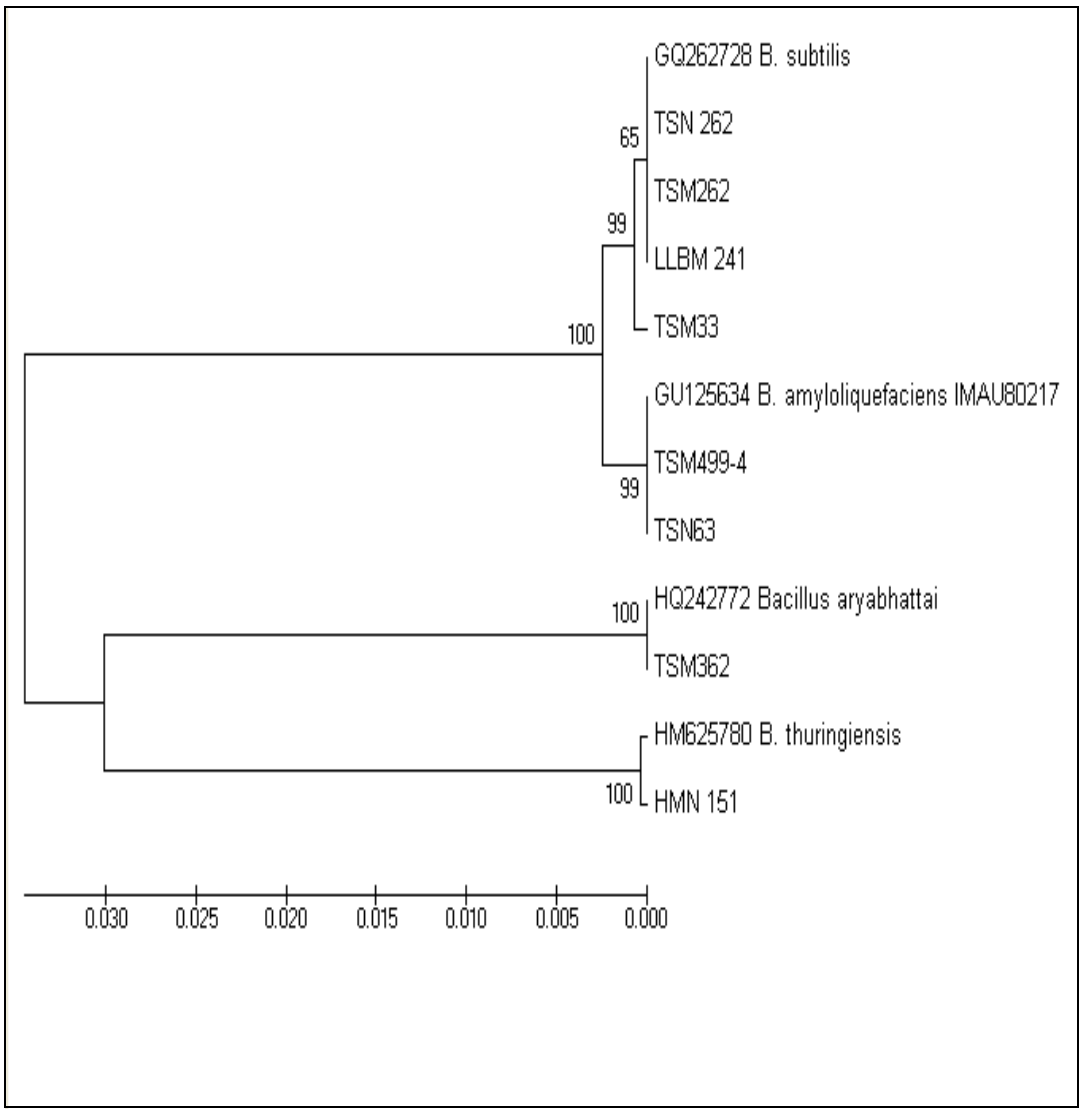


**Figure 6** Neighbor-joining phylogenetic tree of *Bacillus* spp. isolated from *Macrobrachium rosenbergii* (Giant Fresh Water Prawn) based on mitochondrial DNA 16S with 1,000 bootstraps

**สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย**

ผลการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จากทางเดินอาหารของกุ้งก้ามกราม พบว่าได้เชื้อ 8 ไอโซเลท ที่มีคุณสมบัติเบื้องต้นในการเป็นโพรไบโอติก โดยสามารถสร้างบริเวณใสยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ทั้ง 3 ชนิด เชื้อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน มีการจัดเรียงตัวของเซลล์เป็นสายสั้น ๆ เมื่อนำเชื้อมาจำแนกชนิด โดยใช้ไพรเมอร์ 16S rDNA และทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าเป็นเชื้อที่อยู่ในสกุลบาซิลลัส สามารถแยกได้เป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ได้แก่เชื้อ *B. subtilis* TSN262, *B. subtilis* TSM262, *B. subtilis* LLBM241, *B. subtilis* TSM33 กลุ่มที่ 2 ได้แก่ เชื้อ *B. amyloliquefaciens* TSM499-4, เชื้อ *B. amyloliquefaciens* TSN63 กลุ่มที่ 3 ได้แก่ เชื้อ *B. thuringiensis* HMN151 และกลุ่มที่ 4 ได้แก่ เชื้อ *B. aryabhattai* TSM362

ผลการศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรค พบว่าเชื้อที่ยับยั้งได้ดีที่สุด ได้แก่ เชื้อ *B. thuringiensis* HMN151 และ เชื้อ *B. Subtilis* TSN262, *B. subtilis* TSM262, *B. subtilis* LLBM241 และ *B. subtilis* TSM33 ให้ผลการยับยั้งโดยการสร้างโซนใสเข้าป้องกันหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรค ซึ่งเชื้อทั้ง 2 ชนิด พบ

ได้ตามธรรมชาติทั่วไป โดยเชื้อ *B. thuringiensis* เป็นเชื้อที่พบในดิน ถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายทางการเกษตร แยกได้จากลำไส้ของหนอนผีเสื้อหลายชนิด สามารถสร้างสารโปรตีนผลึกเข้าทำลายแมลงศัตรูพืช เช่นการนำมาใช้ควบคุมตัวอ่อนของหนอนใยผัก เนื่องจากเชื้อชนิดนี้ไม่ก่ออันตรายให้แก่มนุษย์ หรือสัตว์ชนิดอื่นๆ (Madigan and Mart inko, 2005) อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการนำเชื้อชนิดนี้ใช้เป็นโพรไบโอติก จึงควรที่จะมีการศึกษาการนำเชื้อชนิดนี้มาใช้เป็นโพรไบโอติกในกุ้งก้ามกรามต่อไป

เชื้อ *B. subtilis* เป็นเชื้อที่พบในสภาพแวดล้อมทั่วไป สามารถผลิต Polypeptide antibiotics ได้แก่ bacitracin (Kenneth Todar University, 2006) 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 ได้มีการศึกษานำเชื้อชนิดนี้ใช้ในการควบคุมเชื้อราในโรคพืชได้หลายชนิด จึงเป็นเชื้อที่น่าสนใจในการนำมาศึกษา เพื่อใช้เป็นโพรไบโอติกในกุ้งก้ามกรามได้อีกชนิดหนึ่ง (Barefoot and Klaenhamme, 1984)

เชื้อ *B. ayahbhattai* มีรายงานการแยกเชื้อชนิดนี้ได้จากส่วนรากของพืชน้ำชนิดหนึ่งเรียกว่า *Lamna* sp. เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกรูปท่อน ให้ผลบวกต่อเอนไซม์หลายชนิด เช่น Oxidase, Urease, Gelatinase อีกทั้งยังช่วยในขบวนการ Nitrate reduction และการย่อยสารจำพวกแป้งได้ มีความสามารถในการเจริญเติบโตได้ในอุณหภูมิต่ำถึง 4ºC แต่ไม่ทนอุณหภูมิที่มากกว่า 37ºC ซึ่งจากการศึกษาเบื้องต้น เชื้อชนิดนี้ให้ผลลบต่อการทดสอบการผลิตสารปฏิชีวนะ ปัจจุบันได้เริ่มมีนักวิจัยให้ความสนใจศึกษาคุณสมบัติในการผลิตยาปฏิชีวนะของเชื้อชนิดนี้เพิ่มเติม เพื่อจะนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านการแพทย์ (Semanti *et al.*, 2012) ในการวิจัยครั้งนี้ พบว่า เชื้อชนิดนี้ให้ผลในการยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ 3 ชนิดได้ ประกอบกับเชื้อชนิดนี้สามารถเจริญได้ในอุณหภูมิต่ำ จึงมีความเหมาะสมที่จะคัดเลือกพัฒนาเป็นโพรไบโอติกในกุ้งก้ามกรามต่อไป

## กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา หน่วยงานชันสูตรโรคสัตว์ และห้องปฏิบัติการวิจัยโรคทางสัตว์เศรษฐกิจ ภาควิชาเวชศาสตร์และทรัพยากรการผลิตสัตว์คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ในการดำเนินการวิจัยครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ดี

## เอกสารอ้างอิง

ลิลา เรืองแป้น ยาใจ เจริญวิทยะกุล เยาวนิตย์ ตนยดล. 2541. โรคและพยาธิกุ้งทะเลของไทย. เอกสารวิชาการฝ่ายทดลองและวิจัยเพื่อการเพาะเลี้ยง กองประมงน้ำกร่อย กรมประมง บางเขน กรุงเทพฯ.

ศิริรัตน์ สีหนาท, ลือชัย บุตคุป สมคิด แข็งกลาง และวิชัย ลีลาวัชรมาศ. 2548.การยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในกุ้งด้วยเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากกุ้งก้ามกราม. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สงขลานครินทร์. 27(1) 266-274

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. Marce l Dekker Inc, New York. 1-72.

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

Kenneth Todar University. 2006. Antimicrobial Agents Used in Treatment of Infectious Disease. Wisconsin-Madison Department of Bacteriology. < http// www.textbookofbacteriology.net/antimicrobial.html>

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

Semanti, R., D., Rohini, B., Poilomi, C., Bodhisatwa and K M. Arup. 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.>

**Received 3 July 2012**

**Accepted 29 May 2013**